

Ivanda Franckeviča

LATVIJAS BĒRNU NIERU AUDZĒJU
MORFOLOĢISKAIS,
IMŪNHISTOĶĪMISKAIS UN
ĢENĒTISKAIS RAKSTUROJUMS

Promocijas darbs
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – patoloģija

Darba zinātniskā vadītāja:
Dr. med., profesore **Regīna Kleina**



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



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

Rīga, 2013

ANOTĀCIJA

Primāri nieru audzēji veido aptuveni 7% no visiem pediatriiskajiem ļaundabīgajiem jaunveidojumiem vecuma grupā līdz 15 gadiem. Visbiežāk šajā grupā pārstāvēts Vilmsa audzējs jeb nefroblastoma (85% no gadījumiem), tam seko nieru šūnu vēzis (3-5%), mezoblastiska nefroma (3%), nieru gaišo šūnu sarkoma, nieres rabdoīds audzējs (2%) un reti jauktas ģenēzes audzēji (2%). Precīzai histoloģiskajai diagnostikai un audzēja stadijas noteikšanai bērnu nieru audzēju gadījumā ir liela nozīme, jo ārstēšana un pacienta prognoze ļoti atšķiras atkarībā no diagnosticētā audzēja morfoloģiskā veida.

Pašlaik pasaulē pediatriisko nieru audzēju gadījumā pastiprināta interese tiek pievērsta potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas pētniecībai un zinātniskais darbs ir vērsts uz adekvātu ķimioterapijas shēmu izstrādi un izdarītās ķimioterapijas izvērtēšanas kritēriju izstrādi balstoties uz imūnhistoķīmisko atradi. Nefroblastomas gadījumā tiek pētīta vairāku potenciāli nozīmīgu marķieru ekspresija un iegūtie dati pagaidām nav viennozīmīgi interpretējami. Prognostiski svarīga ir p53 proteīna ekspresijas pakāpe, kurai ir pozitīva saistība ar anaplāzijas pakāpi un sliktāku prognozi savukārt jautājums par proliferācijas indeksa (Ki67/MIB-1) klīnisko nozīmi nefroblastomas gadījumā ir diskutabls. Atsevišķi autori atzīmē kadherīnu grupas proteīnu, WT1 proteīna, angiogēnēzes marķieru un CD44 izoformu ekspresijas saistību ar nefroblastomas stadiju un prognozi. Tāpat tiek pētīta 9p21 hromosomas segmentā esošā audzēju supresora gēna CDKN2A izmaiņas saistībā ar gēna kodētā p16^{INK4a} proteīna ekspresijas intensitāti audzēju audos.

Baltijas valstīs pagaidām nav veikti fundamentāli pētījumi, kuri apkopotu datus par pediatriisko nieru audzēju morfoloģisko spektru, līdz ar to nav veikta arī prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas pakāpes noteikšana un ģenētisko izmaiņu pētniecība audzēju audos. Šī darba mērķis ir apzināt situāciju mūsu valstī, salīdzināt histoloģiskās atradnes datus pirms un pēc imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas, noteikt diagnostiski un prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresiju jaunveidojumu audos, un veikt iegūto rezultātu analīzi saistībā ar klīniskajiem datiem, kā arī veikt audzēju molekulāri ģenētisko izmeklēšanu.

ANNOTATION

Paediatric renal tumours represent 7% of all tumours in first 15 years of life. Wilms tumour or nephroblastoma is the most common tumour (85% of cases), followed by renal cell carcinomas (3-5%), mesoblastic nephroma (3%), clear cell sarcoma of the kidney, rhabdoid tumour of the kidney (2%) and miscellaneous rare tumours (2%). The variable and overlapping appearances of the tumours and their rarity make them especially challenging group of lesions for the pathologist. Accurate histological diagnosis and staging of these tumours are critical because their treatment and prognosis are very different too.

Currently, the world's pediatric pathologists interest is concentrated upon the research of potentially prognostic important immunohistochemical markers and scientific work is focused on the development of adequate on immunohistochemical findings based scheme of chemotherapy and development of criteria for evaluating the effectiveness of chemotherapy. In the case of nephroblastoma there are studied a lot of potentially prognostic important markers and the data has not yet been clearly interpreted. Prognostic important is p53 protein expression level, which have positive correlation with grade of anaplasia and poor prognosis, while the clinical significance of proliferation index (Ki67/MIB-1) in the case of nephroblastoma is questionable. Some authors describe cadherine group proteins, WT1 protein, angiogenesis markers and CD44 isoform expression association with tumor stage and prognosis. Now there are studied CDKN2A tumor suppressor gene changes localized in chromosome 9p21 and CDKN2A gene encoded p16^{INK4a} protein expression rate in tumour tissues.

There are currently no fundamental studies devoted to morphologic spectrum of children kidney tumours in Baltic countries. Consequently both the expression of potentially prognostic important immunohistochemical markers and genetic changes in tumor tissue are not investigated. Aim of the present paper is to investigate the situation with pediatric renal tumours in Latvia, compare histological appearances before and after immunohistochemistry, to determine diagnostically and prognostically important immunohistochemical markers in tumor tissue, as well as to make molecular genetic investigations of tumours.

SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI.....	7
IEVADS.....	11
1. Pētījuma aktualitāte.....	11
2. Darba mērķis.....	12
3. Darba uzdevumi.....	13
4. Pētījuma hipotēzes.....	13
5. Darba zinātniskā novitāte.....	13
6. Darba praktiskā nozīme.....	14
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	15
1.1. Pediatriko nieru audzēju vispārējs epidemioloģisks, morfoloģisks, imūnhistoķīmisks un ģenētisks raksturojums.....	15
1.1.1. Histoloģiskā klasifikācija.....	15
1.1.2. Nefroblastiskie audzēji.....	16
1.1.3. Rabdoīds nieru audzējs.....	24
1.1.4. Nieru gaišo šūnu sarkoma.....	26
1.1.5. Mezoblastiska nefroma.....	29
1.1.6. Nieru šūnu vēzis.....	30
1.1.7. Metanefrītiskie audzēji.....	32
1.1.8. Reti sastopamie audzēji.....	33
1.1.9. Stadiju un histoloģiskās malignitātes pakāpju noteikšana.....	34
1.2. Potenciāli prognostiski un diagnostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru raksturojums nefroblastomas gadījumā.....	36
1.2.1. CD44 glikoproteīda izoformas t. sk. CD44s izoforma.....	36
1.2.2. Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16 ^{INK4a} izmaiņas un tā kodētā p16 ^{INK4a} proteīna ekspresija.....	38
1.2.3. Ar šūnu proliferāciju saistītais kodolu antigēns Ki67/MIB-1.....	42
1.2.4. Audzēju nomācēja gēna p53 proteīns.....	45
1.2.5. Šūnu adhēzijas molekula e -kadherīns.....	48
1.2.6. Vilmsa audzēja nomācēja gēna (WT1) proteīns.....	49
1.2.7. Angiogēzes imūnhistoķīmiskie marķieri un mikroasinsvadu proliferācija.....	51
1.2.8. Epiteliālo struktūru skaits un epiteliālie marķieri.....	53
2. MATERIĀLS UN METODES.....	55
2.1. Pētījuma uzbūve.....	55

2.2. Analizētā materiāla imūnhistoķīmiskā izmeklēšana	56
2.2.1. Histoloģiskās un imūnhistoķīmiskās audu apstrādes metodika	56
2.2.2. Imūnhistoķīmisko reakciju kontrole analizēto nefroblastomu grupā	59
2.2.3. Imūnhistoķīmisko reakciju izvērtēšanas metodika analizēto nefroblastomu grupā	60
2.3. Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16 ^{INK4a} ģenētisko izmaiņu noteikšanas metodika nefroblastomu audos.....	62
2.3.1. DNS ekstrakcija no parafīnā ieguldītiem audiem	62
2.3.2. CDKN2A/p16 ^{INK4a} gēna pavairošana izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju.....	62
2.3.3. CDKN2A/p16 ^{INK4a} gēna sekvenēšana	63
2.3.4. Heterozigotitātes zuduma analīze CDKN2A lokusā izmantojot mikrosatelītu marķierus	63
2.4. Datu statistiskās apstrādes metodes.....	64
3. REZULTĀTI.....	66
3.1. Latvijas pediatriko nieru audzēju morfoloģiskā spektra raksturojums	66
3.1.1. Primāro nieres audzēju morfoloģiskā spektra raksturojums pēc sākotnējās histoloģiskās izmeklēšanas datiem	66
3.1.2. Primāro nieres audzēju morfoloģiskā spektra raksturojums pēc atkārtotas morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas datiem	68
3.1.3. Primāro nieres audzēju morfoloģiskā spektra salīdzinājums pirms un pēc atkārtotas morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas	76
3.2. Imūnhistoķīmiski noteikto, potenciāli prognostiski svarīgo marķieru ekspresija nefroblastomas gadījumā.....	77
3.2.1. Pētītās grupas pacientu klīnisko un histoloģisko parametru raksturojums.....	77
3.2.2. CD44s glikoproteīda izoformas ekspresija	80
3.2.3. Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16 ^{INK4a} kodētā p ^{INK4a} proteīna ekspresija	90
3.2.4. Ar šūnas proliferāciju saistītā kodolu antigēna Ki67 ekspresija	99
3.2.5. P53 proteīna ekspresija	108
3.2.6. E-kadherīna ekspresija	116
3.2.7. CK AE1/AE3 ekspresija	120
3.2.8. CD34 pozitīvo asinsvadu proliferācija.....	124
3.2.9. Vilmsa audzēja nomācēja gēna (WT1) proteīna ekspresija	128
3.2.10. Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresivitātes savstarpējā saistība	133

3.3. Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16 ^{INK4a} ģenētiskās izmaiņas nefroblastomas gadījumā.....	133
3.3.1. Pētītās audzēju grupas raksturojums	133
3.3.2. CDKN2A lokusa DNS sekvenēšanā iegūto ģenētisko izmaiņu analīze.....	134
3.3.3. CDKN2A lokusa DNS sekvencēšanā iegūtā rezultāta un p ^{INK4a} proteīna imūnhistoķīmiskās ekspresijas salīdzinājums	137
4. DISKUSIJA	140
4.1. Latvijas pediatriko nieru audzēju morfoloģiskā spektra analīze.....	140
4.2. Imūnhistoķīmiskās un molekulāri ģenētiskās atradnes saistība ar klīniski morfoloģiskajiem datiem nefroblastomas gadījumā	146
4.2.1. Analizētā materiāla un pielietotās metodikas izvērtējums	146
4.2.2. Potenciāli prognostiski nozīmīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas novērtējums	149
4.2.3. Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16 ^{INK4a} ģenētisko izmaiņu izvērtējums	156
5. SECINĀJUMI.....	158
6. PRAKTISKIE IETEIKUMI.....	159
7. PUBLIKĀCIJAS.....	160
8. TĒZES UN ZIŅOJUMI KONFERENCĒS	161
9. IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	162
PATEICĪBAS	181

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

A	- adenoziņs
AML	- angiomioipoma
ASPCR1 (ASPL)	- alveolārās sarkomas hromosomas reģiona kandidāta gēns 1 (angļu val. alveolar soft part sarcoma chromosome region, candidate 1)
BKUS	- Bērnu Klīniskā Universitātes slimnīca
Bcl-2	- bcl-2 (angļu val. B-cell chronic lymphocytic leukemia) gēna kodētais proteīns
Bp	- bāzu pāris
C	- citiziņs
CACNA1E	- sprieguma atkarīgs kalcija kanālu, R tipa, alfa 1E subvienības gēns (angļu val. calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit)
CD	- diferenciācijas marķieris (angļu val. cluster of differentiation)
CDH1	- 1.tipa kadherīna gēns (angļu val. cadherin type 1)
CDKN2A	- ciklīna atkarīgās kināzes inhibitora 2A gēns (angļu val. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)
CEA	- karcinoembriotiskais antigēns
CK	- citokeratīns
CLTC	- klatrīna smago ķēžu gēns (angļu val. clathrin heavy chain)
CMN	- celullāra mezoblastiska nefroma
CNS	- centrālā nervu sistēma
CI	- ticamības intervāls (angļu val. confidence interval)
CT	- kompjuātertomoģrafija
DMSO	- dimetilsulfoksīds
DNS	- dezoksiribonukleīnskābe
dNTP	- dezoksiribonukleotīda trifosfāts
DSRCT	- desmoplastisks sīko apaļo šūnu audzējs (angļu val. - desmoplastic small round cell tumor)
EDTA	- etilēndiamīntetraetiķskābe (ķīmiskā formula $C_{10}H_{16}O_8N_2$)
EMA	- epiteliālais membrānu antigēns
ETV6	- ets varianta gēns 6 (angļu val. E -twenty six.variant 6)
EWS	- Juinga sarkomas reģiona gēns (angļu val. Ewing sarcoma breakpoint region 1 gene)
Flt	- ar fms saistītās tirozīna kināzes gēns 1 (angļu. val. feline sarcoma virus related tyrosine kinase 1)
FBXW7	- F boksa/WD atkārtojumu saturošā proteīna gēns (angļu val. F-box/WD repeat-containing protein 7)

FWT1	- pārmantotā Vilmsa audzēja gēns 1 (angļu val. familial Wilms tumora 1)
FWT2	- pārmantotā Vilmsa audzēja gēns 2 (angļu val. familial Wilms tumora 2)
H&E	- hematoksilīns eozīns
HMB	- melanomas antigēns (angļu val. Human Melanoma Black)
HPV	- cilvēka papillomas vīruss (angļu val. human papillomavirus)
hSNF5/INI1 (SMARCB1)	- ar SWI/SNF (angļu val. SWItch/Sucrose NonFermentable) saistītā, aktīva atkarīgā hromatīna regulatora proteīna gēns (angļu val. SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily B, member 1)
g	- brīvās krišanas paātrinājums $\sim 9,81 \text{ m/s}^2$
G	- guanīns
GFAP	- gliāls fibrilārs acidisks proteīns
IGF2	- insulīnam līdzīgā augšanas faktora 2 gēns (angļu val. insulin-like growth factor 2)
IGFB7	- insulīnam līdzīgā augšanas faktora saistošā proteīna gēns 7 (angļu val. insulin-like growth factor binding protein 7)
INA	- intralobārie nefrogēnie atlikumi
INK4a	- kināzes 4a inhibitors
IRF	- infantila nieru fibrosarkoma
Kb	- kilo bāžu pāris (lielums ekvivalents 1000 bāžu pāriem)
kDA	- kilodaltons
LCA	- leukocītu kopējais antigēns
LOH	- heterozigotitātes zudums (angļu val. loss of heterozygosity)
M	- mainīgā lieluma vidējā aritmētiskā vērtība
MA	- metanefrogēna adenoma
Max	- mainīgo lielumu diapazona maksimālā vērtība
Min	- mainīgo lielumu diapazona minimālā vērtība
MEOX2	- mezenhimālais homeoboksa gēns 2 (angļu val. - mesenchyme homeobox 2)
Mo	- moda, mainīgā lieluma visbiežāk sastopamā vērtība
MN	- mezoblastiska nefroma
MYCN	- ar mielocimatozes vīrusu saistītais onkogēns (angļu val. myelocytomatosis viral related oncogene)
MyoD1	- mioblastus noteicošais proteīns 1 (angļu val. myoblast determination protein 1)
n	- izlases apjoms (gadījumu skaits)
NB84	- neuroblastomas marķieris 84 (angļu val. neuroblastoma 84)
NGŠS	- nieres gaišo šūnu sarkoma

NONO	- POU domēnu nesaturošais oktamēru saistošais gēns (angļu val. non- POU (pronounced' pow') domain containing, octamer binding
NRA	- nieres rabdoīds audzējs
NSE	- neironu specifiskā enolāze
NŠV	- nieru šūnu vēzis
NTRK3	- neirotrofiskās tirozīna kināzes receptoru gēns 3.tipa gēns (neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3)
NWTSG	- Vilmsa audzēja izpētes grupa ASV (angļu val.- National Wilms Tumor Study Group)
nt	- nukleotīds
p	- būtiskuma līmenis (varbūtība, ka spēkā ir nulles hipotēze)
PCNA	- proliferējošo šūnu kodolu antigēns (angļu val. proliferating cell nuclear antigen)
PCR	- polimerāžu ķēdes reakcija (angļu val. polymerase chain reaction)
PI	- proliferācijas indekss
PNA	- perilobārie nefrogēnie atlikumi
PNET	- primitīvs neuroektodermāls audzējs
PRCC	- ar translokāciju saistītās papillāras nieru šūnu karcinomas gēns (angļu val. papillary renal cell carcinoma (translocation associated))
PVO	- Pasaules Veselības organizācija
r	- Spīrmēna rangu korelācijas koeficients
RNS	- ribonukleīnskābe
SOSTDC1	- sklerostīna domēnu saturošā proteīna gēns 1 (angļu val. sclerostin domain containing protein 1)
SKCG-1	- nieru sporādiskā vēža gēns-1 (angļu val. - sporadic kidney cancer-1)
SD	- mainīgā lieluma standartnovirze
SIOP	- starptautiskā Pediatrijas Onkoloģijas Biedrība (angļu val.-International Society of Paediatric Oncology)
SSX	- ar X hromosomu saistītais sinoviālās sarkomas gēns (angļu val. synovial sarcoma X)
SYT	- sinaptotagmīna gēns (angļu val. synaptotagmin)
T	- timidīns
Taq polimerāze	- termostabīlā termofilās baktērijas Thermus aquaticus DNS polimerāze
TBS	- buferēts tris(hidroksimetil)aminometāna šķīdums
TFEB	- transkripcijas faktora EB gēns (angļu val. transcription factor)
TFE3	- transkripcijas faktora E3 gēns (angļu val. transcription factor E3)
Tris	- tris(hidroksimetil)aminometāns (ķīmiskā formula (HOCH ₂) ₃ CNH ₂)
TP53	- audzēju proteīna 53 gēns (angļu val. tumor protein 53)

USG	- ultrasonogrāfija
VEGF	- vaskulārais endoteliālais augšanas faktors (angļu val. vascular endothelial growth factor)
VEGFR	- vaskulārā endoteliālā augšanas faktora receptors (angļu val. vascular endothelial growth factor receptor)
WT1	- Vilmsa audzēja nomācēja gēns
WTX	- ar X hromosomu saistītais Vilmsa tumora gēns (angļu val. Wilms tumor gene on the X chromosome protein)

IEVADS

1. Pētījuma aktualitāte

Primāri nieru audzēji veido aptuveni 7% no visiem pediatriiskajiem ļaundabīgajiem jaunveidojumiem vecuma grupā līdz 15 gadiem un 4,4% no visiem ļaundabīgajiem audzējiem bērniem un pieaugušajiem vecumā līdz 20 gadiem. Tie ir piektā visbiežākā pediatriisko audzēju grupa, ieņemot nākošo vietu aiz akūtas limfoblastu leikozes un limfomām, neiroblastomas, centrālās nervu sistēmas audzējiem, ļaundabīgajiem mīksto audu un germinogēnajiem audzējiem. To sastopamība ASV ir 7,9 gadījumi uz miljons iedzīvotāju vecuma grupā līdz 15 gadiem un 6,2 gadījumi uz miljons iedzīvotāju vecuma grupā līdz 20 gadiem [Ries et al., 1999]. Visbiežāk šajā grupā pārstāvēts Vilmsa audzējs jeb nefroblastoma (85% no gadījumiem), tam seko nieru šūnu vēzis (3-5%), mezoblastiska nefroma (3%), nieru gaišo šūnu sarkoma, nieres rabdoīds audzējs (2%) un reti jauktas ģenēzes audzēji (2%) [Birch et al., 1995]. Pateicoties šīs patoloģijas samērā retajai sastopamībai, variablajai histoloģiskajai atradnei un iespējai, ka histoloģiskā aina var pārklāties dažādu šīs grupas jaunveidojumu gadījumā, bērnu nieru audzēji vienmēr ir bijuši pediatrijas nozarē strādājošo patologu intereses lokā. Pastiprināta interese bērnu vecuma nieru audzēju precīzai histoloģiskajai diagnostikai un audzēja stadijas noteikšanai tiek veltīta arī tāpēc, ka to ārstēšana un pacienta prognoze ļoti atšķiras atkarībā no diagnosticētā audzēja morfoloģiskā veida. Pasaulē to izpēte notiek lielu pētniecisku grupu ietvaros, no kurām nozīmīgākās ir Vilmsa audzēja izpētes grupa ASV (National Wilms Tumor Study Group/NWTSG) un multinacionālā Pediatrijas Onkoloģijas (International Society of Paediatric Oncology/SIOP) izpētes grupa Eiropā. Pēdējo 40 gadu laikā šo kooperatīvo grupu darbs izstrādājot precīzus diagnostiskos kritērijus, uz audzēja stadiju un histoloģisko ainu balstītus ķīmijterapijas protokolus, kā arī ķirurģiskās tehnikas pieejas, ir bijis ļoti veiksmīgs. Kopumā rezultātā ir panākta ievērojama prognozes uzlabošanās nefroblastomas pacientiem. Ja 20. gadsimta sākumā piecu gadu dzīvildze pēc diagnozes noteikšanas bija novērojama 8% pacientu, tad 1960. gadā šo rādītāju sasniedza jau 50%, bet 2000. gadā 90% nefroblastomas pacientu [Perlman, 2005]. Līdzīgi arī nieru gaišo šūnu sarkomas gadījumā, uzsākot doksorubicīna pielietošanu, ķīmijterapijas protokolus, pacientu piecu gadu dzīvildze ir pieaugusi no 20% līdz 70% [Argani et al., 2000], kamēr nieru rabdoīdā tumora gadījumā joprojām saglabājas slikta prognoze, jo 80% šo audzēju gadījumu pacienti mirst pirmo divu gadu laikā pēc diagnozes noteikšanas [van den Heuvel-Eibrink et al., 2011]. Uz vispārējo panākumu fona neatbildēts palicis jautājums, kāpēc, neskatoties uz veikto ķīmijterapiju un ķirurģisko ārstēšanu, daļai no nefroblastomas pacientiem saglabājas nemainīgi slikta prognoze un vēl joprojām līdz pat 15% slimnieku mirst pirmajos piecos gados pēc diagnozes noteikšanas [Malik et al., 2001]. Diskusijas rada arī novērotā dažādā audzēju reaktivitāte uz izdarīto ķīmijterapiju. Lai gan lielākajā daļā nefroblastomas gadījumu aprakstīta terapijas izraisīta audzēja lieluma samazināšanās, nobriedušo un nobriedušo histoloģisko elementu proporcionālās attiecības izmaiņas par labu nobriedušajiem elementiem un, pret ķīmijterapiju jūtīgāko histoloģisko elementu nekroze, ir konstatēta arī pretēja reakcijas [Zuppan et al., 1991], un tiek izteikts

viedoklis, ka nefroblastomas blastematozais komponents iespējams sastāv no divu tipu šūnām ar dažādu reaktivitāti uz izdarīto terapiju [Barocca, 2010]. Ņemot vērā iepriekš rakstīto, arī pašlaik visā pasaulē tiek turpināta bērnu vecuma nieru jaunveidojumu, galvenokārt, nefroblastomas pētniecība galveno uzsvaru liekot uz molekulāri ģenētiskās patoloģijas, potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru un ķīmijterapijas izraisīto audzēja izmaiņu izpēti un šobrīd ir aprakstīta virkne marķieru, kuru imūnhistoķīmiskās ekspresijas pakāpei varētu būt saistība ar pacientu prognozi [Ghanem et al., 2005].

Analizējot literatūras datus, redzams, ka fundamentāli pētījumi pediatriko nieru audzēju izpētē tiek veikti galvenokārt NWTSG un SIOP multinacionālo izpētes grupu ietvaros, atsevišķas pētnieciskās grupas ir Itālijā, Lielbritānijā un Brazīlijā [Tamaro, 1997], tāpat bērnu nieru jaunveidojumu imūnhistoķīmisko profilu pēta kolēģi Polijā [Juszkiewicz et al., 1997; Taran et al., 2008], bet praktiski nav pieejamas publikācijas par pediatriko nieru audzēju morfoloģisko spektru un imūnhistoķīmisko atradni šīs patoloģijas gadījumā Baltijas valstīs. Atsevišķi vietējas nozīmes pētījumi ir veikti Lietuvā [Jankauskiene et al., 2009]. Latvijā neliela daļa no izvirzītajām problēmām ir skarta vairākos RSU studentu zinātniskajos darbos [Keiša u.c., 2003; Monkeviča u. c., 2011]. Vispārēju ieskatu bērnu vecuma uroģenitālās sistēmas audzēju klasifikācijā sniedz Latvijā iznākusi monogrāfija „Bērnu uroloģija” [Dobelis, 2003] un grāmata „Bērnu ķirurģija” [Krasts, 2005] prof. A. Pētersona redakcijā. Latvijā pediatriko nieru jaunveidojumu diagnostika un ārstēšana koncentrēta galvenokārt Bērnu Klīniskajā Universitātes slimnīcā (BKUS). Audzēju histoloģiskā diagnostika, kā arī autopsijas materiāla izmeklēšana pacienta nāves gadījumā notiek BKUS Bērnu Patoloģijas birojā, kur sākot no 2004. gada praktiskajā darbā ir ieviesta arī imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas metode, bet pagaidām nav veikta primāro un metastātisko pediatriko nieru jaunveidojumu sastopamības, to morfoloģiskā spektra un pavadošās ģenētiskās patoloģijas, kā arī klīnisko, morfoloģisko un imūnhistoķīmisko datu saistības analīze, kas varētu dot būtisku ieguldījumu bērnu vecuma nieru audzēju pētniecībā. Tā kā imūnhistoķīmiskā izmeklēšana uzsākta salīdzinoši nesen, pagaidām BKUS nav pilnīgi precīzi izstrādātas šo audzēju izmeklēšanas shēmas. Imūnhistoķīmisko diagnostisko izmeklēšanas shēmu izstrādi apgrūtina arī fakts, ka pasaules literatūras dati par pediatriko nieru audzēju imūnhistoķīmisko reaktivitāti ir pretrunīgi. Liela daļa autoru atzīmē, ka nefroblastiskajiem audzējiem nav noteikta imunofenotipa [Coffin et al., 2006] Visi iepriekšminētie fakti nosaka izvēlētais promocijas darba tēmas aktualitāti, fundamentālo nozīmi un praktisko vērtību.

2. Darba mērķis

Veikt Latvijas bērnu nieru jaunveidojumu morfoloģiskā spektra izpēti un raksturot potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresiju nefroblastomas gadījumā atkarībā no klīniskajiem un morfoloģiskajiem rādītājiem, kā arī ģenētisko patoloģiju šo audzēju gadījumā.

3. Darba uzdevumi

1. Noteikt Latvijas bērnu nieru jaunveidojumu morfoloģisko spektru izmantojot BKUS Patoloģijas biroja arhīva histoloģisko atbilžu datus un pediatriko nieru audzēju biopsiju un operāciju materiāla atkārtotas diagnostiskās histoloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultātus.

2. Noteikt WT1, p16^{INK4a}, CD34, p53, Ki67, CKAE1/AE3, CD44, e-kadherīna marķieru imūnhistoķīmiskās ekspresijas savstarpējo saistību un saistību ar audzēja stadiju, histoloģisko tipu, histoloģisko malignitātes pakāpi, audzēja progresiju, slimības iznākumu un pirmsoperācijas periodā izdarīto ķīmijterapiju diagnosticēto nefroblastomu gadījumos.

3. Izstrādāt rekomendācijas imūnhistoķīmiskās diagnostikas veikšanai atbilstoši pētījumā iegūtajiem datiem.

4. Noteikt 9p21 hromosomas segmentā esošā audzēja nomācēja gēna CDKN2A/p16^{INK4a} izmaiņas nefroblastomas gadījumā salīdzinot ar veselajiem pacientiem.

5. Veikt audzēja nomācēja gēna CDKN2A/p16^{INK4a} izmaiņu un gēna kodētā proteīna p16^{INK4a} imūnhistoķīmiskās ekspresijas saistības analīzi.

4. Pētījuma hipotēzes

1. Latvijas bērnu nieru audzēju morfoloģiskais spektrs var atšķirties no citos pasaules reģionos iegūtajiem datiem.

2. Imūnhistoķīmiskajai izmeklēšanai ir būtiska nozīme bērnu nieru audzēju diagnostikā

3. Pastāv statistiski nozīmīga saistība starp WT1 proteīna, p16^{INK4a}, CD34, p53, Ki67, CKAE1/AE3, CD44, e-kadherīna imūnhistoķīmisko ekspresiju un nefroblastomas malignitātes potenciālu.

4. Nefroblastomas ģenētiskā būtiska loma ir 9p21 hromosomas segmentā lokalizētā audzēja nomācēja gēna CDKN2A/p16^{INK4a} izmaiņām.

5. Darba zinātniskā novitāte

1. Pirmoreiz apkopot dati par bērnu nieru audzēju morfoloģisko spektru Latvijā, tas arī ir pirmais šāda veida pētījums Baltijas valstīs.

2. Pirmoreiz noteikts plašs potenciāli prognostiski nozīmīgo imūnhistoķīmisko marķieru spektrs nefroblastomas gadījumā, analizēta visu šo marķieru ekspresijas savstarpējā saistība, kā arī tās saistība ar klīniskajiem un histopatoloģiskajiem rādītājiem.

3. Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16^{INK4a} pētniecība nefroblastomas audos uzskatāma par novitāti, starptautiski citējamās medicīnas izdevumos atrodamas tikai nedaudzas šai tēmai veltītas publikācijas.

6. Darba praktiskā nozīme

1. Iegūtie dati ir nozīmīgi nefroblastomas molekulāro izmaiņu, kā arī prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru izpētē un var tikt izmantoti kā bāze turpmākos starptautiskos pētījumos.

2. Pamatojoties uz imūnhistoķīmiski verificēto pediatriko nieru audzēju morfoloģiskā spektra analīzi ir izstrādātas praktiskas rekomendācijas histoloģijas laboratorijas darba organizācijā blastematoza tipa nefroblastomas, nieres rabdoīda tumora un mezenhimālas ģenēzes pediatriko nieru audzēju diagnostikā.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Pediatriko nieru audzēju vispārējs epidemioloģisks, morfoloģisks, imūnhistoķīmiskais un ģenētiskais raksturojums

1.1.1. Histoloģiskā klasifikācija

Bērniem līdz piecpadsmit gadu vecumam ir iespējama praktiski visu Pasaules Veselības organizācijas (PVO) klasifikācijā iekļauto nieru audzēju histoloģisko tipu attīstība un ir sastopami gan morfoloģiski labdabīgi nieru jaunveidojumi kā mezoblastiska nefroma gan ļaundabīgi nieru audzēji. Lielākā daļa no pediatrikajiem jaunveidojumiem, piemēram, nefroblastoma vai nieres gaišo šūnu sarkoma ir specifiski tieši bērnu vecumam un tikai ļoti retos gadījumos tiek konstatēti pieaugušajiem. Atsevišķi bērniem sastopamie nieru audzēji histoloģiski ir identiski analoģiskiem veidojumiem pieaugušo vecumā [Sebire et al., 2010]. PVO klasifikācija veidota balstoties uz audzēju histoģenēzi, tajā atsevišķā sadaļā ir iekļauti nefroblastiskie audzēji. Nieru gaišo šūnu sarkoma, rabdoīds nieru audzējs un mezoblastiska nefroma iekļauti mezenhimālas ģenēzes audzēju sadaļā, bet netiek apskatīti bērnu vecuma nieru audzēji kā kopēja grupa. Ņemot vērā to, ka 90% no bērnu vecumam raksturīgajiem nieru audzējiem veido ne-epiteliālas ģenēzes veidojumi, pēc Starptautiskās bērnu vecuma ļaundabīgo audzēju klasifikācijas (International Classification for Childhood Cancers Group VI of renal Cancers) visas ļaundabīgās pediatrikās nieru neoplāzijas iedalāmas trijās apakšgrupās:

- 1) Nefroblastoma (Vilmsa audzējs) un citi ne-epiteliālas ģenēzes audzēji kā nieru rabdoīds audzējs, nieru sarkomas un primitīvs neiroektodermāls audzējs (PNET),
- 2) renāla karcinoma (nieru šūnu vēzis),
- 3) citi ļaundabīgi audzēji. [Steliarova- Foutcher et al., 2005].

Atsevišķi autori [Tytgat et al., 2008; Perlman, 2005] sniedz arī detalizētu pediatriko nieru jaunveidumu histoģenētisku klasifikāciju, pēc kuru apkopojuma visus bērnu vecuma nieru audzējus var iedalīt sekojoši:

I. Nefroblastiski audzēji:

- 1) nefroblastoma (Vilmsa audzējs):
 - a) labvēlīga (favourable) histoloģiskā atradne,
 - b) difūza vai fokāla anaplāzija,
- 2) nefroblastomatoze un nefrogēni atlikumi,
- 3) cistiska nefroma un cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma,
- 4) metanefrītiski audzēji,
 - a) metanefrītiska adenoma,
 - b) metanefrītiska adenofibroma,
 - c) metanefrītisks stromāls audzējs.

II. Mezoblastiska nefroma:

- 1) klasiska mezoblastiska nefroma,
- 2) celullāra mezoblastiska nefroma,
- 3) jaukta mezoblastiska nefroma.

- III. Nieres gaišo šūnu sarkoma.
 - IV. Nieres rabdoīds audzējs.
 - V. Epiteliālie bērnu vecuma audzēji:
 - 1) nieres gaišo šūnu vēzis:
 - a) nieres gaišo šūnu vēzis saistīts ar Xp11.2 (TFE3) translokāciju,
 - b) ar citām hromosomu translokācijām saistīts nieres gaišo šūnu vēzis,
 - c) konvencionāls nieres gaišo šūnu vēzis,
 - 2) papillārs nieres šūnu vēzis,
 - 3) medullārs nieres šūnu vēzis,
 - 4) onkocītiska nieru neoplāzija pēc neuroblastomas,
 - 5) pārejas tipa šūnu vēzis,
 - 6) nieru šūnu adenomas,
 - 7) citi nieru šūnu audzēji.
 - VI. Neuroepiteliālie nieres audzēji:
 - 1) nieres neuroblastoma,
 - 2) nieres PNET,
 - 3) nieres karcinoīds,
 - VII. Nieres limfoma.
 - VIII. Jauktas histoģenēzes sarkomas (bez blastēmas šūnu un/vai epiteliālā komponenta atradnes piecu dažādu audu bloku histoloģiskajā materiālā).
 - IX. Citi audzēji-virsnieru audzēji, teratomas, sinoviāla sarkoma
- Savukārt pašreizējā, patologu un bērnu onkologu praktiskajā darbā izmantojamā 2001. gadā rediģētā SIOP pediatriko nieru audzēju darba klasifikācija iekļauj tikai nefroblastomu un tās histoloģiskos apakštipus un tādus biežāk sastopamos jaunveidojumus kā mezoblastiska nefroma, nieres rabdoīds audzējs un nieres gaišo šūnu sarkoma, raksturojot to malignitātes pakāpi [Vujanic et al., 2002], tāpēc šo iedalījumu nevar analizēt atrauti no katra tajā aprakstītā veidojuma histoloģiskajiem kritērijiem un tas tiks sniegts atsevišķā sadaļā (sk. nodaļu 1.1.9.).

1.1.2. Nefroblastiskie audzēji

Bērnu vecuma biežākais ļaundabīgais nieru audzējs ir Vilmsa tumors jeb nefroblastoma, kas veido 80 līdz 85% no visiem pediatriiskajiem nieru audzējiem [Eble et al., 2007; Sebire et al., 2010]. Tiek uzskatīts, ka šo audzēju pirmoreiz 1814. gadā aprakstījis Tomass Rance (Thomas F. Rance), taču viņa histoloģiskais apraksts nebija precīzs un varēja tikt attiecināts arī uz citiem nieru jaunveidojumiem [Gupta et al., 2005]. Savukārt vācu ķirurgs un patologs Karls Makss Vilhems Vilmss (sk. 1.1.att.) 1899. gadā savā monogrāfijā „Jaukti nieru audzēji” (Carl Max Wilhelm Wilms „Die Mischgeschwulste der Niere”) sniedza detalizētu bērnu nieru ļaundabīgo jaunveidojumu morfoloģisko raksturojumu, pirmais izdalīja nefroblastomu kā atsevišķu histoloģisku entitāti, kā arī pirmais izteica domu, ka šo audzēju veidojošās šūnas „ir līdzīgas embrija nieres šūnām”. Lai gan Vilmss nebija pirmais, kurš aprakstīja nefroblastomu, viņa monogrāfija tika ļoti daudz citēta līdz praksē ieviesās eponīms Vilmsa audzējs [Coppes-Zantinga et al., 1999].



1.1.att. Karls Makss Vilhelms Vilmss (1867-1918).

Attēls no interneta vietnes <http://www.trueknowledge.com>

Nefroblastoma ir ļaundabīgs embrionāls audzējs, kura izcelsme ir saistīta ar nefrogēnām blastēmas šūnām. Histoloģiski tās morfoloģija ir līdzīga embrionālās nieres struktūrai, bet bieži novērojami dažādi diferenciācijas varianti [Perlman et al., 2004]. Nefroblastomas sastopamība ir viens gadījums uz 8 000 bērniem vecumā līdz 15 gadiem [Breslow et al., 1993]. Visbiežāk tā veidojas bērniem vecumā no 2 līdz 4 gadiem (vidēji zēniem 37 mēnešu vecumā, bet meitenēm 43 mēnešu vecumā), 98% no šiem audzējiem tiek diagnosticēti pacientiem līdz 10 gadu vecumam [Breslow et al., 1988], lai gan ir konstatēti fetālas nefroblastomas gadījumi un audzēja manifestācija jaundzimušajiem līdz 2 mēnešu vecumam [Isaacs, 2008], kā arī nefroblastoma pieaugušo vecumā [Reinhard et al., 2004]. Parasti tās pirmā izpausme ir palpējams veidojums vēdera dobumā, kuru konstatē bērna vecāki vai aprūpētāji. Klīniski var parādīties arī sāpes vēderā, hematūrija un arteriālā hipertensija. Gandrīz visos gadījumos audzējs lokalizējas nierēs, bet literatūrā aprakstītas arī morfoloģiski tipiskas nefroblastomas atradnes ekstrarenāli retroperitoneālajā telpā, jostas-krustu reģionā, sēkliniekos, dzemdē, inguinālajā kanālā un videnē. Pārsvarā audzējs ir unilaterāls un unicentrisks - bet 5% līdz 10% gadījumu ir iespējams sinhrons vai metahrons abu nieru bojājums [Rosai, 2004.], pie tam 90% no multicentriskiem nefroblastomas gadījumiem ir saistīti ar nefrogēno atlikumu atradni [Breslow et al., 2006]. Makroskopiski nefrektomijas materiālā parasti atrod solitāru, labi norobežotu, pelēcīgi dzeltenu, mīkstu veidojumu ar labi izteiktu fibrozu pseidokapsulu, bet, ja audzējā histoloģiski prevalē nobriedis stromālais komponents, tā konsistence var būt arī cieta. Dažos gadījumos konstatē cistisku uzbūvi, savukārt veidojumos, kuri tiek izmeklēti pēc pirmsoperācijas periodā izdarītās ķīmijterapijas atrod plašas nekrozes zonas un asinsizplūdumus. Nefroblastomas iespējamais lielums ir ļoti variabls - no dažiem milimetriem līdz vairākiem centimetriem [Sebire et al., 2010], parasti audzējs diametrs ir lielāks par 5 cm, trešajā daļā gadījumu konstatētais veidojuma diametrs ir lielāks par 10 cm [Eble et al., 2007]. Tās svars vidēji ir 550g [Rosai, 2004]. Histoloģiski nefroblastomai ir raksturīga trifāziska uzbūve, kad veidojums sastāv no trim komponentiem - blastēmas

šūnām, epitēlija un stromas, kas pārstāvētas dažādās proporcijās, bet ir iespējama arī bifāziska vai monofāziska uzbūve. Šajā gadījumā audzēju veido tikai divi vai viens no histoloģiskajiem komponentiem [Perlman et al., 2004]. Blastemālā daļa histoloģiski ir identiska metanefrītiskajai mezenhīmai, kuru normāli var konstatēt nierēs agrīnā embrionālajā periodā. Morfoloģiski šis komponents ir veidots no apaļām vai ovālas formas šūnām ar augstu kodola citoplazmatisko attiecību. Šūnas izvietotas kompakti, konstatē kodolu pārklāšanos un biežas mitozes, dispersu hromatīna izvietojumu kodolā, fokāli iespējama arī šūnu diskohēzija. Jāatzīmē, ka minētās pazīmes ir raksturīgas arī citiem bērnu vecuma „sīko, zilo šūnu audzējiem” kā, piemēram, neuroblastomai, kas var radīt grūtības diferenciālajā diagnostikā. Blastēmas šūnas var būt izvietotas nodulāri, lentveidīgi, un difūzi. Biežāk sastopami un arī vieglāk diagnosticējami ir audzēji ar nodulāru un lentveidīgu blastēmas šūnu izvietojumu. Šajā gadījumā veidojuma audi sastāv no lentveidīgiem vai sferoidāliem anastomozējošiem audzēja šūnu agregātiem, kuri labi norobežoti no apkārt esošajiem stromas elementiem. Difūzam blastēmas šūnu izvietojumam raksturīga agresīva audzēja šūnu invāzija apkārt esošajos saistaudos un asinsvados [Sebire et al., 2010]. Epitēliālais komponents sastāv no sīkām tubulārām struktūrām un cistām, kuras izklātas ar primitīvām cilindriskām vai kubiskām šūnām. Šis komponents var sastāvēt gan no primitīvām, grūti atpazīstamām rozetēm līdzīgām tubulārām struktūrām, kuras dažos gadījumos ir līdzīgas neuroblastomai raksturīgajām Homēra-Vraitā (Homer-Wright) rozetēm gan no labi diferencētiem tubulāriem un papillāriem elementiem, kur atbilst metanefrītiskajiem kanāliņiem [Perlman 2004.; Sebire et al., 2010; Rosai, 2004]. Retāk novērojama glomerulāru struktūru veidošanās. Ir iespējama arī gļotas veidojoša, plakanšūnu un pārejas tipa epitēlija šūnu atradne [Rosai, 2004]. Nefroblastomas stroma visbiežāk sastāv no īrdeniem miksoīdiem vai fibroblastiskiem audiem, bet ir iespējama gludās un šķērsvītrotās muskulatūras, taukaidu, skrimšļaidu un kaulaidu, kā arī gliālo elementu atradne [Eble et al., 2007]. Literatūrā atsevišķi apraksta arī pirmsoperācijas periodā veiktās ķīmijterapijas izraisītās izmaiņas audzēja audos, kuru konstatācija ir svarīga nosakot nefroblastomas histoloģiskos apakštipus saskaņā ar pēdējo SIOP pediatriko nieru audzēju darba klasifikāciju [Vujanic et al., 2002]. Pārsvārā šajā gadījumā konstatējama blastematozā komponenta un neoplastisko epitēliālo struktūru koagulācijas nekroze, fibroze, makrofagāla (makrofāgi ar gaišu, „putainu” citoplazmu) un siderofāgu infiltrācija hipocelulārajos fibrozajos audos. Tā kā uz ķīmijterapiju jutīgākas ir ātri proliferējošās šūnas, kuras veido nefroblastomas epitēliālo un blastematozo komponentu, tad pēc ķīmijterapijas izmeklētajā materiālā histoloģiski prevalē stromālais komponents un makroskopiskā audzēja izmēru samazināšanās stromāla tipa nefroblastomas gadījumā ir neliela [Vujanic et al., 2010; Sebire et al., 2010]. Ķīmijterapija var izraisīt arī visu histoloģisko komponentu nobrieduma pakāpes paaugstināšanos un līdz ar to šķērsvītrotās muskulatūras šūnu daudzuma palielināšanos nefroblastomas stromā [Perlman et al., 2004]. Attiecībā uz prognozi histoloģiski nefroblastomas tiek iedalītas divās grupās - audzēji ar labvēlīgu (angļu val. - favorable) un nelabvēlīgu (angļu val. - unfavorable) histoloģisko atradi. Labvēlīgas histoloģiskās atrades gadījumā, netiek konstatēta audzēja anaplāzija, tā savukārt atrodama nelabvēlīgas histoloģiskās atradnes gadījumā. Audzēja šūnu anaplāziju atrod aptuveni 6% nefroblastomas gadījumu, tā ir

reti pacientiem, kas jaunāki par vienu gadu, bet 80% no anaplastiskajiem audzējiem rodas pacientiem, kas vecāki par 2 gadiem [Eble et al.]. Diagnozes noteikšanai ir svarīgi trīs histoloģiskie kritēriji: 1) audzēja šūnu kodolu izmēri - anaplastiska audzēja gadījumā blastematozā, epiteliālā vai stromālā komponenta šūnu kodoli ir ievērojami palielināti, tie ir vismaz trīs reizes lielāki nekā atbilstošā šūnu tipa kodoli parasti; 2) hiperhromāzijas esamība - anaplastiska audzēja šūnu kodolos ir izteikti hiperhromatiski; 3) mitotisko figūru esamība - anaplastiskai nefroblastomai raksturīgas multipolāras mitotiskas figūras [Rosai, 2004]. Anaplāzijas klīniskā nozīme ir atkarīga no tās izplatības. Ja tā ir fokāla, tad prognoze ir laba, difūzas anaplāzijas atradne saistās ar sliktu audzēja reakciju uz ķīmijterapiju [Eble et al., 2007; Sebire et al., 2010]. Par fokālu anaplāziju runā, ja primārā audzēja materiālā intrarenāli atrod vienu vai nedaudzus norobežotus anaplastisku šūnu rajonus, histoloģiskajā materiālā ir iespējams pilnībā mikroskopiski izmeklēt anaplastisko šūnu rajonu robežas, netiek konstatēti anaplastisko audzēja šūnu kompleksi asinsvadu lūmenā, audzējs ir pilnībā ekscidēts un lielākajā daļa no tā šūnām izteikta kodolu atipija netiek konstatēta [Perlman et al., 2004]. Difūzas anaplāzijas gadījumā atrod multiplus anaplastisku šūnu rajonus primārā audzēja materiālā vai arī anaplastisko šūnu infiltrācija atrodas ārpus primārā audzēja ekstrarenāli [Sebire et al., 2010]. Ja audzējā konstatē tikai kodolu palielināšanos un hiperhromāziju, bez atipisku mitožu atradnes, tad tas tiek klasificēts kā nefroblastoma ar kodolu atipiju (angļu val. - nuclear unrest), kas ir robežstāvoklis starp labvēlīgu un nelabvēlīgu histoloģisko atradni. Gan klīniski, gan patoģenētiski audzējs šajos gadījumos vairāk ir līdzīgs nefroblastomai ar labvēlīgu histoloģisko atradni. [Hill et al., 2003]. Prognostiski nefroblastomas gadījumā ir svarīgi arī vairāki klīniskie parametri. Nozīmīga ir audzēja stadija un malignitātes pakāpe, kas atkarīga no pirms operācijas periodā veiktās ķīmijterapijas esamības un veidojuma histoloģiskā apakštipa (sk. nodaļu 1.1.9.), kā arī pacienta vecums. Pacientiem, kuri ir jaunāki par diviem gadiem, metastāzes ir ievērojami retāk, un viņiem ir arī labāki 5 gadu dzīvildzes rādītāji [Breslow et al., 1978]. Svarīgs rādītājs ir arī audzēja lielums, kuru vislabāk raksturo jau ekscidētā audzēja svars - sevišķi I stadijas tumoru gadījumā. Laba prognoze ir veidojumiem ar svaru mazāku par 550 g [Breslow et al., 1991]. Morfoloģiski nefroblastomas tiek iedalītas vairākos apakštipos atkarībā no audzējā prevalējošā histoloģiskā komponenta. Pašreiz praksē izmantotie kritēriji audzēja histoloģiskā tipa noteikšanai atšķiras no sākotnēji lietotajiem [Beckwith et al., 1978], kuros noteikts, ka audzējs tiek klasificēts kā epiteliāls, blastematozs vai stromāls, ja kāds no minētajiem histoloģiskajiem komponentiem veido 2/3 (66%) vai vairāk no veidojuma apjoma. Pirmie nefroblastomas pētījumi bija bāzēti galvenokārt uz primāras nefrektomijas gadījumiem, savukārt, tagad pirms operācijas plaši tiek izmantota ķīmijterapija, kas rada morfoloģiskās ainas izmaiņas. Līdz ar to bija nepieciešamas arī atbilstošas histoloģisko kritēriju izmaiņas un pašlaik pirmais solis nefroblastomas histoloģiskā tipa noteikšanai ir regresīvo un/vai nekrotisko izmaiņu novērtējums. Atkarībā no prevalējošā saglabātā histoloģiskā komponenta var tikt iedalīti tikai tie audzēji, kuros ir saglabāta un mikroskopiski var tikt izvērtēta vismaz 1/3 vai vairāk no audzēja materiāla. SIOP noteiktie kritēriji nefroblastomas histoloģisko apakštipu noteikšanai ir sekojoši [Vujanic et al., 2002]: 1) epiteliāla tipa nefroblastomas histoloģiskie kritēriji ir: a) saglabāta

vismaz 1/3 vai vairāk no audzēja materiāla, b) 2/3 vai vairāk no saglabātā audzēja morfoloģiski veido epiteliālās struktūras, c) atlikušo audzēja daļu histoloģiski veido stromālais komponents, d) ir iespējama sīku blastēmas šūnu kompleksu atradne, kas aizņem mazāk par 10% no audzēja struktūrām (ja šajā gadījumā konstatēta nodulāra tipa blastematozo šūnu augšana, kas veido vairāk par 10% no veidojuma struktūras, audzējs tiek klasificēts kā jaukta tipa nefroblastoma); 2) stromāla tipa nefroblastomas (ieskaitot fetālu rabdomiomatozu nefroblastomu) histoloģiskie kritēriji ir sekojoši: a) saglabāta vismaz 1/3 vai vairāk no audzēja materiāla, b) 2/3 vai vairāk no saglabātā audzēja morfoloģiski veido stromālie elementi, c) atlikušo audzēja daļu histoloģiski veido epiteliālais komponents, d) ir iespējama sīku blastēmas šūnu kompleksu atradne, kas aizņem mazāk par 10% no audzēja materiāla (ja šajā gadījumā konstatēta nodulāra tipa blastematozo šūnu augšana, kas veido vairāk par 10% no veidojuma struktūrām, audzējs tiek klasificēts kā jaukta tipa nefroblastoma); 3) jaukta tipa nefroblastoma tiek definēta kā audzējs, kurā a) ir saglabāta vismaz 1/3 vai vairāk no audzēja materiāla, b) saglabātie veidojuma audi sastāv vismaz no diviem histoloģiskajiem komponentiem blastemālā un/vai epiteliālā un/vai stromālā komponenta, bet neviens no tiem neaizņem vairāk par 2/3 no veidojuma apjoma; 4) regresīva tipa nefroblastomas histoloģiskie kritēriji ir: a) makroskopiski un multiplu audu bloku materiāla mikroskopiskajā izmeklēšanā konstatēts, ka saglabāta mazāk par 1/3 daļu no audzēja materiāla, b) atlikušajā veidojuma daļā konstatē ķīmijterapijas izraisītas nekrotiskas un regresīvas izmaiņas, c) histoloģiski tiek atrasti arī audzēja epiteliālie, blastematozie un stromas elementi; 5) pilnīgi nekrotizēta nefroblastoma var tikt diagnosticēta ja ne makroskopiski ne multiplu audu bloku materiāla mikroskopiskajā izmeklēšanā saglabāti audzēja audi netiek konstatēti. Nefroblastomas histoloģisko apakštipu noteikšanai izmantojamie SIOP 2001. gadā noteiktie kritēriji ir atspoguļoti tabulā 1.1.

1.1 tabula

Nefroblastomas tipi atkarībā no histoloģiskās struktūras [Vujanic et al., 2010]

Audzēja tips	Histoloģiskie komponenti (%)			Ķīmijterapijas izraisītas izmaiņas (%)
	epitēlijs	stroma	blastēmas šūnas	
pilnībā nekrotizēta	0	0	0	100
regresīva	0-33	0-33	0-33	>66
jaukta	0-65	0-65	0-65	<66
epiteliāla	66-100	0-33	0-10	<66
stromāla	0-33	66-100	0-10	<66
blastemāla	0-33	0-33	66-100	<66

Retos gadījumos nefroblastoma var būt pilnībā veidota no dažāda izmēra, ar epitēliju izklātām cistām, kuras atdalošajās septās histoloģiski var konstatēt sīkus blastēmas šūnu infiltrātus, nenobriedušus stromālus un primitīvus epiteliālus elementus. PVO klasifikācijā šāda tipa audzēji ir iekļauti nefroblastisko audzēju sadaļā kā atsevišķa nozoloģiskā vienība- cistiska, daļēji diferencēta nefroblastoma [Eble, 2004]. Ja histoloģiski šādā materiālā netiek atrasti nefroblastomatozie elementi, veidojums var tikt saukts par cistisku nefromu, bet audzējs nav identisks pieaugušo vecuma cistiskajai nefromai. Cistiska nefroma pieaugušo vecumā ir labdabīgs duālas uzbūves audzējs, kurš

sastāv no saistaudiem un epitēlija un kuram nav saistības ar nefroblastomu vai nefrogēniem atlikumiem. Savukārt cistiska, daļēji diferencēta nefroblastoma un cistiska nefroma maziem bērniem līdz 2 gadu vecumam tiek uzskatīta par vienu entitāti: nefroblastomas variantu ar zemu malignitātes potenciālu bez invazīvas augšanas un tendences metastazēties [Eble et al., 1998]. Literatūrā ir aprakstīts tikai viens cistiskas, daļēji diferencētas nefroblastomas recidīva gadījums, kurš, iespējams, ir bijis saistīts ar nepilnīgu audzēja rezekciju [Joshi et al., 1989]. Pārsvarā šo veidojumu ārstēšana aprobežojas ar ķirurģisku izņemšanu [Luithle et al., 2007]. Saskaņā ar PVO klasifikāciju pie nefroblastiskiem audzējiem pieder arī nefrogēnie atlikumi un nefroblastomatoze [Perlman et al., 2004]. Par nefrogēniem atlikumiem sauc sīkus, persistējošus embrionālo šūnu perēkļus nierēs. Tos atrod aptuveni 1% visu pediatriko autopsiju gadījumu, 35% unilaterāla un vairāk nekā 90% bilaterālas nefroblastomas gadījumu. Nefrogēnie atlikumi tiek uzskatīti par nefroblastomas priekšvēstnešiem [Beckwith, 1993; Beckwith, 1998]. Savukārt termins nefroblastomatoze tiek lietots ja histoloģiski atrod difūzus vai multifokālus nefrogēnos atlikumus. Sastopami divu tipu: perilobārie (PNA) un intralobārie (INA) nefrogēnie atlikumi, starp kuriem konstatētas vairākas strukturālas atšķirības. PNA gadījumā bojājums ir lokalizēts nieres perifērijā, ir labi norobežots un histoloģiski sastāv pārsvarā no blastematozajiem un epiteliālajiem elementiem. INA tipiski ir lokalizēti nieres centrālajā daļā, nav labi norobežoti un histoloģiski tajos konstatē arī stromālos elementus. Morfoloģiskās atšķirības starp PNA un INA atspoguļotas tabulā 1.2.

1.2 tabula

**Perilobāro un intralobāro nefrogēno atlikumu morfoloģiskās atšķirības
[Perlman et al., 2004]**

Pazīme	Perilobārie nefrogēnie atlikumi	Intralobārie nefrogēnie atlikumi
lokālizācija	nieres perifērijā	bez noteiktas lokālizācijas
robežas	labi norobežoti	slikti norobežoti, neregulāras formas
histoloģiskā uzbūve	sastāv pārsvarā no blastēmas šūnām un epiteliālā komponenta, stromālā komponenta klātbūtne niecīga, stroma var būt sklerozēta	sastāv no blastēmas šūnām, epiteliāla un stromāla komponenta, stromālais komponents var būt dominējošais
izplatība nierē	parasti multifokāls bojājums	biežāk unifokāls bojājums

Visbiežāk gan PNA gan INA regresē un rezultātā izveidojas peritubulāra fibroze, bet novēro arī aktīvu proliferatīvu augšanu jeb hiperplastiskus nefrogēnos atlikumus. Atsevišķos gadījumos PNA manifestējas kā difūza perilobāra nefroblastomatoze, kas izraisa izteiktu nieres palielināšanos un tiek uzskatīta par pirmsneoplastisku stāvokli, kura gadījumā tiek pielietota ķīmijterapija [Perlman, 2005].

Imūnhistokīmiski nefroblastomai nav specifiska imunofenotipa. Tipiski blastemālais komponents uzrāda vimentīna pozitivitāti, lielā daļā gadījumu sastopama arī desmīna pozitivitāte. Reakcijas pārejo muskulāro marķieru identifikācijai, kā miogenīns un mioblastus noteicošais proteīns (MyoD1), parasti ir negatīvas blastematozajā daļā,

bet var būt pozitīvas stromālajā daļā rajonos ar skeleta muskulatūras diferenciāciju. Klīniskajā praksē visplašāk izmantotais imūnhistoķīmiskais marķieris nefroblastomas diagnostikā ir Vilmsa audzēja nomācēja gēna (WT1) proteīns. Reakcija ar WT1 lielākajā daļā gadījumu ir difūzi pozitīva audzēja blastematozajā daļā un agrīnas epiteliālas diferenciācijas rajonos, turklāt par diagnostiski nozīmīgu uzskatāma reakcija audzēja šūnu kodolos [Coffin et al., 2006; Sebire et al., 2010]. Jāatzīmē, ka negatīva atradne neizslēdz nefroblastomas diagnozi, jo WT1 pozitivitāte aprakstīta aptuveni 70% gadījumu [Barnaud et al., 1995; Bahrami et al., 2008]. Savukārt pozitīva nukleāra reakcija WT1 antigēna noteikšanai konstatēta arī vairāku citu audzēju, piemēram, desmoplastiska sīko apaļo šūnu audzēja (DSRCT) un serozas olnīcu karcinomas gadījumā [Charles et al., 1997; Goldstein et al., 2002]. Nefroblastomas vairāk diferencētie epiteliālie audi uzrāda pozitīvu reakciju ar citokeratīnu, bet primitīvās nierēs blastēmas šūnās novēro difūzu izteiktu CD56 pozitivitāti [Sebire et al., 2010], pozitīva reakcija CD56 un CD57 antigēnu noteikšanai ir aprakstīta arī audzēja epiteliālās daļas tubulārajās struktūrās [Muir et al., 2001]. Blastēmas šūnās tāpat iespējama fokāla neirospecifiskās enolāzes (NSE) un citokeratīna (CK) ekspresija. Nefroblastomai ar neirālu diferenciāciju konstatē NSE, sinaptofizīna un hromogranīna pozitivitāti [Coffin et al., 2006]. Nukleāra p53 ekspresija ir aprakstīta 75% no anaplastiskas nefroblastomas gadījumiem [Hill et al., 2003].

Parasti nefroblastoma rodas iepriekš veselīgiem bērniem, taču aptuveni 10% no šiem jaunveidojumiem ir saistīti ar iedzimtām attīstības anomālijām, piemēram, hemihipertrofiju, kriptorhismu, hipospādiju un citām iedzimtām urīnceļu un dzimumorgānu attīstības anomālijām. Literatūrā ir aprakstīta arī maģistrālo asinsvadu transpozīcija, aortas stenoze, kambaru starpsienas defekts un mugurkaula attīstības defekti nefroblastomas gadījumā [Narod et al., 1997]. Audzējs var kombinēties arī ar anirīdiju [Green et al., 1993], Perlmana (Perlman) un Simpsona-Golabi-Behmela (Simpson-Golabi-Behmel), Bloma (Bloom) Sotosa (Sotos), Frasiera (Frasier), Klippela-Trenaunai (Klippel-Trenaunay) sindromu un neurofibromatozi [Perlman et al., 2004]. Ir konstatēta arī saistība ar tādiem dismorfiskajiem sindromiem kā WAGR (Vilmsa audzējs, anirīdija, ģenitālā trakta anomālijas un mentāla retardācija) sindroms, Denisa-Draša (Denys-Drash) vai Bekvita-Vīdemana (Beckwith-Wiedeman) sindroms [Coppes et al., 1994]. Pirmajos divos gadījumos nefroblastomas attīstību saista ar WT1 gēna izmaiņām. WT1 jeb Vilmsa audzēja nomācēja gēns ir lokalizēts 11 hromosomas īsā pleca 13 lokusā (11p13), tas kodē multiplas cinka pirkstiņus saturošas transkripcijas faktoru izoformas kam ir svarīga loma normālajā nieru un gonādu attīstības procesā [Haber et al., 1996; Little et al., 1997; Malik et al., 2001]. WT1 gēna mutācijas biežāk konstatē arī bilaterālas nefroblastomas gadījumos [Köhler et al., 1999], ja audzējs kombinējas ar citām urīnceļu un dzimumorgānu attīstības anomālijām [Sakamoto et al., 2001], sporādisku anirīdiju [Grønskov et al., 2001], difūzu nefroblastomatozi otrā nierē [Park et al., 1993] un stromālu audzēja diferenciāciju [Shumacher et al., 1997]. Tomēr jāatzīmē, ka 90% no visiem nefroblastomas gadījumiem manifestējas kā sporādisks (nepārmantots) unifokāls veidojums un šajā gadījumā bialēliska WT1 gēna inaktivācija mutācijas vai delēcijas dēļ konstatējama mazāk par 10% gadījumu [Sebire et al., 2010; Little et al., 1997]. Savukārt unilaterālas nefroblastomas pacientiem, kuriem nav

konstatētas iedzimtas urīnceļu un dzimumorgānu patoloģijas vai dismorfiskie sindromi, WT1 gēna mutācijas konstatē tikai 2% gadījumu [Little et al., 2004]. Otrs Vilmsa audzēja nomācēja gēns jeb WT2 gēns, kura izmaiņas predisponē nefroblastomas attīstību, lokalizēts 11 hromosomas īsā pleca 15 lokusā (11p15), šī lokusa tēva alēles duplikāciju atrod Bekvita-Vīdemana sindroma gadījumā. Starp nefroblastomas pacientiem Bekvita-Vīdemana sindroms satopams aptuveni 1% gadījumu [Breslow et al., 1993] un piektajā daļā gadījumu slimniekiem ar minēto sindromu un nefroblastomu konstatēts bilaterāls nieru bojājums [Porteus et al., 2000]. Ja pacientam nav konstatētas iedzimtas attīstības anomālijas vai ar pārmērīgu augšanu saistīti sindromi, WT2 gēna mutācijas atrod 3% gadījumu. Šiem bērniem biežāk attīstās bilaterālas nefroblastomas, kā arī biežāk tiek konstatēts pārmantots audzējs [Scott et al., 2008]. Biežākie iedzimtie sindromi saistīti ar nefroblastomu raksturoti tabulā 1.3.

1.3 tabula.

Biežākie ar nefroblastomu saistītie iedzimtie sindromi [Coppes et al., 1994]

Sindroms	Raksturīgās fenotipiskās izmaiņas	Bojātais hromosomas lokuss	Ģenētiskās izmaiņas	Vilmsa audzēja sastopamība
WAGR	anīridija, urīnceļu un dzimumorgānu attīstības anomālijas, garīga atpalicība, nefroblastoma	11p13	monoalēliska 11p13 delēcija	>30%
Denisa-Draša sindroms	gonādu disģenēze, nefropātija (difūza mezangiāla skleroze), nefroblastoma	11p13	punktveida WT1 gēna mutācija	>90%
Bekvita-Vīdemana sindroms	makroglossija, organomegālija, hemihipertrofija, neonatāla hiperinsulinēmiska hipoglikēmija, embrionāli audzēji (hepatoblastoma, nefroblastoma, adrenokortikāla karcinoma)	11p15	tēva alēles duplikācija	<5%

Papildus šiem visbiežāk nefroblastomas izcelsmē iesaistītajiem ģenētiskajiem traucējumiem, apraksta arī virkni citu gēnu izmaiņu, kurām var būt nozīme audzēja patoģenēzē. Piemēram, papildus audzēja supresijas vai audzēja progresijas gēni ir konstatēti hromosomā 16q un 1p. Attiecīgo lokusu heterozigotitātes trūkums atrasts attiecīgi no 17% līdz 25% un 11% nefroblastomas gadījumu. Pacientiem ar minētajām izmaiņām bija ievērojami sliktāki 5 gadu dzīvildzes rādītāji, kā arī biežāki nefroblastomas recidīvi [Grundy et al., 2005] un atsevišķi autori uzskata, ka 16q hromosomā var būt lokalizēts trešais Vilmsa audzēja jeb WT3 gēns [Maw et al., 1992; Tay, 1995]. Jaunākajos pētījumos gan kā trešo klīniski nozīmīgāko nefroblastomas izcelsmē iesaistīto gēnu apraksta X hromosomā lokalizēto WTX gēnu, tā mutācijas ir konstatētas aptuveni trešajā daļā nefroblastomas gadījumu [Rivera et al., 2007], taču dati par šo izmaiņu klīnisko nozīmību ir pretrunīgi [Wegert et al., 2009]. Tāpat ir konstatēta 1q25.3 hromosomā lokalizētā gēna CCNA1E amplifikācijas un pārmērīgas

ekspresijas saistība ar paaugstinātu audzēja recidīva risku labvēlīga histoloģiskā tipa nefroblastomas gadījumos [Natrajan et al., 2006]. Heterozigotitātes izzudums 7p21 hromosomā ir aprakstīts gan nefroblastomas, gan, pieaugušajiem satopamā nieru gaišo šūnu vēža gadījumā. Minētajā lokusā lokalizēti divi potenciālie audzēja nomācēja gēni – MEOX2 un SSTDC1 [Blish et al., 2010]. Atsevišķi autori novērojuši 11q23.2 hromosomā lokalizētā, augšanu regulējošā gēna SKCG-1 genoma zaudējumu 38% no izmeklētajiem sporādiskās nefroblastomas gadījumiem [Singh et al., 2006], bet pēdējā laikā kā jauni nefroblastomas ģenētiski iesaistīti gēni aprakstīti FBXW7, kura mutācijas konstatē epiteliāla tipa nefroblastomas gadījumā un MYCN, kura amplifikāciju un genoma pieaugumu konstatē audzēja difūzas anaplāzijas gadījumā [Williams et al., 2010]. Bez iepriekš aprakstītajiem gēniem nefroblastomas gadījumā ir pētītas arī TP53 audzēja nomācēja gēna mutācijas, kuru identifikācija var tikt izmantota audzēja prognozes noteikšanai [Bardeesy et al., 1994; el Bahtimi R et al., 1996], kā arī 9p21 hromosomā lokalizētā audzēju supresora gēna CDKN2A izmaiņas [Natrajan et al., 2008]. TP53 un CDKN2A gēnu bojājuma imūnhistoķīmiskās diagnostikas iespējas un iespējamā saistība ar klīniskajiem datiem sīkāk raksturota literatūras apskata otrajā daļā (sk. nodaļu 1.2.2. un 1.2.4) Neskatoties uz to, ka ir konstatētas daudzas iespējamās nefroblastomas izcelsmē iesaistītās gēnu izmaiņas, pārmantoti audzēja gadījumi sastopami reti. Pozitīva ģimenes anamnēze novērota tikai 2% pacientu un iespēja, ka audzējs attīstīsies pacienta brāļiem vai māsām ir niecīga [Bonaīti-Pellié et al., 1992]. Pārmantotas nefroblastomas gadījumā ir konstatētas divu gēnu FWT1 (lokalizēts 17q12-q21 hromosomā) un FWT2 (lokalizēts 19q13.4 hromosomā) izmaiņas [Ruteshouser et al., 2004].

1.1.3. Rabdoīds nieres audzējs

Rabdoīdie audzēji ir augstas malignitātes pakāpes jaunveidojumi, kuri attīstās pārsvarā bērniem un jauniem cilvēkiem. Anatomiski visbiežākā šo neoplāziju lokalizācija ir nierēs un centrālā nervu sistēma (CNS), kur to sauc par atipisku teratoīdu/rabdoīdu audzēju [Burger et al., 1998], taču ir aprakstīti arī rabdoīdi audzēji ar primāro lokalizāciju mīkstajos audos [Fanburg-Smith et al., 1998] un aknās [Parham et al., 1988; Trobaugh-Lotrario et al., 2011], kā arī iedzimtas diseminētas formas [White et al., 1999]. Nieres rabdoīds audzējs (NRA) ir reta bērnu vecuma neoplāzija, kura veido ~1,6% līdz 2% no visiem pediatriiskajiem nieru jaunveidojumiem. Pacientu vidējais vecums diagnozes noteikšanas brīdī ir aptuveni 1 gads un aptuveni 80% audzēju tiek diagnosticēti pirmajos divos dzīves gados (incidence šajā vecuma grupā ASV 1.0 gadījums uz miljons iedzīvotājiem) [Argani, 2004]. Ļoti reti NRA ir sastopams bērniem vecākiem par pieciem gadiem, tāpēc tiek rekomendēts rūpīgi izvērtēt rabdoīda nierēs audzēja morfoloģisko diagnozi šajā vecuma grupā [Sebire et al., 2010; Argani, 2004]. Tā kā audzējs ir rets, daudzās valstīs nav noteikta tā sastopamība. Pēdējos SIOP protokolos laika periodā no 1993. gada līdz 2005. gadam pavisam ir reģistrēti 107 NRA gadījumi [van den Heuvel-Eubrink et al., 2011]. Savukārt Vācijā laika periodā no 1984. gada līdz 1999. gadam ir reģistrēti 32 NRA gadījumi, kas iekļauti dažādos nacionālajos

reģistros vai protokolos [Reinhard et al., 2008]. Pirmo reizi nieres rabdoīds audzējs aprakstīts 1978. gadā pirmajā NWTS grupas pētījumā kā nefroblastomas rabdomiosarkomatozs variants [Beckwith et al., 1978]. Vēlāk konstatētais muskulārās diferenciācijas trūkums ir pretrunā ar teoriju par rabdomiosarkomatozu veidojuma ģenēzi un 1981. gadā tiek ieviests termins nieres rabdoīds audzējs [Haas et al., 1981]. Klīniski šis veidojums līdzīgi kā nefroblastoma manifestējas ar palpējamu veidojumu vēdera dobumā, sāpēm, hematūriju un drudzi, taču NRA gadījumā diagnozes brīdī parasti konstatē augstu audzēja stadiju. 75% no gadījumiem pirmreizēji manifestējas kā trešās vai augstākas stadijas bojājums [Amar et al., 2001]. Klīniski ir aprakstīta arī paraneoplastiska hiperkalciēmija [Mayes et al., 1984] un aptuveni 15% NRA pacientiem atrod galvas smadzeņu mugurējās bedres audzēju, kurš histoloģiski visbiežāk atbilst PNET [Fort et al., 1994]. Nieru rabdoīda audzēja histoģenēze vēl joprojām ir neskaidra, visticamāk šķiet, ka tā izcelsme saistīta ar nieru medullārās daļas primitīvajām šūnām [Rosai, 2004]. Literatūrā ir aprakstītas dažādas histoģenēzes teorijas - ir iespējama miogēna, neuroektodremāla, histiocītiska, epiteliāla, mezenhimāla un jaukta mezenhimāli/epiteliāla diferenciācija [Keiserling et al., 1996; Tsokos et al., 1989; Gonzales-Crussi et al., 1982]. Makroskopiski audzējs parasti ir ļoti liels. Raksturīgas ir hemorāģijas un nekrozes jaunveidojuma audos, kā arī neskaidras robežas, kas liecina par procesa invazīvo raksturu. Mikroskopiski NRA ir audzējs ar izteiktu celullaritāti, tā šūnām raksturīga citoloģiskā triāde: lieli vezikulāri apaļi vai ovāli kodoli, prominenti, centrāli novietoti, tumši sarkani kodoliņi un hialīnam līdzīgi sārti citoplazmas ieslēgumi. Ultrastrukturāli netiek konstatēta rabdomiomatoza diferenciācija, citoplazmas ieslēgumus veido 6-9 nm biezu, koncentriski izvietotu intracellulāru filamentu pinums, kuram nav saistības ar šūnas membrānu [Haas et al., 1981]. Bieži novērojamas mitozes, kā arī izteikta audzēja šūnu invāzija asinsvados un infiltrācija starp saglabātajiem nefroniem. [Argani, 2004]. Jāatzīmē, ka ir iespējamās plašās histoloģiskās ainas variācijas, kas apgrūtina morfoloģisko diagnostiku, jo pastāv sekojoši histoloģiskie apakštipi: klasiskais, sklerotiskais (fibrotiskais, osteosarkomatozais, hondroīdais), epiteloīdais (trabekulārais mukoīdais, alveolārais, pseudoglandulārais), vārpstveida šūnu (kūlīšveida, miksoīdais, hemipericitomatozais, virpuļveida, palisādveida), limfomatoīdais (solīdais, histiocīdais), vaskulārais (līdzīgs nieru gaišo šūnu sarkomai, organoīdais), pseudopapilārais un cistiskais [Weeks et al., 1989]. Tā kā NRA gadījumā veidojuma šūnas ir polifenotipiskas, imūnhistoķīmiskā izmeklēšana pierāda to epiteliālu, mezenhimālu un neironālu diferenciāciju, līdz ar to diferenciālā diagnostika ir apgrūtināta. Parasti šī audzēja gadījumā novēro vimentīna un vismaz viena epiteliālā marķiera (citokeratīna vai EMA) ekspresiju. Jādomā, ka kopējā mezenhimālo un epiteliālo marķieru ekspresija ir saistīta ar intracellulāro filamentu ultrastrukturālo uzbūvi. Imūnhistoķīmiskajos un uz Western blot reakciju balstītos pētījumos konstatēts, ka tie sastāv no diviem atšķirīgiem proteīniem: vimentīna, kas ir specifisks mezenhimāls antigēns, un citokeratīna (54 kd), kurš atrodams epitēlija šūnās [Vogel et al., 1984]. Literatūrā ir aprakstīta arī variabla neuroektodermālo marķieru (NSE, sinaptofizīns un neurofilamenti), mezenhimālo marķieru (muskulu specifiskais aktīns, gludai muskulatūrai specifiskais aktīns), kā arī S100, CD99, gliāla fibrilāra acidiska proteīna (GFAP) un karcinoembrioniskā antigēna (CEA) pozitivitāte. Savukārt

reakcijas miogenīna, mioglobīna, melanomas marķiera (HMB-45), hromogranīna un CD34 antigēnu noteikšanai parasti ir negatīvas [Coffin et al., 2006]. Lai gan NRA vēsturiski ir iekļauts NWTs terapijas protokolos, šis audzējs ir izdalīts kā atsevišķa entitāte. Tas ir viena no visvairāk agresīvākajām patoloģijām bērnu onkoloģijā. Atšķirībā no nefroblastomas, nieru rabdoīdam audzējam ir raksturīga agrīna lokālo un attālāko metastāžu rašanās un rezistence pret ķīmijterapiju. Kamēr piecu gadu dzīvildze nefroblastomas gadījumā sasniedz 90%, piecu gadu dzīvildze NRA gadījumā ir tikai 20-25% [Weeks et al., 1989] un pacienti mirst vidēji 12 mēnešus pēc diagnozes noteikšanas. [Weeks et al., 1989; van den Heuvel-Eubrink et al., 2011]. Molekulārā līmenī rabdoīdiem audzējiem raksturīga 22 hromosomas garajā plecā (22q11.2) lokalizētā audzēja supresora gēna hSNF5/INI1 (SMARCB1) bialēliska inaktivācija, kuru var izraisīt 22 hromosomas monosomija, 22q11.2 lokusa delēcija, hromosomu translokācijas ar 22q11.2 lokusa iesaistīšanos, kā arī hSNF5/INI1 gēna mutācijas [Biegel et al., 2000; Sévenet et al., 1999], pie tam minētā gēna izmaiņas raksturīgas ne tikai sporādisku, bet arī pārmantotu renālu un ekstrarenālu rabdoīdu audzēju gadījumos [Sévenet et al., 1999; Taylor et al., 2000]. Minētais gēns kodē hromatīna pārveidē iesaistītu proteīnu un ir domājams, ka tas nosaka DNS transkripcijas faktoru pieejamību. Pastāv uzskats, ka hSNF5/INI1 gēna inaktivācijas gadījumā izmainītā gēnu ekspresija ietekmē hromatīna struktūru un tādejādi veicina ļaundabīgu audzēju rašanos [Argani, 2004]. Imūnhistoķīmiski šie ģenētiskie traucējumi izpaužas kā INI1 proteīna ekspresijas iztrūkums, kas var kalpot kā svarīga diferenciāldiagnostiska pazīme [Perry et al., 2005]. Pašlaik komerciālām vajadzībām tiek ražota un patologu praksē ir pieejama antivielu INI1 proteīna noteikšanai. Lietojot minēto antivielu rabdoīda audzēja neskartos audos t. skaitā endotēlija šūnās un limfocītos konstatējama izteikta pozitīva nukleāra reakcija, ko var lietot arī kā iekšēju kontroli reakcijas kvalitātes izvērtēšanai. Savukārt nieru vai mīksto audu rabdoīda un atipiska teratoīda/rabdoīda audzēja gadījumā atšķirībā no citiem pediatriiskajiem mīksto audu un CNS audzējiem reakcija INI1 proteīna noteikšanai šūnu kodolos ir negatīva [Judkins et al., 2004; Hoot et al., 2004].

1.1.4. Nieru gaišo šūnu sarkoma

Nieru gaišo šūnu sarkoma (NGŠS) ir reti sastopams, augstas malignitātes pakāpes bērnu vecuma ļaundabīgs nieru audzējs, kurš veido ~ 3% līdz 5% no visiem pediatrijā sastopamajiem nieru jaunveidojumiem. Lai gan kopējais NGŠS gadījumu skaits ir neliels, tas ir otrs visbiežākais pediatriiskais nieru audzējs tūlīt pēc nefroblastomas [Argani et al., 2000; Gooskens et al., 2012]. Visbiežāk šis jaunveidojums manifestējas otrajā dzīves gadā. Vidējais vecums, kurā tiek atklāta NGŠS ir 36 mēneši, ļoti reti tas tiek konstatēts pirms 6 mēnešu vecuma, kā arī pieaugušajiem [Gooskens et al., 2012]. Pēc otrā dzīves gada nieru gaišo šūnu sarkomas sastopamība samazinās pieaugot pacienta vecumam [Perlman, 2007]. Literatūrā tomēr ir aprakstīti atsevišķi gadījumi jaundzimušajiem [Mazzolini et al., 2003; Isaacs, 2008], pusaudžiem un pieaugušo vecumā [Armin et al., 1999]. Vecākais konstatētais NGŠS

pacients ir 58 gadus vecs [Adnani et al., 2006], savukārt jaunākais ir 31. gestācijas nedēļā antenatāli bojā gājis auglis [Hung, 2005]. Lai gan zēni slimo gandrīz divas reizes biežāk nekā meitenes, NGŠS nav saistīta ar noteiktām iedzimtām patoloģijām, tai skaitā nefroblastomu pavadošajiem sindromiem. Tāpat šī audzēja gadījumā parasti netiek konstatēta embrionālo struktūru persistence nierē [Argani, 2004; Perlman, 2007]. Sākotnēji nieru gaišo šūnu sarkoma tika uzskatīta par nefroblastomas anaplastisku variantu. Doma par to, ka eksistē vēl viens, no nefroblastomas atšķirīgs bērnu ļaundabīgs nieru audzējs pirmoreiz izteikta 1970. gadā [Kidd, 1970], bet 1978. gadā vienlaicīgi trīs publikācijās tika raksturotas nieru gaišo šūnu sarkomas klīniskās un histopatoloģiskās pazīmes. Minētajos aprakstos NGŠS tiek raksturota kā sarkomatozs audzējs, kura izcelsme nav saistīta ar epitēliju, ar sliktu klīnisko prognozi un tendenci metastazēties kaulos [Beckwith et al., 1978; Morgan et al., 1978; Marsden et al., 1978]. 1978. gadā Bekvits un Palmers [Beckwith et al., 1978], pamatojoties uz raksturīgo histoloģisko ainu, pirmo reizi arī ieteica lietot nosaukumu „gaišo šūnu sarkoma”. Klīniskā aina ir līdzīga kā citu, iepriekš aprakstīto pediatriko nieru audzēju gadījumā. Nieru gaišo šūnu sarkoma visbiežāk manifestējas ar palpējamu veidojumu vēdera dobumā, hematūriju, sāpēm, drudzi un arteriālo hipertensiju. Klīniski pirmā NGŠS izpausme var būt arī metastāzes kaulos un ar tām saistītās sāpes [Hempel et al., 2003]. 5% gadījumu pirmo reizi diagnosticējot primāro audzēju jau tiek konstatēts metastātisks process visbiežāk limfmezglos (59% no gadījumiem), kaulos (13%), plaušās (10%), aknās (9%). Kopumā metastāzes attīstās 20- 40% gadījumu [Gooskens et al., 2012]. Interesanti, ka 20% gadījumu vēlīnās metastāzes rodas vairāk nekā trīs gadus pēc diagnozes noteikšanas. Salīdzinoši nefroblastomas gadījumā vairāk nekā 90% gadījumu tās konstatē divu gadu laikā pēc diagnozes noteikšanas [Argani et al., 2000]. Bez iepriekš minētajiem orgāniem samērā bieži nieru gaišo šūnu sarkomas metastāzes novēro arī galvas smadzenēs. Pēc atsevišķu autoru sniegtajiem datiem tās pat ir biežākas nekā kaulos [Furtwängler et al., 2005]. Jāsaka gan, ka pašlaik, pēc doksorubicīna pievienošanas ķīmijterapijas shēmās, nieru gaišo šūnu sarkomas prognoze ir uzlabojusies un piecu gadu dzīvildze pēc diagnozes noteikšanas sasniedz 70% agrāko 20% vietā [Argani, 2004]. Audzēja histogēnēze joprojām nav līdz galam skaidra. NGŠS izcelsme var tikt saistīta ar nieru medullārā slāņa intersticiālajām šūnām vai primitīvām mezenhimālām šūnām [Haas et al., 1984]. Makroskopiski veidojums vienmēr ir unicentriskis un saistīts ar nieru medullāro daļu. Literatūrā nav aprakstīti multicentriski NGŠS gadījumi. Raksturīgs ir liels audzēja izmērs: vidējais literatūrā aprakstītais diametrs NGŠS gadījumā ir 11 cm (diapazons no 2,3 līdz 24 cm), vidējais svars 661 g (diapazons no 43,5 līdz 1950 g) [Argani et al., 2000]. Griezumā parasti tiek konstatēta mīksta līdz mukoīda audu konsistence. Praktiski vienmēr atrod arī cistiskas izmaiņas, kuras var būt tik izteiktas, ka radioloģiski un makroskopiski audzējs ir līdzīgs cistiskai nefromai. Lai gan makroskopiski audzējs šķiet labi norobežots, mikroskopiski raksturīga atipisko šūnu infiltrācija apkārtējos audos. Histoloģiski klasisku NGŠS veido nodulāri vai lentveidīgi šūnu kompleksi, kurus vienu no otra atdala fibrovaskulāras septas. Kompleksus veidojošās šūnas parasti ir vārpstveida vai epiteloīdas uzbūves. To kodoli ir apaļi vai ovāli bez izteikta kodoliņa, mitotiskās figūras sastopamas reti. Šūnas vienu no otras atdala ekstracelulārs miksoīds materiāls, kurš vizuāli atgādina gaišu

citoplazmu. Literatūrā aprakstītas NGŠS raksturīgās divu veidu fibrovaskulārās septas. Vienā gadījumā tās var būt plānas un sastāvēt no regulāri sazarota kapilāru tīkla, otrā - sabiezētas un veidotas no fibroblastiem, kuri proliferē ap centrāli novietotu kapilāru [Argani, 2004]. Bez jau minētā klasiskā audzēja varianta pastāv sekojoši audzēja histoloģiskie tipi: miksoīds, sklerozējošs, cellulārs, epiteloīds, palisādveida, virpuļveida, vārpstveida šūnu un anaplastisks. 91% no gadījumiem mikroskopiski veidojuma audos tiek konstatētas vairāku histoloģisko tipu morfoloģiskās pazīmes. Visbiežākais ir klasiskais audzēja variants, tā histoloģiskās pazīmes vismaz fokāli tiek konstatētas vairāk nekā 90% no NGŠS gadījumiem. Miksoīds tips satopams 50%, sklerozējošs 35%, cellulārs 26%, epiteloīds 3%, palisādveida 11%, vārpstveida šūnu 7%, virpuļveida 4% un anaplastisks 3% gadījumu. Mikroskopiski miksoīdam tipam ir raksturīga ļoti plaša acelullāra, mukopolisaharīdus saturoša matrkisa veidošanās starpsūnu telpā un cistiskas izmaiņas. Savukārt celullāra tipa nieru gaišo šūnu sarkomas audos starpsūnu matrkisa daudzums ir neliels. Histoloģiski šis audzēja variants ir līdzīga citiem pediatrikajiem „sīko, zilo šūnu audzējiem”, t. sk. blastematozai nefroblastomai un PNET. Tāpat diagnostiskas grūtības pastāv diferencējot nefroblastomas epiteliālo un NGŠS epiteloīdo (iespējams trabekulārs vai pseidoacinārs variants) tipu. Sklerozējoša audzēja gadījumā novēro izteiktu kolagenizāciju, kolagenizētie audi var atgādināt osteoīdu. Palisādveida šūnu izvietojumam raksturīgs paralēls šūnu kodolu izvietojums atstājot no kodoliem brīvas zonas, līdz ar to histoloģiskā aina ir līdzīga švannomai. Vārpstveida šūnu, kā arī virpuļveida un palisādveida šūnu izvietojuma gadījumā pastāv diferenciālā diagnoze starp nieru gaišo šūnu sarkomu un mīksto audu ļaundabīgajiem audzējiem [Argani et al., 2000]. Imūnhistoķīmiskās izmeklēšana var palīdzēt NGŠS diagnostikā, taču diagnoze pirmkārt pamatojas uz precīzu hematoksilīna eozīna (H&E) preparātos konstatētās ainas interpretāciju un citu pediatriko „sīko zilo šūnu audzēju” imūnhistoķīmisku izslēgšanu, jo tikai nieru gaišo šūnu sarkomai raksturīgi marķieri nav konstatēti. Reakcija CD34, S100, desmīna, CD99, citokeratīna, EMA un WT1 noteikšanai audzēja šūnās ir negatīva [Argani et al., 2000; Shao et al., 2004]. Daļa autoru atzīmē tikai nespecifisku vimentīna pozitivitāti NGŠS šūnās [Gooskens et al., 2012; Liu et al., 2006; Rosai, 2004], savukārt atsevišķās publikācijās ir atzīmēta arī variabla bcl-2 pozitivitāte [Argani 2004, Shao et al., 2004; Sebire, 2009].

Kā jau iepriekš teikts, nieru gaišo šūnu sarkomas gadījumā nav konstatēta saistība ar iedzimtām patoloģijām, kā arī nav konstatēti pārmantoti audzēja gadījumi [Gooskens et al., 2012]. Literatūrā ir aprakstītas vairākas hromosomu translokācijas un citi ģenētiski traucējumi NGŠS pacientiem, taču šo izmaiņu molekulāri bioloģiskā nozīme vēl joprojām nav labi saprotama. Visbiežākās publikācijās pieminētās, nieru gaišo šūnu sarkomas gadījumā sastopamās translokācijas ir t(10;17)(q22;p13) un t(10;17)(q11;p12) [Brownlee et al., 2007]. Minēto izmaiņu gadījumā, NGŠS patoģenēzē varētu tikt iesaistīti vairāki gēni tai skaitā 17p13 lokusā lokalizētais TP53 audzēju nomācēja gēns. Arī imunohistoķīmiskos pētījumos atsevišķi autori konstatē šī gēna produkta p53 proteīna pastiprinātu ekspresiju atsevišķos anaplastiska audzēja gadījumos [Argani et al., 2000; Cheah et al., 1996]. Tomēr jaunāki dati vairāk liecina par to, ka TP53 gēna mutācijām nav nozīmes nieru gaišo šūnu sarkomas ģenēzē [Brownlee et al., 2002; Hsueh et al., 2002].

1.1.5. Mezoblastiska nefroma

PVO klasifikācijā mezoblastiska nefroma (MN) ir definēta kā nieru un renālā sinusa zemas malignitātes pakāpes fibroblastiska sarkoma [Argani et al., 2004]. Publikācijās visbiežāk sastopams viedoklis, ka MN kopumā ir labdabīgs audzējs, kura ārstēšana var aprobežoties ķirurģisku izņemšanu. Izņēmums ir tikai atsevišķi celullāras mezoblastiskas nefromas gadījumi [Isaac, 2008; Furtwaengler et al., 2006]. MN veido aptuveni 2% līdz 5% no visiem pediatrikajiem nieru audzējiem, taču tas ir visbiežākais iedzimtais nieru audzējs [Argani et al., 2004, Furtwaengler et al., 2006]. 90% gadījumu tas manifestējas pirmajā dzīves gadā [Sebire et al., 2009]. Vidējais pacienta vecums veidojuma diagnostikas brīdī ir divi mēneši. Atsevišķi autori uzskata, ka iepriekš aprakstītie MN gadījumi pacientiem vecākiem par diviem gadiem klasificējami kā metanefrītisks stromāls audzējs vai cistiska hamartoma [Perlman, 2007]. Literatūrā mezoblastisku nefromu pirmo reizi aprakstīja amerikāņu patologs Roberts P. Bolande 1967. gadā savā publikācijā raksturojot klasiskas MN histoloģisko ainu [Bolande et al., 1967]. Klīniskā visbiežākā šī audzēja manifestācija ir veidojums vēdera dobumā bez izteiktiem klīniskiem sindromiem, lai gan ir iespējama arī hematūrija, arteriālā hipertensija, hiperkalciēmija un pastiprināta renīna sekrēcija. Daļa no mezoblastiskām nefromām tiek diagnosticēta jau prenatālās ultrasonogrāfiskās izmeklēšanas laikā. Grūtniecības laikā MN var izraisīt arī daudzūdeņainību un ģeneralizētu augļa tūsku, kā arī antenātālu bērna nāvi. Makroskopiski mezoblastiska nefroma ir liels veidojums, kas vizuāli būtiski neatšķiras no nefroblastomas. Tā lielums variē robežās no 0,8 līdz 14 cm, vidējais lielums 6,2 cm. Parasti audzējs ietver nieres vārtu rajonu, bieži novēro neoplastisko šūnu infiltrāciju nieres sinusa mīkstajos audos. Makroskopiski bieži atrod arī nekrozes, hemorāģijas un cistu veidošanos. Mikroskopiski mezoblastiskas nefromas ir monomorfās uzbūves neoplāzijas, kuras veido vārpstveida fibroblastiskas vai miofibroblastiskas ģenēzes šūnas. Histoloģiski MN iedala divos galvenajos apakštipos: klasiska mezoblastiska nefroma un celullāra mezoblastiska nefroma. Ja veidojumā atsevišķos audu rajonos atrod klasiskas MN histoloģisko ainu, bet citos celullāras MN ainu, tādu audzēju dēvē par jauktu mezoblastisku nefromu [Perlman, 2007]. Klasiskais variants histoloģiski ir identisks ar fibromatozi, tas sastopams 24% gadījumu. Klasisku MN histoloģiski veido haotiski izvietoti vārpstveida šūnu kūlīši un kolagēna šķiedras. Raksturīga infiltratīva augšana, veidojumam mikroskopiski konstatē neregulāras robežas. Neoplastisko šūnu nevienmērīga kūlīšveida infiltrācija iesniedzas dziļi saglabātajos nieres audos un renālā sinusa mīkstajos audos, līdz ar to starp audzēja audiem histoloģiski var atrast saglabātus nefronus. Minētā aina var radīt grūtības morfoloģiskajā diagnostikā, jo nieres audu elementi var tikt kļūdaini interpretēti kā audzēja sastāvdaļa [Argani et al., 2004; Perlman, 2007]. Šūnu mitotiskā aktivitāte parasti ir zema. Piemēram, atsevišķos pētījumos klasiskas MN gadījumā atrod 0 līdz 1 mitozes, salīdzinoši celullāras MN gadījumā konstatē 25 līdz 30 mitozes 10 augsta palielinājuma redzes laukos [Pettinato et al., 1989]. Celullārais variants histoloģiski ir identisks ar infantīlo fibrosarkomu, tas sastopams 66% gadījumu. Salīdzinoši ar

klasisku MN šim audzējam raksturīga augstāka celullaritāte un lielāka mitotiskā aktivitāte. Iespējamās arī nekrozes zonas un neliels vai mērens kodolu pleiomorfisms. Jaukta mezoblastiska nefroma sastopama 10% gadījumu [Argani et al., 2004]. Imūnhistoķīmiski MN šūnās novēro vimentīna pozitivitāti, dažreiz ir iespējama arī desmīna un aktīna ekspresija. Reakcija citokeratīna noteikšanai parasti ir negatīva [Liu et al., 2006; Argani et al., 2004]. Atsevišķos pētījumos konstatēta arī nukleāra WT1 proteīna ekspresija dažos mezoblastiskas nefromas gadījumos [Abosoudah et al., 2008], savukārt citās publikācijās atzīmē WT1 negativitāti [Shao et al., 2004]. Cellulārajam MN variantam molekulāri ģenētiski raksturīga translokācija (12;15) (p13;q25), kas rada ETV6-NTRK3 gēna saplūšanu. Identiska translokācija ir novērota fibrosarkomas gadījumā, kas varētu liecināt par to, ka cellulārais MN apakštips varētu būt intrarenālas fibrosarkomas (IFS) izpausme [Rubin et al., 1998; Adem et al., 2001]. Klasiskā un jauktā varianta gadījumā nav konstatētas noteiktas ar audzēja izcelsmi saistītas ģenētiskas izmaiņas, lai gan ir aprakstīti atsevišķi 11.hromosomas trisomijas gadījumi, un tēva IGF2 alēles duplikācija [Watanabe et al., 2007]. Ir konstatēti arī atsevišķi ar Bekvita-Vīdemana sindromu un izolētu hemihipertrofiju saistīti gadījumi [Sutherland et al., 1997; Abosoudah et al., 2008].

Kopumā skatoties, pacienta prognoze mezoblastiskas nefromas gadījumā ir laba. Pētījumos, kuros analizēti visi MN gadījumi neatkarīgi no to histoloģiskā tipa piecu gadu dzīvildze pēc diagnozes noteikšanas aprakstīta 96% gadījumu [van den Heuvel-Eibrink et al., 2008]. Savukārt citās publikācijās uzsvērts, ka klasiskā varianta gadījumā pacientu piecu gadu dzīvildze ir 100%, bet cellulārais audzēja variants saistās ar sliktāku prognozi, piecu gadu dzīvildze cellulāras mezoblastiskas nefromas (CMN) gadījumā ir 85%. 5% no pacientiem ar mezoblastisku cellulāru nefromu pirmā gada laikā pēc audzēja izņemšanas attīstās recidīvs pārsvarā gadījumos, ja ķirurģiskā rezekcija veikta nepilnīgi un konstatēti neoplastiskie audi rezekcijas līnijās [Ahmed et al., 2007]. Ir aprakstīti arī atsevišķi metastazēšanās gadījumi plaušās, sirdī un galvas smadzenēs [Heidelberg et al., 1993; Vujančić et al., 1993].

1.1.6. Nieru šūnu vēzis

Nieru šūnu vēzis (NŠV) ir samērā reti sastopams bērnu vecumā, tas veido mazāk nekā 0,1% no visiem pediatrikajiem ļaundabīgajiem audzējiem un aptuveni 2% no nieru jaunveidojumiem [Perlman, 2007]. ASV Nacionālā Vēža institūta veiktajos pētījumos uzsvērts, ka NŠV sastopamība mainās analizējot dažādu vecuma grupu pediatrikos pacientus. Bērniem līdz 15 gadiem nieru šūnu vēzis atrasts 2,6%, pacientiem līdz 20 gadiem 5,4% no visiem nieru audzējiem, bet vecuma grupā no 15 līdz 19 gadiem nieru NŠV konstatēts jau 63% gadījumu [Bernstein et al., 1999]. Pēc Kalifornijas vēža reģistra datiem pacientiem līdz 21 gada vecumam nieru šūnu vēzis konstatēts 4,3% no visiem nieru jaunveidojumiem un pacientu vidējais vecums bija 15 gadi [Silberstein et al., 2009]. Citās publikācijās minētais vidējais pacientu vecums ir no 9 līdz 10 gadiem [Perlman, 2007], taču pētījumos iekļauti arī 18 līdz 36 mēnešus veci pacienti [Indolfi et al., 2003]. Nieru šūnu vēža klīniskās un histopatoloģiskās pazīmes ir

tādas pašas kā analogiskiem veidojumiem pieaugušo vecumā. Tāpat līdzīgi tiek noteiktas arī stadijas un malignitātes pakāpe [Sebire et al., 2009]. Tomēr pēc ģenētiskā un morfoloģiskā sadalījuma NŠV bērniem un pieaugušajiem atšķiras. Tā piemēram, Elizabete Brudere 2004. gadā veiktā pētījumā konstatēja, ka gaišo šūnu karcinoma, kas ir biežākais ļaundabīgais nieru audzējs pieaugušajiem, veido tikai 15% no nieru šūnu vēžiem pacientiem vecuma grupā līdz 22 gadiem. Morfoloģiski biežākā (24%) NŠV grupa bija neklasificēts nieru vēzis. Tas nozīmē, ka audzēju morfoloģija bija netipiska un tie neatbilda nevienam citam PVO klasifikācijā iekļautajam nieru šūnu vēža tipam. 20% gadījumu tika konstatēta ar Xp11.2 translokāciju saistītas karcinomas histoloģiskā aina un nukleāra TFE3 ekspresija. Savukārt Hipela-Lindava (Hippel-Lindau) gēnu mutācijas vai heterozigotātes zudums šī gēna reģionā netika atrastas [Bruder et al., 2004]. Ar Xp11.2 translokāciju saistītais nieru šūnu vēzis pašlaik ir iekļauts PVO klasifikācijā kā atsevišķa entitāte [Argani et al., 2004], lai gan daži autori to uzskata par gaišo šūnu karcinomas apakštipu [Perlman, 2005]. Šobrīd tas arī tiek uzskatīts par bērnu vecumam specifisku nieru vēža paveidu. Konstatēti vairāki Xp11.2 hromosomas translokāciju veidi, bet visos gadījumos citoģenētiskās izmaiņas izraisa gēnu saplūšanu ar TFE3 gēna iesaistīšanos. Pirmā no aprakstītajām translokācijām bija t(X;1)(p11.2;q21), kura izraisa PRCC un TFE3 gēnu saplūšanu. Citas biežāk aprakstītās izmaiņas ir t(X;17)(p11.2;q25) ar ASPSCR1(ASPL) un TFE3, t(X;11)(p11.2;p34) ar IGFB7 un TFE3, inv(X)(p11;q12) ar NONO un TFE3, t(X;17)(p11;q23) ar CLTC un TFE3 gēnu iesaistīšanos [Sebire et al., 2009]. Morfoloģiski šīs karcinomas ir veidotas no šūnām ar gaišu citoplazmu. Pārsvārā ir raksturīga papillāra arhitektūra, bet ir iespējams arī difūzs vai nodulārs augšanas veids. Ar ASPL-TFE3 translokāciju saistīto audzēju šūnās parasti morfoloģiski konstatē plašu, gaišu vai eozinofīlu citoplazmu, vezikulārus kodolus, prominentus kodoliņus un neizteiktas šūnu robežas. Bieži ir sastopami hialinizēti audu mezgliņi un psammomas ķermenīši. Ar PRCC-TFE3 translokācijām saistītajiem audzējiem parasti ir nodulārāka, kompaktāka arhitektūra. Psammomas ķermenīši un hialinizēti audu mezgliņi sastopami retāk. Imūnhistoķīmiski visām ar Xp11.2 translokāciju saistītajām karcinomām raksturīga nukleāra TFE3 proteīna ekspresija. Tikai 50% no gadījumiem novēro pozitīvu citokeratīna un EMA ekspresiju, bet reakcija CD10 noteikšanai audzēja šūnās parasti ir pozitīva [Argani et al., 2004]. Bērnu vecuma nieru šūnu vēzim novērotas arī citas hromosomu translokācijas. Piemēram, daži autori [Sebire et al., 2009] bērniem atsevišķā grupā izdala ar t(6;11)(p21;q12)saistītu karcinomu. Šī ģenētiskā bojājuma nozīme nav pilnībā izpētīta, bet ir skaidrs, ka tiek skarts 6p21 lokusā esošais TFEB gēns [Davis et al., 2003]. Morfoloģiski ar t(6;11) un Xp11.2 translokāciju saistītie nieru šūnu vēži ir līdzīgi. Imūnhistoķīmiski TFE3 proteīna ekspresiju novēro arī t(6;11)(p21;q12) gadījumā. Tas izskaidrojams ar TFEB un TFE3 saistību, jo abi pieder pie transkripcijas faktorus nosakošo gēnu dzimtas [Sebire et al., 2009]. No citiem pediatrijā biežāk novērojamiem nieru šūnu vēžiem būtu jāatzīmē medullāra un ar neiroblastomu saistīta nieru karcinoma. Medullāra karcinoma ir reti sastopams audzējs, kurš parasti attīstās pacientiem ar sirpjveida šūnu hemoglobīnopātiju. Literatūrā var atrast tikai atsevišķus gadījumu sēriju pētījumus, kuros analizētas 22 un 40 pacientu lielas grupas [Davis et al., 1995; Swartz et al., 2002]. Salīdzinoši ar gaišo šūnu vēzi, šis veidojums parādās

daudz agrākā vecumā. Pētījumos iekļauto pacientu vecums variē no 5 līdz 40 gadiem [Davis et al., 1995; Khan et al., 2000; Swartz et al., 2002], līdz ar to medullārā nieru karcinoma var relatīvi biežāk parādīties bērnu patoloģiskajā praksē. No morfoloģiskās diagnostikas viedokļa interesanti, ka histoloģiski tas ir līdzīgs nieru rabdoīdam audzējam, jo sastāv no kolagenizētā stromā ietvertām lielām epiteliālām šūnām ar prominentiem kodoliņiem. Ir aprakstīta arī INI1 proteīna imūnhistoķīmiskā negativitāte atsevišķās medullārās nieru karcinomas šūnās [Hoot et al., 2004]. Ar neuroblastomu saistīts NŠV ir ļoti reti audzēja tips. Pašlaik literatūrā ir aprakstīti astoņpadsmit gadījumi [Medeiros, 2004]. Nav skaidrs vai nieru šūnu vēzi izraisa neuroblastomas terapija, vai pastāv cita veida saistība starp šiem veidojumiem. Parasti NŠV rodas tiem izdzīvojušajiem bērniem vai pusaudžiem (pacientu vidējais vecums ir 9 gadi), kuriem vecumā līdz diviem gadiem konstatēta un ārstēta neuroblastoma, bet ir aprakstīta arī karcinoma neārstētam IV stadijas neuroblastomas pacientam, kā arī vienlaicīga neuroblastomas un nieru šūnu vēža rašanās [Sebire et al., 2009].

Pacientu prognoze pediatrijā sastopamo nieru vēžu gadījumā būtiski neatšķiras no analogisku audzēju prognozes pieaugušajiem. Ilgstošā laika periodā novērojot NŠV pacientu grupu (diagnozes noteikšanas brīdī pacientu vecums bija no 1,5 gada līdz 19 gadiem), konstatēts, ka neņemot vērā audzēja histoloģisko tipu un stadiju, 20 gadu dzīvildze novērota 54,9%. Vislielākā ietekme uz pacienta dzīvildzi bija stadijai. I un II stadijas pacientu grupai 20 gadu dzīvildze bija 88,9%, bet III –IV stadijas pacientu grupai tikai 22,6% [Indolfi et al., 2003]. Runājot par histoloģiskā tipa ietekmi, jāsaka, ka pašlaik vēl nav skaidra Xp11.2 translokācijas ietekme uz prognozi [Argani, 2004]. Savukārt medullārajam vēzim raksturīga slikta prognoze, vidējais dzīves ilgums pēc diagnozes noteikšanas ir mazāks par 20 nedēļām [Sebire et al., 2009].

1.1.7. Metanefrītiskie audzēji

Metanefrītiskie audzēji ir labdabīgi, reti sastopami nieru jaunveidojumi. Literatūrā nav atrodami precīzi dati par šo audzēju sastopamību. Pašlaik plašākais tiem vēltītais pētījums aptver 50 metanefrītiskas adenomas (MA) gadījumus [Davis et al., 1995]. Atkarībā no histoloģiskās uzbūves izšķir metanefrītisku adenomu, metanefrītisku adenofibromu un metanefrītisku stromālu audzēju. PVO klasifikācijā šie audzēji izdalīti atsevišķā grupā [Eble et al., 2004; Argani, 2004], bet daļa autoru uzskata, ka metanefrītiskie veidojumi būtu klasificējami kā nefroblastisko audzēju apakšgrupa [Perlman, 2005], un, ja nefroblastoma pārstāv šī spektra ļaundabīgo daļu, tad metanefrītiskie audzēji ir tā labdabīgais analogs [Paner et al., 2005]. Metanefrītiska adenoma un adenofibroma ir sastopama gan bērnu, gan pieaugušo vecumā. MA sastāv galvenokārt epiteliālām, kompakti izvietotām sīkām acinārām struktūrām, kuru uzbūve ir līdzīga embrionālajai nierei. Metanefrītiska adenofibroma ir duālas uzbūves audzējs, kurš sastāv no metanefrītiskajai adenomai identiskas epiteliālās daļas un vārpstveida šūnu stromas. Metanefrītisks stromāls audzējs savukārt sastopams galvenokārt bērniem. Histoloģiski tas ir identisks ar metanefrītiskās adenofibromas stromālo daļu [Eble et al., 2004; Argani, 2004]. Daļa autoru uzsver, ka šie veidojumi ir labdabīgi un tiem nav

tendences malignizēties [Longnoni et al., 2004], bet literatūrā ir aprakstīts arī audzējs ar stromālā komponenta malignizāciju- tā saucamā metanefrītiskā adenosarkoma [Picken et al., 2001]. Tā kā šie audzēji ir reti sastopami un pārsvarā labdabīgi, to klīniskā nozīmība nav liela, daļa no tiem tiek diagnosticēti kā gadījuma atradne autopsijas laikā. Piemēram, no 7% līdz 22% metanefrītiskās adenomas gadījumu tiek nejauši atklāti post mortem izmeklēšanā [Longnoni et al., 2004]. No klīniskā un diagnostiskā redzes punkta visnozīmīgākais audzējs šajā grupā ir metanefrītiskā adenoma, jo pastāv liela līdzība starp nefroblastomas un MA histoloģisko un makroskopisko ainu. Tāpat var pastāvēt grūtības diferencēt metanefrītisku adenomu un nieru šūnu vēzi. Imūnhistoķīmiskās reakcijas MA gadījumā var būt variablas [Eble et al., 2004], bet tiek aprakstīta nukleāra WT1 proteīna pozitivitāte [Muir et al., 2001; Paner et al., 2005]. Reakcijas CK7 un EMA noteikšanai pārsvarā ir negatīvas vai tikai fokāli pozitīvas [Pins et al., 1999; Paner et al., 2005; Muir et al., 2001], taču novēro kopējā citokeratīna un CD56 pozitivitāti [Paner et al., 2005; Muir et al., 2001].

1.1.8. Reti sastopamie audzēji

No reti sastopamajiem bērnu vecuma nieru audzējiem vislielākā klīniskā un diagnostiskā nozīme ir tādiem ļaundabīgiem veidojumiem kā primārs intrarenāls primitīvs neuroektodermāls audzējs, primāra intrarenāla neuroblastomai, desmoplastisks sīko apaļo šūnu audzējs, sinoviāla sarkoma un nieru anaplastiska sarkoma [Sebire et al., 2009]. Literatūrā ir aprakstīti tikai atsevišķi primāras intrarenālas neuroblastomas, primāra intrarenāla PNET gadījumi un primāra intrarenāla DSCRT gadījumi [Sellaturay et al., 2006; Asiri et al., 2010; de Silva et al., 2009]. Šie jaunveidojumi ir svarīgi no morfoloģiskās diferenciālās diagnostikas viedokļa, jo tie visi, tāpat kā blastemāla tipa nefroblastoma, pieder pie tā saukto bērnu vecuma „sīko zilo apaļo šūnu audzējiem”. Imūnhistoķīmiski neuroblastomai raksturīga NSE, sinaptofīzīna un hromogranīna pozitivitāte [Coffin et al., 2006]. CD56 ekspresija novērojama gan primitīvās blastēmas, gan neuroblastomas šūnās, līdz ar to šī marķiera pielietošanai nav diagnostiskas nozīmes. Lai diferencētu abus audzējus varētu tikt izmantota WT1 un NB84 antigēna noteikšana. Molekulārā līmenī neuroblastomai raksturīgas MYCN gēna izmaiņas un 1p hromosomas lokusa heterozigotātes trūkums. Intrarenāla, tāpat kā citas lokalizācijas, PNET gadījumā imūnhistoķīmiski diagnostiski nozīmīga ir membranoza CD99 ekspresija, bet citoģenētiski translokācija t(11;22)(q24;q12). DSCRT imūnhistoķīmiski raksturojas ar vimentīna, WT1, desmīna, citokeratīna un EMA pozitivitāti, bet citoģenētiski ar translokāciju t(11;22)(p13;q12) un sekojošu EWS- WT1 gēnu saplūšanu [Sebire et al., 2009]. Primāra renāla sinoviāla sarkoma ir reti sastopams nieru embrionālas sarkomas apakštips, kuras gadījumā novēro translokāciju t(x;18)(p11;q11) ar SYT-SSX gēnu iesaistīšanos [Argani et al., 2000]. Imūnhistoķīmiski tai raksturīga vimentīna un bcl-2 pozitivitāte, tāpat bieži novērojama CD99 pozitivitāte, bet reakcijas desmīna, aktīna, kopējā citokeratīna un EMA noteikšanai pārsvarā ir negatīvas [Ro et al., 2004]. Pēdējos gados konstatēta vēl viena jauna nieru audzēju entitāte- nieres anaplastiska sarkoma. Pavisam aprakstīti 20 tās gadījumi pacientiem vecumā no 10

mēnešiem līdz 41 gadam (vidējais vecums 5 gadi). Histoloģiski audzēju veido anaplastiskas vārpstveida šūnas, raksturīga hondroīda diferenciācija. Konstatēta imūnhistoķīmiska vimentīna, desmīna, CD56 un p53 pozitivitāte, kamēr reakcijas kopējā citokeratīna, MyoD1, NB84, CD34, CD99 un WT1 proteīna noteikšanai bija negatīvas [Vujanic et al., 2007].

No reti sastopamiem bērnu vecuma nieru audzējiem vēl būtu jāmin angiomiolipoma (AML). Kopumā tas ir visās vecuma grupās reti sastopams labdabīgs jaunveidojums, to konstatē aptuveni 1% no visiem ekscidēto audzēju gadījumiem. Vidējais pacientu vecums ir 41 gads. Histoloģiski angiomiolipomu veido taukaudi, vārpstveida un epiteloīdas gludās muskulatūras šūnas un asinsvadi dažādās proporcijās. Spriežot pēc histoloģiskās uzbūves šo veidojums varētu tikt saukts par hamartomu, taču vairums autoru to uzskata par labdabīgu audzēju [Lowe et al., 2000] un arī PVO klasifikācijā tas iekļauts kā labdabīgs, mezenhimālas ģenēzes audzējs. Imūnhistoķīmiski AML gadījumā atrod melanocītu (HMB45, HMB50, CD63) un gludās muskulatūras marķieru (muskulatūrai specifiskais aktīns, gludajai muskulatūrai specifiskais aktīns, kalponīns) kopīgu ekspresiju. Ir iespējama arī CD68, NSE, S100, desmīna, estrogēna un progesterona receptoru pozitivitāte, bet reakcijas epiteliālo marķieru noteikšanai parasti ir negatīvas [Martignoni et al., 2004]. Visbiežāk angiomiolipoma rodas sporādiski, taču ir konstatēta saistība starp tuberozo sklerozi un šo veidojumu. 80% tuberozās sklerozes pacientiem ir iespējama nieru angiomiolipomas attīstība vidēji 10 gadu vecumā [Ewalt et al., 1998]. AML nav raksturīga malignizācija, bet atsevišķos tās gadījumos, sevišķi ja audzēja diametrs ir lielāks par 4 cm, var attīstīties dzīvībai bīstama asiņošana vai nieru mazspēja [Martignoni et al., 2004].

Cits ļoti rets, bet tikai bērnu vecumam raksturīgs nieru jaunveidojums, ir bērnu vecuma ossificējošais nieru audzējs (angļu val. ossifying tumor of infancy). Pirmo reizi tas literatūrā aprakstīts 1980. gadā [Chatten et al., 1980] un līdz šim publicēti tikai nedaudz vairāk par desmit gadījumu aprakstu [Lowe et al., 2000]. Lielākā daļa no pacientiem ir bijuši aptuveni 1 gadu veci zēni. Veidojums parasti ir neliels un ir lokalizēts nieru papillās vai parenhīmā tuvu papillārajai daļai tā, ka lielākā audzēja masa parasti atrodas blāzmas lūmenā. Histoloģiski audzēju veido vārpstveida šūnas, kuras izvietotas daļēji kalcificētā osteoīdā matricā, tāpēc klīniskā un radioloģiskā aina bieži atgādina nierakmeņu slimību. Prognoze ossificējoša bērnu vecuma nieru audzēja gadījumā ir ļoti laba, metastāžu vai recidīva gadījumi nav aprakstīti [Perlman et al., 2007].

1.1.9. Stadiju un histoloģiskās malignitātes pakāpju noteikšana

Neskatoties uz visu iepriekš aplūkoto audzēju spektra histoloģisko daudzveidību SIOP bērnu vecuma nieru audzēju darba klasifikācija aplūko tikai reālajā bērnu patologu, onkologu un ķirurģu praksē biežāk sastopamos veidojumus. Prognostiski vislielākā nozīme ir audzēja stadijas un histoloģiskās malignitātes pakāpes noteikšanai. Atbilstoši šiem diviem kritērijiem arī tiek plānota turpmākā ķīmijterapija. Jau 1994. gada SIOP klasifikācijā vadoties pēc histoloģiskās ainas tika izdalītas zema riska, vidēja

riska un augsta riska audzēju grupas. Ņemot vērā pirms operācijas veiktās ķīmijterapijas radītās izmaiņas, tā tika pārskatīta 2002. gadā. Pašlaik SIOP rekomendē sekojošu praktiskajā darbā lietojamu klasifikāciju audzēja histoloģiskās malignitātes pakāpes noteikšanai [Vujanic et al, 2002].

I. Audzēji pēc preoperatīvas ķīmijterapijas

1. zemas malignitātes pakāpes audzēji:
 - a) mezoblastiska nefroma,
 - b) cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma,
 - c) pilnībā nekrotizēta nefroblastoma,
2. vidējas malignitātes pakāpes audzēji:
 - a) nefroblastoma-epiteliāls tips,
 - b) nefroblastoma- stromāls tips,
 - c) nefroblastoma- jaukts tips,
 - d) nefroblastoma-regresīvs tips,
 - e) nefroblastoma-fokāla anaplāzija,
3. augstas malignitātes pakāpes audzēji:
 - a) nefroblastoma-blastemāls tips
 - b) nefroblastoma- difūza anaplāzija,
 - c) nierēs gaišo šūnu sarkoma,
 - d) nierēs rabdoīds audzējs.

II. Primārās nefrektomijas gadījumā

- 1) Zemas malignitātes pakāpes audzēji,
 - a) mezoblastiska nefroma,
 - b) cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma
- 2) vidējas malignitātes pakāpes audzēji:
 - a) ne-anaplastiska nefroblastoma un tās veidi,
 - b) nefroblastoma-fokāla anaplāzija
- 3) augstas malignitātes pakāpes audzēji,
 - a) nefroblastoma-difūza anaplāzija,
 - b) nierēs gaišo šūnu sarkoma,
 - c) nierēs rabdoīds audzējs.

Otrs būtiskākais prognostiskais un terapeitiskais kritērijs pediatriko nieru audzēju izvērtēšanā ir jaunveidojuma stadija. SIOP pašlaik rekomendētie kritēriji bērnu vecuma nieru audzēju stadijas noteikšanai ir sekojoši [Vujanic et al., 2002].

I. Stadija:

- a) audzējs atrodas nierēs robežās vai, ja tas iziet ārpus nierēs robežām, ir norobežots ar fibrozu pseidokapsulu. Neoplastiskās šūnas var infiltrēt nierēs kapsulu vai fibrozo pseidokapsulu, bet nav atrodamas nekur citur ārpus audzēja. Veidojums ir pilnībā ekscidēts (rezekcijas līnijas „tīras”),
- b) audzējs var ieaukt („iespiesties”) blāzmas vai urīnvada lūmenā, bet tas neinfiltrē to sienu,
- c) nekonstatē neoplastisko šūnu kompleksus renālā sinusa asinsvados,
- d) konstatē neoplastisko šūnu kompleksus intrarenālo asinsvadu lūmenā.

II. Stadija:

- a) audzējs atrodas ārpus nieres robežām vai caur aug nieres vai/un fibrozo veidojuma pseidokapsulu un infitrē perirenālos taukumus, bet ir pilnībā eksidēts (rezekcijas līnijas „tīras”),
- b) audzējs infitrē nieres sinusu un/vai atrod neoplastisko šūnu kompleksus asinsvadu un limfvadu lūmenā ārpus nieres parenhīmas, bet veidojums ir pilnībā eksidēts,
- c) audzējs infitrē blakus esošos orgānus vai apakšējo dobo vēnu, bet ir pilnībā eksidēts.

III. Stadija:

- a) audzējs nav eksidēts pilnībā (makroskopiski un/vai mikroskopiski konstatēti neoplastiskie audi rezekcijas līnijās),
- b) metastāzes abdominālajos limfmezglos,
- c) audzēja ruptūra pirms operācijas vai operācijas laikā (neatkarīgi no citiem stadijas noteikšanai būtiskajiem kritērijiem),
- d) audzējs ieaug vēderplēvē,
- e) histoloģiski tiek atrasta neoplastisko šūnu implantācija vēderplēvē,
- f) urīnvada sienas vai rezekcijas līniju asinsvados tiek konstatēti audzēja šūnu trombi,
- g) ir tikusi veikta ķirurģiska audzēja biopsija pirms ķīmijterapijas uzsākšanas vai operatīvās terapijas.

IV. Stadija:

- a) hematogēnas metastāzes (plaušās aknās, kaulos, galvas smadzenēs un citur) vai metastāzes limfmezglos ārpus iegurņa un vēdera dobuma.

V. Stadija:

- a) abpusējs nieres audzējs diagnozes noteikšanas brīdī. Katram audzējam jānosaka arī stadija atsevišķi atbilstoši iepriekš aprakstītajiem kritērijiem.

1.2. Potenciāli prognostiski un diagnostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru raksturojums nefroblastomas gadījumā

1.2.1. CD44 glikoproteīda izoformas t. sk. CD44s izoforma

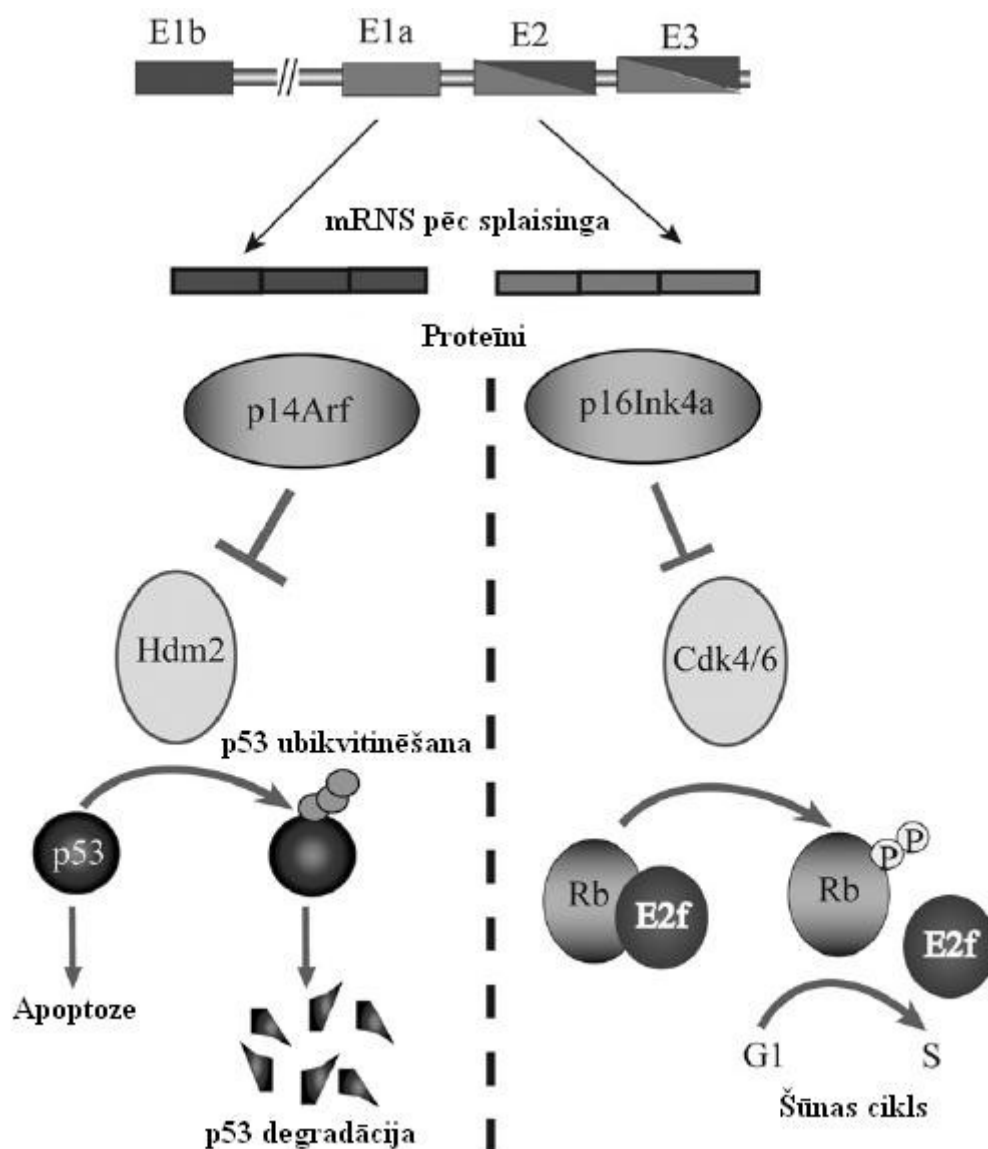
Nefroblastomas gadījumā ir pētīta vairāku potenciāli prognostiski svarīgu imūnhistoķīmisko marķieru, tai skaitā CD44 ekspresija [Coffin et al., 2006]. CD44 ir transmembranozs glikoproteīns, kurš kā šūnas virsmas adhēzijas molekula izpilda multifunkcionāla receptora funkcijas un ir iesaistīts šūnu migrācijas, proliferācijas un diferenciācijas procesos, hemokīnu un augšanas faktoru prezentācijā, kā arī angiogēnēzē [Naor et al., 2002]. Tā molekula sastāv no glikolizēta distālā ekstracelulārā domēna, proksimālā membrānas reģiona, transmembranozā domēna un citoplazmatiskās daļas. CD44 ir galvenais hialuronskābes receptors, tas piesaista arī tādus ekstracelulāros

glikoproteīnus kā fibronektīns un kolagēni. CD44 molekulas genoma veidošanā ir iesaistīti divdesmit eksoni. Pirmie pieci un pēdējie pieci eksoni ir nemainīgi, bet starp tiem esošie desmit eksoni var mainīties atkarībā no RNS saspišanas procesa izmaiņām. Desmit mainīgo eksonu variācijas, kā arī N-glikozilācijas, O-glikozilācijas un glikozaminoglikanizācijas izmaiņas (mainība no heparāna sulfāta uz hondroitīna sulfātu) rada daudzas CD44 izoformas, no kurām pašlaik labi zināmas vismaz divdesmit. Mazākā CD44 molekula (85-95 kDa) ir standarta CD44 jeb CD44s, kura ir pazīstama arī kā hematopoētiskā CD44 (CD44H) izoforma [Naor et al., 1997]. Pozitīva CD44s ekspresija parasti satopama monocītos, granulocītos, eritrocītos, B limfocītos un nobriedušos T limfocītos [Stoll et al., 1989]. Ārpus hematopoētiskās sistēmas CD44s tiek ekspresēts epiteliālajās šūnās, fibroblastos, šķērsvītrotās muskulatūras šūnās un galvas smadzeņu baltajā vielā. [Dalchau et al., 1989.]. Epiteliālās šūnas ekspresē arī CD44s līdz CD44v10 izoformas, T limfocīti un leukocīti pēc imunoloģiskās aktivācijas ekspresē CD44v izoformu. Pozitīva reakcija dažādu CD44 izoformu noteikšanai parādās vairāku ļaundabīgo audzēju kā ne-Hodžkina limfomas, gastrointestinālā trakta, urīnpūšļa, krūts un dzemdes kakla vēža gadījumā, savukārt gliomas, gadījumā sastopama CD44s izoformas ekspresija. Lai gan literatūrā ir aprakstīti pētījumi, kuros konstatēta lokālas audzēja augšanas un metastazēšanās inhibīcija dzīvniekiem injicējot CD44s vai CD44v specifiskās antivielas, kas ļauj domāt, ka specifisko CD44 antivielu pielietošana ļauj ierobežot ļaundabīgo audzēju augšanu un CD44 ekspresijas pakāpe var tikt izmantota kā prognostisks parametrs, kurš norāda uz invazīvu procesu [Naor et al., 1997]. Pētījumu rezultāti attiecībā uz CD44 izoformu ekspresijas noteikšanas prognostisko lomu dažādu audzēju gadījumā ir pretrunīgi. Tā, piemēram, krūts dziedzerā infiltratīva alveolāra un mucinoza alveolāra daiviņu vēža gadījumā ir aprakstīta CD44v5 pozitīvas citoplazmatiskas ekspresijas saistība ar negatīvu metastāžu atradi limfmezglos, kamēr pozitīva membranoza CD44v5 atrade šajos audzējos ir saistīta ar metastātisku procesu limfmezglos un pozitīva membranoza CD44s ekspresija trabekulāra infiltrējoša daviņu vēža gadījumā arī pozitīvi korelē ar limfmezglu metastāžu atradi [Berner et al., 2001]. CD44 izoformu ekspresija olnīcu vēža gadījumā ir paaugstināta salīdzinot ar audzēja neskartajiem audiem un labdabīgajiem audzējiem šajos orgānos, taču nav konstatēta tās pārliecinoša saistība ar histoloģiski noteikto audzēja malignitātes pakāpi, hormonālo marķieru ekspresiju un audzēja lielumu [Sanches Lockhart et al., 2001]. CD44s izoforma parasti tiek ekspresēta audzēja neskartas prostatas audos epitēlijā un tā bazālajās šūnās [Ickowski, 2011], tās līmenis samazinās intraepiteliālas neoplāzijas un prostatas vēža gadījumā. Metastātiska prostatas audzēja gadījumā CD44s ekspresija samazinās salīdzinot ar primāro audzēju [Ickowski et al., 1997]. Tāpat ir aprakstīta samazināta CD44s un CD44v6 ekspresijas saistība ar augstāku audzēja stadiju, augstāku Glīsona pakāpi, metastātisku procesu, augstu mitotisko indeksu, perineirālu augšanu un samazinātu pacienta dzīvildzi [Aaltoma et al., 2001]. Turpretī nieru šūnu vēža gadījumā konstatēta pozitīva korelācija starp dažādu CD44 izoformu ekspresiju un audzēja malignitātes pakāpi [Terpe et al., 1996], kā arī samazināta dzīvildze pacientiem ar CD44 pozitīvu nieru šūnu vēzi [Kabiri et al., 2006]. Savukārt pētījumu dati par CD44 izoformu ekspresijas nozīmi nefroblastomas gadījumā ir neviennozīmīgi. Konstatēts, ka dažādas intensitātes

membranoza pozitīva reakcija CD44s, CD44v5 un CDv10 antigēnu noteikšanai parasti ir sastopama gan audzēja blastemālajā un epiteliālajā komponentā gan stromālajā komponentā. Šīs reakcijas ir pozitīvas arī neoplastiskā procesa neskartajās nieru kanāliņu epitēlija šūnās, ko var lietot arī kā pozitīvu iekšējo kontroli [Ghanem et al., 2011]. Pirms operācijas ķīmijterapeitiski ārstētajās nefroblastomās CD44s, CD44v un CD44v10 ekspresija epiteliālajās šūnās pakāpeniski pieaug paaugstinoties audzēja stadijai, CD44s izoformas ekspresija blastematozajā daļā pozitīvi saistās ar audzēja stadiju, bet CD44v5 izoformas ekspresija blastematozajā daļā ar augstāku audzēja stadiju, ātrāku progresiju un ļaundabīgā procesa izraisītu nāvi [Ghanem et al., 2002]. Savukārt nav konstatēta pārliecinoša saistība starp CD44s izoformas ekspresiju un preoperatīvi neārstētas nefroblastomas stadiju un klīnisko gaitu [Ghanem et al., 2011] taču literatūrā ir aprakstīta tās pozitīva saistība ar audzēja histoloģisko tipu un histoloģiskās malignitātes pakāpi neatkarīgi no tā vai pirms operācijas ir vai nav bijusi pielietota ķīmijterapija [Taran et al., 2008].

1.2.2. Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16^{INK4a} izmaiņas un tā kodētā p16^{INK4a} proteīna ekspresija

Sākotnējos pētījumos tika konstatēts, ka 9p21 hromosomas segmenta delēcija vai citas citoģenētiskas anomālijas novēro lielākajai daļai melanomu, gliomu un leukēmiju un gandrīz trešdaļai plaušu ne-sīkšūnu vēža gadījumu [Nobori et al., 1994]. Minētais lokuss ietver vairākus gēnus t.sk. arī ciklīna atkarīgās kināzes inhibitora 2A (CDKN2A) gēnu, kas kodē divus atšķirīgus proteīnus - p14^{ARF} un p16^{INK4a}, kuri tiek uzskatīti par audzēja nomācējgēniem. CDKN2A gēns sastāv no četriem eksoniem (1α, 1β, 2 un 3). Alternatīvā splaisinga rezultātā eksoni 1α, 2 un 3 apvienojas un veido proteīnu p16^{INK4a} savukārt apvienojoties eksoniem 1β, 2 un 3 veidojas proteīns p14^{ARF} [Chudnovsky et al., 2005]. Abi minētie proteīni iesaistīti šūnas cikla regulācijā (skat. 1.2.att.).



1.2.att. Shematisks gēna CDKN2A struktūras un tā produktu attēlojums (pielāgots pēc Udayakumar et al., 2010).

P16^{INK4a} proteīns inhibē no ciklīna D atkarīgās kināzes (CDK4). Ciklīna atkarīgās kināzes nosaka šūnas dalīšanās cikla norisi, to aktivitāte tiek regulēta fosforilizācijas ceļā. Pāreju no šūnas dalīšanās cikla G1 fāzes uz S fāzi regulē ciklīna D, ciklīna E un ciklīna A atkarīgās kināzes. Enzīma aktivizācija notiek tam saistoties ar ciklīniem, bet inaktivācija saistoties ar ciklīnu atkarīgo kināžu inhibitoriem. Minētie inhibitori bioķīmiski sasaista mitogēnos un augšanas inhibitoru signālus, monitorē hromosomu integritāti un koordinē precīzu šūnas ciklu pārejas laiku [Tsihlias et al., 1999]. Proteīns p16 jeb INK4a (kināzes 4a inhibitors), iesaistās šūnas cikla regulācijā izkonkurējot ciklīnu D1 CDK4 saistīšanā. Ciklīna D1 un CDK4 komplekss fosforilē retinoblastomas gēna proteīnu, inaktivējot to (Serrano et al., 1993) un veicinot šūnas cikla progresiju [Yuan et al., 2000]. Savukārt proteīns p16^{INK4a} novērš retinoblastomas gēna proteīna fosforilizāciju tādejādi apturot šūnas ciklu. CDKN2A/p16^{INK4a} gēna inaktivācijas gadījumā notiek p16^{INK4a} proteīna regulatīvās kapacitātes zudums un

netiek ierobežota šūnu proliferatīvā aktivitāte [Borg et al., 2000]. Ļaundabīgo audzēju ģenētiskā nozīmīgi ir vismaz trīs CDKN2A/p16^{INK4a} gēna inaktivācijas ceļi-homozigotiska delēcija, promoteru metilācija un gēna punktveida mutācijas [Liggett et al., 1998]. Homozigotiska delēcija literatūrā visbiežāk ir aprakstīta T šūnu akūtas limfoblastu leukēmijas gadījumā, gliomas un ne- sīkšūnu vēža gadījumā, gēnu mutācijas un sīkas delēcijas pārmantotās melanomas, barības vada vēža un žultsceļu vēža, bet gēna un tā promoteru hipermetilācija resno zarnu un krūts vēža, kā arī gliomas un kakla-sejas daļas plakanšūnu vēža gadījumā [Yao et al., 1998]. Klīniski vislielākā nozīme CDKN2A/p16^{INK4a} gēna izmaiņām ir melanomas gadījumā. Atsevišķos pētījumos CDKN2A lokusa delēcijas vai gēnu mutācijas minētajā lokusā konstatētas 70% melanomas šūnu kultūru gadījumos un 35% melanomas šūnu ārpus kultūras [Saida, 2001]. Saskaņā ar jaunākās PVO ādas audzēju klasifikācijas datiem šī gēna izmaiņas kopumā konstatē 25% pārmantotās melanomas gadījumu [de Vries et al., 2006]. Tāpat ir konstatētas CDKN2A/p16^{INK4a} izmaiņas aizkuņģa dziedzera primāras adenokarcinomas gadījumā [Bartsch et al., 1995] un paaugstināta saslimstība ar aizkuņģa dziedzera vēzi pārmantotas melanomas pacientiem [Borg et al., 2000]. Liela daļa pētījumu analizē minētā gēna citogēnētiskās izmaiņas, bet ir arī publikācijas veltītas p16^{INK4a} proteīna imūnhistoķīmiskās ekspresivitātes noteikšanai un tās saistībai ar klīniskajiem rādītājiem. Šajos pētījumos iegūtie dati ir pretrunīgi. Sāksim ar to, ka zinātniskās publikācijās minēta dažāda p16^{INK4a} proteīna ekspresija normālajās struktūrās. Lielākā daļa autoru konstatējuši, ka reakcijas intensitāte audzēja neskartajos audos ir ļoti zema vai vispār nav nosakāma un tas atbilst normālajam bazālajam p16^{INK4a} līmenim. Pašlaik daļā pētījumu un klīniskajā praksē tas ir pieņemts kā imūnhistoķīmiskās reakcijas izvērtēšanas standarts [Yao et al., 1998; Schrami et al., 2001; Natrajan et al., 2008; Zhao et al., 2012]. Pieaugušajiem normālos audos p16^{INK4a} proteīna ekspresija aprakstīta proliferatīva endometrija šūnās, krūts dziedzera izvadū epitēlijā, daudzkārtainā plakanā barības vada epitēlija šūnās, sēklinieka Sertoli un Leidiga šūnās, aizkuņģa dziedzera Langerhansa saliņās, hipofīzes priekšējā daivā, siekalu dziedzeros, kuņģa antrālās daļas dziedzeros, kamēr bērniem to konstatē tikai tīmusā esošajos Hasela ķermenīšos un atsevišķās aizkuņģa dziedzera epitēliālajās šūnās [Nielsen et al., 1999]. Savukārt atsevišķās publikācijās atzīmē p16^{INK4a} proteīna ekspresiju normālos nierēs audos. Piemēram, Gordana Basta- Jovanoviča 2008. gadā veiktā pētījumā konstatējusi nukleāru p16^{INK4a} proteīna ekspresiju neizmainītos cilvēka nierēs audos intersticiālās šūnās, distālo izlocītu kanāliņu epitēlija šūnās, parietālajās epitēlija šūnās, podocītos un glomerulu kapilāru cilpu endotēlijā [Basta- Jovanović et al., 2008]. Atsevišķi zinātnieki izmantojuši p16^{INK4a} ekspresijas noteikšanu audzēja stromas un asinsvadu sienas šūnās kā pozitīvu iekšēju kontroli reakcijas kvalitātes noteikšanai Linča sindroma pētniecībā [Payá A et al., 2009], kā arī p16^{INK4a} ekspresijas noteikšanu ādas daudzkārtainā plakanā epitēlija šūnās un stromā kā pozitīvu iekšēju kontroli melanomas pētniecībā [Straume et al., 1997]. Paaugstināta p16^{INK4a} ekspresija šūnās ir novērota saistībā ar organisma novecošanos tādējādi samazinot cilmes šūnu proliferāciju. Šāda cilmes šūnu proliferācijas samazināšanās un to skaita reducēšanās pasargā no malignizācijas riska [Krishnamurthy et al., 2006]. Nierēs p16^{INK4a} ekspresijas līmenis pieaug arī saistībā ar glomerulosklerozi, tubulāru atrofiju un

intersticiālu fibrozi [Melk et al., 2004]. Interesanti, ka klīniskajā praksē pašlaik p16^{INK4a} ekspresijas noteikšanu lieto arī dzemdes kakla morfoloģiskajā izmeklēšanā cilvēka papillomas vīrusa (HPV) infekcijas un intraepiteliālās neoplāzijas diagnostikai. Tas izskaidrojams ar to, ka augsta riska HPV infekcijas gadījumā konstatētais onkogēns E7 ar histona demetilāzes palīdzību inducē p16^{INK4a} gēna transkripciju un sekojošu proteīna uzkrāšanos šūnā. Minētais process saistīts ar infekcijas izraisītu šūnas transformāciju, kas izpaužas ar nukleāru un citoplazmatisku reakcijas pozitivitāti [Dray et al., 2005; Roelens et al., 2012]. Audzēju gadījumā novērotā p16^{INK4a} ekspresija un tās saistība ar klīniskajiem rādītājiem ir dažāda. Tā, piemēram, nodulāra tipa melanomas pētniecībā noskaidrots, ka samazināta reakcijas intensitāte saistās ar samazinātu dzīvildzi [Straume et al., 1997]. Tāpat atsevišķi pētījumi rāda, ka šī proteīna ekspresija ir samazināta leukēmiskajā infiltrātā salīdzinot ar normālajām asinsrades šūnām un akūtas limfoblastu leukēmijas gadījumā tā ir mazāka nekā pie akūtas mieloblastu leukēmijas [Chen et al., 2000]. Lielākā daļā zinātnisko publikāciju gan konstatēta paaugstināta p16^{INK4a} proteīna ekspresija dažādu audzēju audos un tās saistība ar sliktākiem prognostiskiem rādītājiem. Tā paaugstināts p16^{INK4a} imūnhistoķīmiski noteiktais līmenis saistās ar prostatas karcinomas sliktāku klīnisko gaitu un audzēja recidīviem [Lee et al., 1999]. Plaušu nesīkšūnu vēža gadījumā progresējoša gaita un samazināta dzīvildze saistās ar imūnhistoķīmiski konstatētu samazinātu retinoblastomas gēna proteīna ekspresiju [Xu et al., 1994], bet starp to un reakcijas intensitāti p16^{INK4a} proteīna noteikšanai pastāv apgriezta saistība [Betticher et al., 1997]. Tāpat apgriezta saistība starp abiem šiem marķieriem aprakstīta krūts vēža pētniecībā, minētajā publikācijā arī minēta saistība starp paaugstinātu p16^{INK4a} ekspresiju un samazinātu dzīvildzi, lai gan nav konstatēta reakcijas intensitātes izmaiņas atkarība no krūts audzēja histopatoloģiskajiem parametriem [Dublin et al., 1998]. Jaunākajos darbos gan parādās arī dati par imūnhistoķīmiski noteiktu statistiski nozīmīgu paaugstinātu p16^{INK4a} proteīna līmeni tajos krūts vēža gadījumos, kuros konstatēta infiltratīva augšana uz robežas ar veselajiem audiem [Chae et al., 2011]. Nefroblastomas pētniecībā iegūtās norādes par citoģenētiskajām un imūnhistoķīmiskajām p16^{INK4a} izmaiņām un to saistību ar klīniskajiem un histopatoloģiskajiem rādītājiem ir ļoti pretrunīgas un to ir samērā maz. Sākotnējos darbos, izmantojot reversās transkripcijas polimerāzes ķēžu reakciju (PCR), iegūti dati par CDKN2 lokusā esošo gēnu inaktivāciju deviņos no trīsdesmit astoņiem labvēlīgas histoloģiskās ainas nefroblastomas audu. Tālāk, izmantojot PCR reakciju specifiskas metilācijas noteikšanai, visos iesaistītajos gadījumos konstatēta p16^{INK4a} gēna promotera metilācija, pie tam citoģenētisko izmaiņu sastopamības biežums pieaug paaugstinoties klīniski noteiktajai audzēja stadijai. Tādēļ izteikta doma, ka minēto ģenētisko traucējumu noteikšana var kalpot augsta riska nefroblastomas pacientu atpazīšanai [Arcellana- Panlilio et al., 2000]. Tomēr, jau pētot septiņdesmit deviņu pacientu lielu labvēlīgas histoloģiskās ainas pacientu grupu, šie paši autori nav atklājuši statistiski būtisku saistību starp klīniskajiem rādītājiem un p16^{INK4a} gēna inaktivāciju [Arcellana- Panlilio et al., 2003]. Daži zinātnieki apraksta p16^{INK4a} gēna promoteru metilāciju 10,3 % no nefroblastomām [Wagner et al., 2002], kamēr citi to neatrod vispār [Faussillon et al., 2005]. Savukārt 2008. gadā veiktā pētījumā 12% no nefroblastomas gadījumiem atklāta CDKN2 lokusa hemizigotiska delēcija, taču tā nav bijusi saistīta ar

klīniskajiem vai histopatoloģiskajiem rādītājiem. Paralēli citoģenētiskajiem izmeklējumiem veiktajā imūnhistoķīmiskajā krāsošanā, pozitīva p16^{INK4a} proteīna ekspresija konstatēta tikai 16,1% ne-anaplastiskas nefroblastomas gadījumā. Darba autori uzskata, ka minētā atradne drīzāk atspoguļo normālu fizioloģisku stāvokli, nevis samazinātu imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitāti. Tajā pašā laikā paaugstināta nukleāra p16^{INK4a} proteīna ekspresija atrasta 4 no 9 anaplastiskas nefroblastomas, 5 no 7 rabdoīda nierēs audzēja un 4 no 10 nieru gaišo šūnu sarkomas gadījumiem, kas pētniekiem liek domāt par iespējamu sakarību starp audzēju klīnisko gaitu un imūnhistoķīmisko p16^{INK4a} proteīna reaktivitāti [Natrajan et al., 2008]. Otrā 2008. gadā veiktā pētījumā novērota statistiski būtiska saistība starp blastemālu audzēja tipu un p16^{INK4a} ekspresiju, pozitīva reakcija tika novērota arī metastātisko audzēju audos, bet tās intensitāte III/IV/V stadijas nefroblastomas gadījumos bija zemāka nekā I/II stadijas veidojumos. Vidējas malignitātes nefroblastomās p16^{INK4a} proteīna ekspresija bija augstāka nekā augstas malignitātes, bet minētā saistība nebija statistiski būtiska [Basta-Jovanović et al., 2008].

1.2.3. Ar šūnas proliferāciju saistītais kodolu antigēns Ki67/MIB-1

Kodolu antigēns, ko pašreiz pieņemts saukt par Ki67, pirmoreiz identificēts mieloblastos akūtas mieloblastu leikozes gadījumā ar anti-komplementārās imunofluorescences metodi [Klein et al., 1974]. Turpmākos pētījumos imunizējot peli ar Hodžkina limfomas šūnu līniju L428 iegūta monoklonāla antivielas pret cilvēka kodolu antigēnu, kurš atrodams proliferējošās šūnās. Pētnieku grupa, kuri to atklāja deva antigēnam vārdu Ki67, jo atklājums notika Ķīlē (vācu val. Kiel) un tā identifikācijai tika izmantots klons nr. 67 no iespējamajiem 96 [Gerdes et al., 1983]. Detalizētā šūnas cikla analīzē konstatēts, ka Ki67 ir atrodams cikla G₁, S un G₂ fāzē, kā arī mitozē, bet nav atrodams G₀ fāzē. Tikai vēlākos pētījumos raksturota paša antigēna struktūra. Tas ir 345-395 kDa liels, pret proteāžu iedarbību jūtīgs, ne-histonu proteīnu komplekss [Gerdes et al., 1991]. Tā kodējošais gēns ir lokalizēts hromosomā 10q25 un sastāv no 15 eksoniem lielumā no 67 līdz 6845 bp un 14 introniem lielumā no 87 līdz 3569 bp. Šī gēna 13 eksonā atrodas 16 homologi 366 bp lieli segmenti (t. sauc. „Ki67 atkārtojumi”), katrs no tiem satur 66 bp lielas jaunas nukleotīdu sekvenču (angļu val. „Ki 67 motif”), kuras kodē nukleāru proteīnu. Neskatoties uz visu pieejamo informāciju par Ki67 proteīna uzbūvi, par tā funkcijām ir zināms maz. Noskaidrots, ka oligonukleotīdi ar Ki67 proteīnam pretēju iedarbību ievērojami samazina 3H timidīna uzņemšanu cilvēka audzēja šūnās. Tādēļ arī domā, ka Ki67 antigēna galvenā loma ir šūnu proliferācijas saglabāšanā [Duchrow et al., 1995; Duchrow et al., 1996]. Ki67 imūnhistoķīmiska vizualizācija ļauj ātri un precīzi atklāt aktīvo šūnu frakciju dažādā cilvēka audu materiālā neatkarīgi no tā vai tie ir neizmainīti vai ir radies audzējs. Klīniskajā praksē lietotais Ki67 ekvivalents ir MIB-1. Monoklonālā antivielas MIB-1 izveidota kā imunogēnu lietojot Ki67 nukleārā antigēna dažādas daļas [Ghanem et al., 2004]. Pašlaik Ki67/MIB-1 tiek plaši pielietota rutīnas patologa praksē, lai noteiktu „proliferatīvo šūnu” daudzumu dažādās neoplāzijās. Šī lieluma raksturošanai lieto tā saucamo

proliferācijas indeksu (angļu val. labeling index), ko iegūst aprēķinot procentuālo Ki67/MIB-1 pozitīvo šūnu kodolu attiecību pret visiem noteiktā redzes laukā esošajiem šūnu kodoliem. Jau pirmajos pētījumos vairāk nekā 20 gadus ilgā pagātnē konstatēta Ki67 ekspresijas saistība ar audzēju malignitātes pakāpi galvenokārt ne-Hodžkina limfomas gadījumā [Gerdes et al., 1991]. Lai gan šūnu proliferācija ir tikai viens no audzēju raksturojošiem parametriem, kopumā tas jau sen tiek uzskatīts par prognostiski svarīgu imūnhistoķīmisko marķieri audzēju gadījumā [Brown et al., 1990]. Saistība starp paaugstinātu proliferācijas indeksu (PI) un sliktāku pacienta prognozi ir labi aprakstīta, piemēram, barības vada plakanšūnu vēža, ne-Hodžkina limfomas, ne-sīkšūnu plaušu vēža, dzemdes kakla, aizkuņģa dziedzera galviņas un prostatas vēža gadījumos [Ghanem et al., 2004]. Attiecībā uz nefroblastomu jautājums par Ki67 imūnohistoķīmiskās noteikšanas klīnisko nozīmi ir diskutabls. Mazens Ahmeds Ghanems savā nefroblastomas prognostiskajiem marķieriem veltītajā, 2005. gadā veiktajā literatūras apskatā gan ir iekļāvis arī šūnu proliferācijas marķierus [Ghanem et al., 2005], taču analizētās literatūras dati nav pilnībā pārliecinoši. Publicēti ir tikai nedaudzi pētījumi, pie tam dažādi zinātnieki sniedz dažādus datus netikai par to saistību ar klīniskajiem rādītājiem, bet arī par reakcijas intensitāti un PI lielumu nefroblastomas histoloģiskajos komponentos. Sākotnēji, 1994. gadā veiktā pētījumā analizēta cita kodolos lokalizētā, šūnu proliferāciju raksturojošā antigēna PCNA reaktivitāte. Minētajā darbā pētīti 27 dažādi bērnu vecuma nieru audzēji ieskaitot nefroblastomu ar un bez anaplāzijas, nieru šūnu karcinomu, iedzimtu mezoblastisku nefromu un sarkomatozu nieru audzēju. PCNA ekspresijas saistība ar pacientu dzīvildzi netika konstatēta ne nefroblastomas, ne citu bērnu vecuma nieru audzēju gadījumā. Tāpat nebija būtiskas proliferatīvās aktivitātes atšķirības starp dažādu histoloģisko tipu ļaundabīgajiem pediatrikajiem nieru jaunveidojumiem. [Nagoshi et al., 1994]. Tajā pašā gadā cita zinātnieku grupa, pētot PCNA ekspresijas saistību ar klīniskajiem un histopatoloģiskajiem datiem 26 nefroblastomu gadījumos, noskaidroja, ka proliferācija nefroblastomas blastematozajā un epiteliālajā komponentā ir būtiski augstāka nekā stromālajā. PCNA pozitīvo šūnu skaits blastematozajā daļā bija robežās no 18.9% līdz 81.4%, epiteliālajā daļā no 24.1% līdz 74.2%, bet stromālajā daļā no 3.4% līdz 64.7%. Šajā publikācijā arī atspoguļota statistiski būtiski samazināta dzīvildze ($p=0.049$) pacientiem ar augstu proliferatīvo aktivitāti salīdzinot ar pacientiem ar zemu proliferatīvo aktivitāti audzēja audos pirms operācijas ķīmijterapeitiski ārstēto nefroblastomu grupā. Gadījumos, kad primāri izdarīta nefrektomija un ķīmijterapija sekoja pēc tam, dzīvildzes saistību ar PCNA pozitīvo šūnu skaitu nenovēroja [Delahunt et al., 1994]. Savukārt, pielietojot gan PCNA, gan MIB-1 antigēnu imūnhistoķīmisko noteikšanu 8 nefroblastomu audos visaugstākā proliferatīvā aktivitāte konstatēta epiteliālajā komponentā, ar PCNA marķieri noteiktais PI vidējais lielums epiteliālajā komponentā bija 55,5% (diapazons no 40 līdz 80%), kas ir būtiski augstāks ($p < 0.001$) nekā blastematozajā komponentā ($M=34.1\%$, diapazons no 17,5 % līdz 76,5%) un stromā ($M=14.9\%$, diapazons no 5% līdz 24%). Lai gan līdzīgs rezultāts tika sasniegts arī lietojot antivielu MIB-1 antigēna noteikšanai, daļā gadījumu reakcija bija negatīva, izvērtējums veikts tikai 5 no 8 gadījumiem [Khine et al., 1994]. 1997. gadā poļu zinātnieku veiktā pētījumā arī atrasts būtiski lielāks MIB1 pozitīvo šūnu skaits epiteliālajā ($M=23.7\%$) un blastematozajā

komponentā (M=22.3%) salīdzinot ar stromālo (M=3.3%), pie tam, pirms operācijas ķīmijterapeitiski ārstēto audzēju audos salīdzinot ar neārstētajiem tas bija augstāks epiteliālajā komponentā, bet zemāks blastematozajā. Gan epiteliālā, gan blastematozajā komponentā konstatētā paaugstinātā MIB1 ekspresija (par paaugstinātu uzskatīts PI augstāks par 20%) saistījās ar sliktu pacientu prognozi, sevišķi tad, ja liels pozitīvo šūnu skaits pirms operācijas periodā ķīmijterapeitiski ārstētas nefroblastomas blastematozajā daļā vēl joprojām bija augsts [Juszkiewicz et al., 1997]. Nesenāk veiktos pētījumos pirms operācijas ķīmijterapeitiski ārstēto nefroblastomu audos pielietojot antivielu MIB1 antigēna noteikšanai arī visaugstākā proliferatīvā aktivitāte konstatēta epiteliālajā komponentā (M=19.9%, diapazons no 0% līdz 53%) starpība starp to un atbilstošā marķiera reaktivitāti blastematozajā (M=9.4%, diapazons no 0% līdz 42%) komponentā statistiski būtiski atšķīrās ($p < 0.01$), taču 11% no analizētajiem gadījumiem reakcija bija negatīva, ja par pozitīvu tiek uzskatīts PI augstāks par 5%. Vienfaktora dispersijas analizē netika konstatēta sakarība starp audzēja stadiju un pozitīvo šūnu daudzumu epiteliālajā vai blastematozajā komponentā, taču bija saistība starp MIB-1 ekspresiju blastematozajā komponentā un pacienta dzīvildzi. Pretstatā tam nebija saistības starp pacienta dzīvildzi un MIB-1 pozitīvo šūnu daudzumu epiteliālajā komponentā [Ghanem et al., 2004]. Šis pētījums gan izraisīja diskusijas to publicējošā žurnāla „Clinical Cancer Research” slejās. Minētais izdevums saņēma redaktoriem adresētu vēstuli ar norādi, ka pētījumā nav atspoguļots analizēto audzēju sadalījums pēc histoloģiskajiem tipiem, lai gan ir noteikta MIB-1 ekspresija katrā histoloģiskajā komponentā atsevišķi. Ja pirms operācijas ir izdarīta ķīmijterapija, tad blastematoza tipa nefroblastomas ietilpst augstas malignitātes audzēju grupā. Vēstules autori izteica domu, ka samazināto pacientu dzīvildzi šajā gadījumā nosaka nevis palielinātais MIB-1 pozitīvo šūnu daudzums, bet gan fakts, ka pētītajā grupā prevalē blastematoza tipa audzēji. [Jones et al., 2004]. Savā atbildē vēstules autoriem Mazens Ahmeds Ghanems paskaidro, ka no 62 pacientu lielās pētītās grupas blastematoza tipa audzēji atrasti tikai 3 gadījumos, līdz ar to nevar runāt par prevalējošā histoloģiskā tipa ietekmi uz rezultātu [Ghanem, 2004]. Turpinot pētniecisko darbu, šī pati autoru grupa M. A. Ghanema vadībā analizējusi PI nozīmi tajos gadījumos, kad primāri ir veikta nefrektomija un audzēja izņemšana ar sekojošu ķīmijterapiju. Šajā gadījumā nebija būtiskas atšķirības starp MIB1 pozitīvo šūnu skaitu nefroblastomas epiteliālajā un blastematozajā komponentā, blastematozajā vidējais proliferācijas indekss bija 32,8% (diapazons no 0% līdz 80%), bet epiteliālajā 34,1% (diapazons no 0% līdz 85%). Netika arī konstatēta epiteliālā komponenta reaktivitātes saistība ar pacienta dzīvildzi vai audzēja stadiju. Vienfaktora dispersijas analizē parādījās blastematozā MIB-1 saistība ar progresējošu slimības gaitu, bet Koksa regresijas analizē netika atrasta saistība starp šo parametru un klīniskajiem rādītājiem. Arī šajā pētījumā 19% no gadījumiem reakcija MIB1 antigēna noteikšanai bija negatīva, bet kopumā PI primāri operētas nefroblastomas audos gan epiteliālajā, gan blastematozajā komponentā bija augstāks nekā tad, ja pirms operācijas tika veikta ķīmijterapija [Ghanem et al., 2011]. Arī franču zinātnieki 2008 gadā analizējuši proliferācijas indeksu pirms operācijas ārstētu nefroblastomu audos izmantojot Ki67 imūnhistoķīmisko noteikšanu. Vidējais proliferācijas indekss neanalizējot sīkāk atsevišķas grupas bija 33% blastēmas šūnās, 10% stromā un 29.5% epiteliālajā

komponentā. Netika konstatēta būtiska proliferatīvās aktivitātes atšķirība nevienā no komponentiem dažādu histoloģisko tipu nefroblastomās. Vienfaktora dispersijas analizē atrasta saistība starp Ki67 ekspresiju blastematozajā daļā un metastāžu esamību pacientam ($p < 10^{-4}$), atbilstošu saistību starp metastāzēm un proliferācijas indeksu epiteliālajā vai stromālajā komponentā neatrod (attiecīgi $p = 0.29$ and $p = 0.90$). Papildus šajā darbā autori fokusējuši uzmanību uz vidējas malignitātes pakāpes audzējiem. Vidējais Ki67 līmenis primārā audzēja audos gadījumos kad konstatētas arī metastāzes bija 61% (diapazons 60%-91%). Ja metastāžu nebija vidējais PI bija 25% (diapazons 3%-69%). Izmantojot klasifikācijas un regresijas koku algoritmu tika noteikts 40% liels (sensitivitāte 0.75, specifiskums 0.85), metastāzes prognozējošais kritiskais Ki67 lielums blastematozajā komponentā vidējas malignitātes audzēju gadījumā [Berrebi et al., 2008]. 2010. gadā veiktā pētījumā tika analizēta Ki67 ekspresija 48 pacientu nefroblastomu audos, grupā iekļauti gan audzēji pēc pre-operatīvas ķīmijterapijas, gan primāras nefrektomijas gadījumi. Visas nefroblastomas atkarībā no prevalējošā histoloģiskā komponenta iedalīja trijās grupās, epiteliāla, blastematoza un jaukta tipa. Atsevišķā grupā iekļāva anaplastiskus audzējus. Blastematoza tipa gadījumā, analizējot rādītājus neatkarīgi no pirmsoperācijas veiktās ķīmijterapijas, vidējais PI bija 12,3% (diapazons no 0% līdz 58%), epiteliāla tipa- 21,4% (diapazons no 0% līdz 76%). Jauktajos un anaplastiskajos audzējos Ki67 ekspresiju analizēja atsevišķi katrā histoloģiskajā komponentā- jauktajam tipam blastematozajā komponentā vidējais PI bija 10% (diapazons no 1% līdz 36%), epiteliālajā-33% (diapazons no 7% līdz 74%), bet stromā 31,5% (diapazons 0% līdz 65%). Anaplastiskajam difūzā tipam blastematozajā komponentā vidējais proliferācijas indekss bija 20% (diapazons no 12% līdz 78%), epiteliālajā-31% (diapazons no 18% līdz 79%), bet stromā 21% (diapazons 13% līdz 37%). Pozitīva Ki67 ekspresija netika atrasta fokālas anaplāzijas, stromāla un regresīva tipa audzēju audos, par negatīvu uzskatot PI mazāku par 5%. Analizējot datus statistiski, konstatēts, ka kopumā proliferācijas indekss ir būtiski paaugstināts epiteliālajā komponentā salīdzinot ar blastematozo ($p = 0,001$), bet nav atšķirības starp reakcijas intensitāti pirms operācijas periodā ārstēto un primāri operēto nefroblastomu grupās ($p = 0,746$). Interesanti, ka PI bija statistiski būtiski paaugstināts I/II stadijas audzējiem salīdzinot ar III/IV/V stadijas audzēju grupu ($p = 0,002$). Minēto atradni autori izskaidro ar to, ka I un II stadijas gadījumā prevalējoši bija epiteliāla tipa veidojumi, kuriem raksturīga paaugstināta Ki67 ekspresija attiecībā pret blastēmas šūnām. Epiteliālais komponents ir arī augstāk diferencēts salīdzinot ar blastematozo, līdz ar to mazāk jūtīgs pret ķīmijterapiju. Šo iemeslu dēļ, pētnieki izdarījuši secinājumu, ka Ki67 imūnhistoķīmisko noteikšana nedod būtisku ieguldījumu pirmsoperācijas periodā ārstētu nefroblastomu iespējamās prognozes izvērtēšanā [Jurić et al., 2010].

1.2.4. Audzēju nomācēja gēna p53 proteīns

Cilvēka šūnās esošais p53 ir nukleārs fosfoproteīns ar molekulāro masu 53 kDa. Proteīna nosaukums ir atsauce uz tā molekulāro masu. Savvaļas tipa p53 proteīns sastāv no 393 aminoskābēm, kuras strukturāli un funkcionāli ir sadalītas vairākos domēnos.

Tā N terminālajā daļā ietilpst transaktivācijas jeb amino-terminālais domēns (satur aminoskābes no 1 līdz 42) un ar prolinu bagāts reģions (satur aminoskābes 61-94). Centrālā jeb DNS saistošā daļa ietver aminoskābes no 102 līdz 292, bet C terminālā daļa sastāv no divām daļām: oligomerizācijas domēna (satur aminoskābes no 324 līdz 355) un karboksilterminālā regulējošā domēna (satur aminoskābes no 363 līdz 393) [Bai et al., 2006]. Minētais proteīns tika aprakstīts 1979 gadā ar metilholantrēnu ierosināta audzēja šūnās pelēm [De Leo et al., 1979], kā arī SV40 vīrusa transformētās šūnās [Linzer et al., 1979]. To kodējošais p53 jeb TP53 gēns ir lokalizēts 17 hromosomas īsajā plecā (17p13.1). [Wales et al., 1995], tas ir 20 Kb liels un sastāv no 11 eksoniem un 10 introniem. P53 gēna būtiskākā īpatnība ir tā spēja darboties vai nu kā dominantam onkogēnam vai nu kā recesīvam audzēju nomācējgēnam. Minētais gēns un tā produkts p53 proteīns sāka piesaistīt intensīvu zinātnieku interesi pēc tam kad tika konstatētas tā mutācijas vairāk nekā 50% ļaundabīgo audzēju gadījumā, tas ir visbiežāk inaktivētais gēns onkoloģiskajiem pacientiem [Bai et al., 2006]. Ģenētiski bojājumi, kuros iesaistītas abas alēles rada savvaļas tipa p53 ekspresijas zudumu. To var izraisīt, piemēram, vienas gēna alēles zudums hromosomu translokācijas rezultātā, kas kombinējas ar punktveida mutācijām otrā alēlē. Savvaļas tipa p53 proteīnam ir negatīva ietekme uz šūnu augšanu un dalīšanos. Saistot specifiskas DNS sekvences tas ir spējīgs samazināt vairāku gēnu (piemēram, MDM2) transkripciju un kalpot nekontrolētas šūnu dalīšanās novēršanai. Mutācijas rada p53 fosfoproteīna DNS saistīšanas un transkripcijas regulācijas lomas zudumu ar sekojošu proliferāciju ierobežojošo funkciju zudumu, DNS bojājumu un pieaugošu genoma nestabilitāti veicinot gēna amplifikāciju. Normāli p53 līmenis šūnā ir zems un šim proteīnam ir arī ļoti īss pussabrukšanas periods (aptuveni 20 minūtes). Mutācijas rezultātā izmainītajam proteīnam ir patoloģiska uzbūve, visbiežāk novēro tā fosforilizāciju vai acetilizāciju [Bai et al., 2006]. Rezultātā tiek traucēta DNS saistīšanās un pagarinās tā pussabrukšanas periods. Tas izpaužas ar imūnhistoķīmiski nosakāmu nukleāru p53 ekspresiju gandrīz visos audzējos, kuros konstatētas gēna mutācijas. Kopumā ir konstatēta cieša saistība starp imūnhistoķīmiski noteikto p53 ekspresiju un ar DNS sekvencēšanu noteiktajām gēna mutācijām [Leong et al., 2003]. Attiecībā uz nefroblastomu gan literatūrā ir atrodams fakts, ka minētā gēna mutācijas ir sastopamas retāk nekā p53 proteīna imūnhistoķīmiska ekspresija. Atsevišķi pētnieki atrod p53 gēna izmaiņas tikai 9,5% no nefroblastomas gadījumiem, lai gan šī atradne kombinējas ar augstāku (III-IV) stadiju un audzēja anaplāziju [Malkin et al., 1994]. Citā darbā p53 gēna mutācijas atrastas 17% no analizētajiem paraugiem, bet imūnhistoķīmiskā p53 ekspresija novērota 60%. Autori izteikuši domu, ka paaugstinātā imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitāte nav saistīta ar to kodējošā gēna izmaiņām, bet gan ar p53 proteīna inaktivāciju un uzkrāšanos, ko var izraisīt tā saistīšanās ar citiem proteīniem, piemēram, WT1, MDM-2 vai Bcl-2. Šajā pētījumā atrasta paaugstināta p53 imūnhistoķīmiska ekspresija, tajos audzējos, kuriem novēro metastāzes vai recidīvu, neatkarīgi no kodējošā gēna mutāciju esamības, taču visos gadījumos, kad konstatētas gēna izmaiņas, bija arī nefroblastomas metastāzes vai recidīvs [Lahoti et al., 1996]. Kopumā lielākā daļa zinātnieku atzīmē imūnhistoķīmiskās p53 ekspresijas saistību ar nefroblastomas anaplāzijas pakāpi un sliktāku prognozi. Jau sākotnējos pētījumos konstatēta būtiski palielināts p53 pozitīvo šūnu daudzums anaplastisku (unfavourable histology)

nefroblastomu audos salīdzinot ar ne-anaplastiskiem audzējiem ($p=0.021$), pie tam reakcijas intensitāte ir augstāka epiteliālajā un blastematozajā komponentā salīdzinot ar stromu [Cheah et al., 1996]. Viens no plašākajiem pētījumiem publicēts 1998. gadā un aptver 93 nefroblastomas gadījumus. Kopumā negatīva (mazāka par 5%) vai neliela (6-50%) p53 ekspresija atrasta 85 no 93 paraugiem, augsta reakcijas intensitāti (50-100%) novēro tikai 8 gadījumos. Taču analizējot rezultātus atsevišķi nelabvēlīgas un labvēlīgas histoloģiskās ainas audzējiem, tika konstatēts būtiski palielināts p53 pozitīvo šūnu daudzums nelabvēlīgas histoloģiskās ainas gadījumā ($p<0,001$), jo 5 no 7 nelabvēlīgās histoloģiskās ainas audzējiem (71,4%) atrod augstu reakcijas intensitāti, kamēr analogisku ainu labvēlīgas histoloģiskās ainas audzējos novēro tikai 3 no 86 gadījumiem (3,5%). Anaplastisko nefroblastomu audos pozitīvu p53 ekspresiju novēroja gan anaplastiski izmainītajos, gan neizmainītajos audzēja audos. Augstu reakcijas intensitāti konstatēja visos histoloģiskajos komponentos ieskaitot stromu. Analizējot rezultātus attiecībā uz audzēju stadiju tika atrasta statistiski būtiska saistība starp to un p53 pozitīvo šūnu skaitu ($p=0,004$), taču mazais V stadijas audzēju skaits (1 gadījums) autoriem lika apšaubīt konstatētās saistības klīnisko nozīmīgumu. Netika atklāta būtiska starpība starp audzējiem, kuri pirmsoperācijas periodā saņēmuši ķīmijterapiju un primāras nefrektomijas gadījumiem ($p=0,678$). Analogiski atšķirīgu p53 ekspresiju nenovēro atsevišķi pētīt pacientu grupas ar audzēja recidīvu un bez tā un mirušos slimniekus ($p=0,238$). Analizējot pacientu dzīvildzi konstatēta būtiska atšķirība ($p=0,0003$) starp pacientu grupām ar nelielu un augstu reakcijas intensitāti. Pacientiem ar zemu p53 ekspresiju vidējā novērotā dzīvildze bija 24,8 mēneši, bet pacientiem ar augstu p53 ekspresiju- 12,6 mēneši [Govender et al., 1998]. Līdzīgi 2001. gadā veiktā pētījumā, apkopojot datus par 21 nefroblastomu novērota saistība starp p53 pozitīvo šūnu skaitu, pacienta dzīvildzi un veidojuma anaplāzijas pakāpi [Beniers et al., 2001]. Citā publikācijā imūnhistoķīmiski analizējot p53 ekspresiju dažādas histoloģiskās ainas gadījumā atrasta būtisku atšķirību ($p=0.001$) starp nefroblastomām ar labvēlīgu histoloģisko ainu vai kodolu atipiju (angļu val. nuclear unrest) un anaplastisko audzēju gadījumiem: respektīvi p53 pozitīvo šūnu skaits attiecīgajās grupās ir 8,3%, 4% un 76% [Hill et al., 2003]. Vienā pētījumā konstatēta atšķirība starp audzējiem ar p53 pozitīvo šūnu daudzumu augstāku par 20% un zemāku par tiem. Augstas ekspresijas grupā audzēja stadija bija augstāka un biežāk novēroja metastāžu attīstību ($p<0.05$) salīdzinot ar zemas ekspresijas grupu, tādēļ autori ieteikuši p53 noteikšanu izmantot augsta un zema riska pacientu atšķiršanai. [Skotnicka-Klonowicz et al., 2001]. Retāku ($p=0.038$) nefroblastomas metastāžu attīstību (5% no gadījumiem) zemas reakcijas intensitātes grupā salīdzinot ar augstas reakcijas intensitātes grupu (31% no gadījumiem) novēroja vēl vienā darbā. Šajā gadījumā gan neatrada p53 ekspresijas saistību ar audzēja anaplāzijas pakāpi, bet tā bija biežāka blastematoza tipa nefroblastomās salīdzinot ar stromāla un epiteliāla tipa audzējiem. Tāpat tika konstatēta saistība starp audzēja stadiju un p53 pozitīvo šūnu skaitu [Sredni et al., 2001]. Tajā pašā laikā atsevišķi pētīt tikai labvēlīgas histoloģiskās ainas nefroblastomas primāri izdarītas nefrektomijas gadījumā netika konstatēta statistiski būtiska saistība starp p53 ekspresiju un audzēja stadiju ($p>0.3$) vai pacienta prognozi ($p>0.3$). Minētajā pētījumā pozitīva reakcija novērota tikai 8% no gadījumiem [D'Angelo et al., 2003]. Pēdējā laika publikācijās, līdzīgi kā

iepriekš apkopotajos pētījumos, atzīmē izteiktu p53 ekspresiju anaplastiskos audzējos salīdzinot ar labvēlīgas histoloģiskās ainas gadījumā novēroto ($p < 0,001$), būtiski samazinātu dzīvildzi p53 pozitīvo pacientu grupā salīdzinot ar negatīvajiem gadījumiem ($p < 0,01$), taču netiek atrasta saistība starp reakcijas intensitāti un audzēja stadiju [Jadali et al., 2011].

1.2.5. Šūnu adhēzijas molekula e-kadherīns

Kadherīni ir šūnu virsmas glikoproteīni, kuri ir iesaistīti Ca^{2+} atkarīgajā šūnu adhēzijas mehānismā, kurš darbojas vairumā cilvēka audu. Tiem ir nozīmīga loma embrionālo audu attīstībā un morfoģenēzē, kā arī nobriedušu audu normālajā funkcijā un struktūrā. Nomācot kadherīnu darbību ar specifiskām antivielām tiek izraisīta šūnu disasociācija, kas liecina par fundamentālu šo molekulu nozīmi saglabājot daudzšūnu struktūras. Tie iedalās vairākās apakšklasēs, tostarp E-, N-un P-kadherīns. Visas apakšklases ir līdzīgas pēc molekulārās masas un jūtības pret proteāzēm, bet tām ir atšķirīga imunoloģiskā specifika un izplatība audos [Takeichi, 1988]. E-kadherīns (saukts arī par epiteliālo kadherīnu, uvomorulīnu vai teratokarcinomas kadherīnu) ir 120 kDa liels polipeptīds [Gumbiner et al., 1986]. Tas lokalizēts vairumā epiteliālo audu zonula adherens rajonā, nodrošina epiteliālo šūnu polaritāti un glandulāro diferenciaciju un tam ir būtiska nozīme epiteliālo struktūru attīstībā [Ramburan et al., 2006]. Piemēram, nieru embriogēnēzē noteiktā secībā noritošā e-kadherīna ekspresija un sekojošā šūnu adhēzija nodrošina polarizētā epitēlija pareizu uzvietošanu nefronā [Piepenhagen et al., 1998]. E-kadherīna jeb CDH1 gēns ir lokalizēts 16 hromosomā (16q22.1) [Leong et al., 2003]. Ir pierādīta e-kadherīna kā audzēja supresora gēna nozīme un konstatētas tā mutācijas difūza kuņģa vēža, olnīcu, endometrija un lobulāra krūts vēža gadījumā [Becker et al., 1994; Berx et al., 1995; Risinger et al., 1994], kā arī pierādīta samazinātas e-kadherīna ekspresijas saistība ar sliktāku reakciju uz ķīmijterapiju kuņģa vēža gadījumā [Graziano et al., 2004]. Eksperimentālos pētījumos novērots, ka nediferencēta krūts vēža šūnu invāzija kolagēna gēlā var tikt novērsta pievienojot e-kadherīnam atbilstošu DNS, bet atkal var tikt atjaunota pievienojot anti kadherīna antivielas [Maw et al., 1992]. Attiecībā uz nefroblastomām, datu par CDH1 gēna izmaiņu un tā kodētā e-kadherīna imūnhistoķīmiskās ekspresijas lomu ir samērā maz. Pārsvārā tie liecina par samazinātas reakcijas intensitātes saistību ar lielāku malignitātes potenciālu. Kā jau minēts nodaļā 1.1.2., līdz 25% no nefroblastomas gadījumiem ir konstatēts 16q lokusa heterozigotitātes trūkums [Schulz et al., 2000] un atsevišķi autori uzskata, ka 16q hromosomā var būt lokalizēts trešais Vilmsa tumora jeb WT3 gēns [Maw et al., 1992; Tay, 1995]. Pacientiem ar minētajām izmaiņām aprakstīti ievērojami sliktāki 5 gadu dzīvildzes rādītāji, kā arī biežāki nefroblastomas recidīvi [Grundy et al., 2005]. Tā kā e-kadherīnu kodējošais gēns arī atrodas minētajā 16q lokusā, šī gēna izmaiņas un tā produkta imūnhistoķīmiskā ekspresija ir izraisījušas vairāku pētnieku interesi. Tomēr e-kadherīna cDNS amplifikācijas un sekvencēšanas rezultāti liecina par to, ka nefroblastomas gadījumā CDH1 nedarbojas kā tipisks audzēju nomācējgēns, jo e-kadherīna alēles zudums novērots tikai 10% gadījumu un tas

sasaistīts ar gēna polimorfismu [Schulz et al., 2000]. Minētajā pētījumā paralēli reversās transkripcijas PCR izdarīta arī e-kadherīna imūnhistoķīmiskā noteikšana. Kopumā nav atrasta imūnhistoķīmiski konstatētās e-kadherīna lokalizācijas šūnā vai ekspresijas intensitātes saistība ar progresējošu slimības gaitu, lai gan atrasta netipiska apikāla e-kadherīna ekspresija vienai nefroblastomai, kuras gadījumā bijis audzēja recidīvs un bilaterāla malignā procesa attīstība. Trijās no trīsdesmit nefroblastomām reakcija e-kadherīna noteikšanai bija negatīva, visos trijos gadījumos novēroja audzēja metastāzes [Schulz et al., 2000]. Daži autori apraksta statistiski būtiski samazinātu imūnhistoķīmisko e-kadherīna ekspresiju ($p < 0,01$) IV stadijas nefroblastomas gadījumā salīdzinot ar I stadijas veidojumiem, taču gēna mutācijas šajā gadījumā konstatētas gan IV, gan I stadijas audzēju gadījumā un to atradnei nebija saistības ar nefroblastomas klīnisko gaitu [Safford et al., 2005]. Tāpat ir konstatēta zemāka reakcijas intensitāte metastātiskajos audzējos un samazināta reakcijas intensitāte anaplastiskos audzējos [Alami et al., 2003]. Arī pētot e-kadherīna ekspresiju šūnu kultūrā, kura iegūta veicot nefroblastomas plaušu metastāzes subkutānu ksenotransplantāciju pelei, konstatēta pilnīga reakcijas negativitāte [Alami et al., 2003]. Savukārt 2006. gadā veiktā pētījumā, kurš aptver 140 pacientus, netika konstatēta saistība starp e-kadherīna imūnhistoķīmisko ekspresiju, nefroblastomas stadiju un pacienta dzīvildzi, bet tika atrasta statistiski būtiski paaugstināta reakcijas intensitāte ($p = 0,003$) pirms operācijas veiktās ķīmijterapijas gadījumā [Ramburan et al., 2006].

1.2.6. Vilmsa audzēja nomācēja gēna (WT1) proteīns

Kā jau iepriekš teikts, WT1 jeb Vilmsa audzēja nomācējgēns ir lokalizēts 11 hromosomas īsā pleca 13 lokusā (11p13), tas ir 50 kb liels un sastāv no 10 eksoniem [Mrowka et al., 2000]. Sākotnēji aprakstīta tikai šī gēna izmaiņu loma nefroblastomas ģenēzē, bet pēdējā laikā publikācijās atzīmē arī onkogēniem raksturīgo iesaistīšanos proliferācijas un apoptozes procesos [Huff, 2011]. Minētais gēns kodē multiplas cinka pirkstiņus saturošas transkripcijas faktoru izoformas, kurām ir svarīga loma normālajā uroģenitālās sistēmas orgānu attīstības procesā (sk. nodaļu 1.1.2.). Visas iepriekš minētās WT1 proteīna izoformas satur četrus EGR-dzimtas C2H2-tipa cinka pirkstiņus pie 323-347, 353-377, 383-405, 414-438 un 57 aminoskābēm, kā arī ar prolīnu bagātu reģionu (27-83), kurš atpazīst un saista DNS sekvenci 5'-CGCCCCCGC-3'. Proteīns ir 45 līdz 49 kDa liels [Haber et al., 1991]. Pašlaik ir atklātas vismaz 36 WT1 proteīna izoformas, kuras rodas dažādu eksonu alternatīvas saspiešanas procesa rezultātā [Parenti et al., 2012]. Pētot embrionālos audus, negatīva imūnhistoķīmiskā WT1 proteīna ekspresija ir aprakstīta embrija bojāejas, nieru, gonādu un dažādu mezotēlija struktūru attīstības defektu gadījumā. Normā embriionālajos audos konstatēta pozitīva reakcija mezonefrītiskajos un metanefrītiskajos glomerulos, metanefrītiskās blastēmas šūnās celomiskā epitēlija struktūrās (pleira, vēderplēve un serozās virsmas) un dzimumdziedzeros. Fetālajos mezenhimālajos audos līdzīga kodolu pozitīvitāte atrasta mezenhimālajās šūnās ap Millera un Volfa vadiem, kā arī submezoteliālajās šūnās zem celomiskā epitēlija struktūrām. Pozitīvu citoplazmatisku reakciju WT1 proteīna

noteikšanai atzīmē embrionālajās skeleta un sirds muskulatūras un endoteliālajās šūnās [Parenti et al., 2012]. Runājot par nobriedušiem audiem, minētais proteīns tiek ekspresēts mezotēlija šūnās un ir aprakstīta tā nukleāra pozitivitāte mezoteliomas gadījumā [Leong et al., 2003]. Nieru audos pētījumā, kurš aptver cilvēkus sākot no jaundzimušā perioda līdz 80 gadu vecumam, WT1 nukleāra pozitivitāte aprakstīta atsevišķās kamoliņu šūnās un podocītos [Mundlos et al., 1993]. Neoplastiskajos audos, bez iepriekšminētās mezoteliomas, pozitīvu kodolu reakciju visbiežāk novēro serozu olnīcu audzēju un DSRCT gadījumā (sk. nodaļu 1.1.2), bet ir aprakstīta arī WT1 proteīna imūnhistoķīmiska ekspresija akūtu leukēmiju, krūts dziedera vēža un nieru karcinomas šūnās [Loeb et al., 2002]. Interesanti, ka citoplazmatiska endoteliāla WT1 proteīna pozitivitāte ir konstatēta lielākajā daļā vaskulāras ģenēzes audzēju un asinsvadu malformācijās [Trindade et al., 2011], rabdomiosarkomas šūnās [Carpentieri et al., 2002], kā arī nefroblastomās ar rabdomiosarkomatozu diferenciāciju [Bisceglia et al., 2009]. Šī citoplazmatiskā pozitivitāte vēl joprojām ir zinātnieku diskusiju avots. Sākotnēji tā tika interpretēta kā krusteniska reakcija ar epitopu, kurš nav saistīts ar WT1 [Charles et al., 1997]. Jaunākajās publikācijās parādās doma par WT1 gēna lomu rabdomiosarkomas ģenēzē un specifisku citoplazmatisku reaktivitāti [Carpentieri et al., 2002]. Runājot par marķiera prognostisko nozīmi, atsevišķi pētnieki norādījuši uz paaugstinātu WT1 proteīna imūnhistoķīmiskās ekspresijas saistību ar audzēja progresiju serozas olnīcu karcinomas gadījumā [Netinatsunthorn et al., 2006]. Nosakot WT1 gēna ekspresiju invazīva krūts vēža audos ar PCR metodi, konstatēta tā paaugstinātas ekspresija nelabvēlīga slimības iznākuma gadījumā [Miyoshi et al., 2002]. Kā jau minēts literatūras apskata sākumā, nefroblastomas gadījumā WT1 proteīna imūnhistoķīmisko noteikšanu lieto galvenokārt diferenciālās diagnostikas vajadzībām, jo tā pozitivitāte blastematozajā un primitīvajā epiteliālajā komponentā dažādās publikācijās aprakstīta no 70% līdz 100% no analizētajiem audzēja paraugiem [Barnaud et al., 1995; Bahrami et al., 2008; Bisceglia et al., 2009; Bahrami et al., 2008]. Tomēr atsevišķi autori apraksta arī iespējamo imūnhistoķīmiskās reakcijas saistību ar pacienta prognozi. Tā Mazens Ahmeds Ghanems 2000. gadā veiktajā pētījumā izmantojot pirms operācijas periodā ķīmijterapeitiski ārstētu audzēju audus ir konstatējis WT1 proteīna ekspresijas blastematozajā un epiteliālajā komponentā saistību ar augstāku audzēja stadiju ($p<0.05$). Blastematozā komponenta reaktivitāte arī bija saistīta ar progresējošu nefroblastomas gaitu un audzēja izraisītu nāvi ($\chi^2=0,003$), kamēr saistību starp reakcijas intensitāti epiteliālajā daļā un minētajiem klīniskajiem parametriem nenovēroja ($\chi^2=0,085$) [Ghanem et al., 2000]. Savukārt, izmeklējot pirms operācijas neārstētu vidējas malignitātes pakāpes audzēju audus, šī pati autoru grupa neatrod saistību starp WT1 proteīna ekspresiju kādā no histoloģiskajiem komponentiem un audzēja stadiju, taču arī šinī pētījumā konstatēta blastematozā komponenta reaktivitātes saistība ar progresējošu nefroblastomas gaitu [Ghanem et al., 2011]. Vēl vienā darbā norādīta statistiski būtiska saistība ($p=0.036$) starp minēto reakciju un audzēja stadiju, taču pētījumā autori nav norādījuši vai runa iet par pirms operācijas periodā ārstētu vai neārstētu nefroblastomu gadījumiem [Chen et al., 2004]. Attiecībā uz histoloģiski noteiktajām audzēja malignitātes pakāpēm poļu zinātniece Kateržina Tarana nekonstatē

saistību starp tām un WT1 proteīna ekspresiju epiteliālajā un blastematozajā nefroblastomas komponentā [Taran et al., 2008].

1.2.7. Angioģenēzes imūnhistoķīmiskie marķieri un mikroasinsvadu proliferācija

Angioģenēze jeb jaunu asinsvadu veidošanās no iepriekš eksistējošiem asinsvadiem ir process, kas fizioloģiski ir nepieciešams organisma augšanas un brūču dzīšanas procesos. Tajā pašā laikā angioģenēze ir nepieciešams priekšnosacījums, lai notiktu audzēja augšana un metastazēšanās solīdo ļaundabīgo jaunveidojumu gadījumā. Pašlaik tiek uzskatīts, ka palielināts mikroasinsvadu daudzums ir saistīts ar samazinātu dzīvildzi un paaugstinātu mitotisko indeksu vairumā audzēju. Pirmo reizi terminu angioģenēze sāka lietot 1787. gadā angļu ķirurgs Džons Hunters (John Hunter), bet cits ķirurgs Džūda Folkmans (Judah Folkman) pirmais izteica domu par tās būtisko lomu audzēju progresijā. 1971. gadā viņš publicēja rakstu izdevumā „New England Journal of Medicine”, kurā aprakstīta saistība starp asinsvadu veidošanos un jaunveidojumu augšanu. Kopš tā laika ir publicēti angioģenētiskajiem un anti angioģenētiskajiem faktoriem veltīti neskaitāmi pētījumi. Publikāciju skaits strauji pieauga arī pēc vaskulārā endoteliālā augšanas faktora (VEGF) atklāšanas 1989. gadā, kad par angioģenēzes ietekmi uz audzējiem ieinteresējās farmaceitiskās kompānijas. Piemēram, 2003. gadā publicēti 3000 šiem jautājumiem veltītu pētījumu [Hall, 2005]. Arī nefroblastomas gadījumā atrodams atsevišķas publikācijas par angioģenētisko marķieru un mikroasinsvadu skaita saistību ar klīniskajiem un histoloģiskajiem parametriem, lai gan ne minētie marķieri, ne asinsvadu skaits netiek pielietoti klīnikā nefroblastomas malignitātes potenciāla raksturošanai. Sākotnējos pētījumos eksperimentāli izraisīta cilvēka nefroblastomas audos pelei, fluorescences angiogrāfijā konstatēts patoloģisks asinsvadu zīmējums audzēja materiālā. Tas bija līdzīgs no VEGF atkarīgā tīklenes bojājuma asinsvadu zīmējumam [Rowe et al., 1999]. Tālākajos pētījumos, šī pati autoru grupa atradusi būtisku saistību starp VEGF ekspresiju un audzēja augšanu un metastazēšanos [Kayton et al., 1999] un audzēja lieluma samazināšanos ievadot anti-VEGF antivielas pelei izraisītās cilvēka nefroblastomas gadījumā [Rowe et al., 2000]. Cilvēkiem diagnosticētās nefroblastomas gadījumos ir aprakstīta palielināta mikroasinsvadu skaita (skaits noteikts audu apvidos ar vislielāko imūnhistoķīmiski CD31 pozitīvo mikroasinsvadu proliferāciju) saistība ar samazināto pacientu dzīvildzi ($p < 0,005$). Šajā pētījumā atzīmēts, ka vislielākais jaunveidoto kapilāru skaits atrodams audzēju blastematozajā komponentā. Paralēli, nosakot VEGF līmeni pacientu asins serumā, konstatēts 3 reizes paaugstināts tā līmenis salīdzinot ar kontroles grupu. Minētā atšķirība bija statistiski būtiska $p < 0,01$ līmenī [Sköldenberg et al., 2001]. Autors savā 2003. gada 2. jūnijā Upsalas universitātē aizstāvētajā doktora disertācijā “Angioģenēze pediatriko audzēju gadījumā” (“Angiogenesis in childhood malignancies”) arī raksta, ka viņa pētījuma rezultāti attiecībā uz nefroblastomu apstiprina jau iepriekš citu audzēju gadījumā izteikto domu par augstāku angioģenētisko potenciālu un pastiprinātu asinsvadu proliferācijas perēkļu (angļu val. - hot spot) veidošanos histoloģiski agresī-

vākajā audzēja daļā [Sköldenberg, 2003]. Vienā no pētījumiem salīdzināta angioģenēze pacientiem ar un bez nefroblastomas recidīva. Šajā gadījumā mikroasinsvadu vizualizācijai izmantota VIII faktora antigēna noteikšana. Pacientiem, kuriem konstatēts audzēja recidīvs tika atrasts lielāks sīko asinsvadu skaits nekā tiem, kuriem audzēja recidīvu neatzīmē ($34,9 \pm 2,9$ v $22,4 \pm 2$; $p < 0,05$). Līdzīgs rezultāts iegūts arī atsevišķi analizējot iepriekš minētos lielumus grupā ar labvēlīgu histoloģisko atradni ($32,4 \pm 2,7$ v $19 \pm 1,8$; $p < 0,05$) [Abramson et al., 2003]. Vēl vienā, 2003. gadā publicētā pētījumā, arī analizēta ar CD31 imūnhistoķīmiski vizualizēto asinsvadu proliferācija, kā arī VEGF un tā receptora Flt- ekspresija pirms operācijas ķīmijterapeitiski ārstēto nefroblastomu audos. Mikroasinsvadu skaits atradās robežās no 0 līdz 50 ar vidējo skaitu of 20,5, SD 14,8 (minētais lielums noteikts piecos redzes laukos ar vislielāko mikroasinsvadu skaitu, palielinājums $\times 250$). Šajā darbā konstatēta statistiski būtiska VEGF un Flt-1 ekspresijas blastematozā komponentā saistība ar veidojuma progresiju (p lielumi attiecīgi 0,0003 un 0,01) un audzēja izraisītu nāvi ($p < 0,05$), savukārt šo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijai epiteliālajā komponentā nebija prognostiskas nozīmes (p lielumi 0,58 un 0,07). Mikroasinsvadu skaita palielināšanās bija saistīta ar ļaundabīgā procesa progresiju ($p < 0,05$), bet netika atrasta tā ietekme uz audzēja izraisītu nāvi ($p > 0,05$). Mikroasinsvadu skaits bija statistiski būtiski paaugstināts tajos audzējos, kuros konstatēta intensīvāka VEGF un Flt-1 ekspresija gan epiteliālajā, gan blastematozajā komponentā [Ghanem et al., 2003]. Turpinot darbu analizēta arī CD31 imūnhistoķīmiski vizualizēto asinsvadu proliferācija un VEGF un Flt-1 ekspresija pirmsoperācijas periodā ķīmijterapeitiski neārstēto, neanaplastisku, vidējas malignitātes pakāpes nefroblastomu audos. Šajā gadījumā atrasta VEGF ekspresijas blastematozajā komponentā saistība ar audzēja progresiju ($p < 0,05$). Ne epiteliālā komponenta reaktivitātei, ne mikroasinsvadu skaitam nebija būtiskas ietekmes uz kādu no prognostiskajiem rādītājiem. Mikroasinsvadu skaits bija robežās no 3 līdz 90, vidējais skaits 43,3, SD 30. Tāpat kā iepriekšējā pētījumā konstatēta palielināta asinsvadu veidošanās tajos audzējos, kuru epiteliālā un blastematozajā komponentā pastiprināti ekspresējas VEGF un Flt-1 ($p < 0,05$) [Ghanem et al., 2011]. 2006. gadā veiktā pētījumā neatrada statistiski būtisku atšķirību starp ar CD34 un CD31 vizualizēto asinsvadu skaitu un dažādiem nefroblastomas histoloģiskajiem tipiem (vidējais ar CD34 noteiktais skaits bija 61,6, bet ar CD31 noteiktais skaits 97,2). Mikroasinsvadu skaita ietekme uz pacientu dzīvildzi difūzas un fokālas anaplāzijas gadījumā netika noteikta, jo minētajā grupā visi pacienti bija dzīvi. Autori šo atradni izskaidro ar faktu, ka anaplāzijas gadījumā tiek pielietotas agresīvākas ķīmijterapijas shēmas līdz ar to uzlabojot klīniskos radītājus. Tomēr arī šajā darbā, izmantojot Kaplana-Meijera metodi, konstatēta mikroasinsvadu skaita saistība ar pacientu dzīvildzi labvēlīgas histoloģiskās ainas gadījumā ($p < 0,05$). VEGF ekspresija konstatēta blastematozā un mezenhimālā komponentā, kā arī asinsvadu endotēlija citoplazmā. Epiteliālā komponenta tubulārajās struktūrās atrasta membranoza un bazāla citoplazmatiska pozitivitāte. Minētā atradne liek autoriem izteikt hipotēzi, ka nefroblastomas histoloģiskajos komponentos tiek sekretēts atšķirīgs VEGF subtips. Saistība starp VEGF ekspresiju un mikroasinsvadu skaitu netika konstatēta [Ozluk et al., 2006]. Interesanti, ka pētījumā, kurā analizēta tikai VEGF-C un tā receptora VEGFR

imūnhistoķīmiskā ekspresivitāte III stadijas intermediāras malignitātes ķīmijterapeitiski ārstētu ne-anaplastisku audzēju audos, konstatēta VEGF-C pozitivitāte visās blastematozā komponenta šūnās, 30% no stromas šūnām un pilnīga negativitāte epiteliālajā komponentā. Savukārt membranoza reakcija nosakot VEGFR-2 novērota lielākajā daļā stromas šūnu un displastiskajās audzēja tubulārajās struktūrās, bet netika konstatēta blastematozajā daļā. Šajā pētījumā atrasta statistiski būtiska saistība starp VEGF-C ekspresiju un abiem audzēja agresivitāti raksturojošiem rādītājiem: ļaundabīgā procesa progresiju ($p=0,0005$) un audzēja izraisītu nāvi ($p=0,0365$) [Nowicki et al., 2007].

1.2.8. Epiteliālo struktūru skaits un epiteliālie marķieri

Attiecībā uz nefroblastomu ir noskaidrots, ka pacientiem ar intensīvu tubulāru vai glomerulāro struktūru veidošanos audzēja audos ir labāka prognoze, nekā tiem, kuriem epiteliālo struktūru nav vispār vai to ir maz [Rosai, 2004]. Jau pirmajos NWTs pētījumos 1975. un 1977.gadā tika atklāta tubulāro struktūru skaita pieauguma saistība ar pacienta dzīvildzes pagarināšanos, pie tam šo struktūru skaits nebija saistīts ar citiem prognozi ietekmējošiem faktoriem kā, piemēram, pacienta vecumu vai audzēja stadiju [Lawler et al., 1975; Lawler et al., 1977]. Aptuveni tajā pašā laika posmā datētā publikācijā gan konstatēts, ka tubulāras diferenciācija nozīme pacienta prognozē ir mazāka nekā audzēja stadijai. Tāpat visiem pacientiem jaunākiem par 24 mēnešiem neatkarīgi no stadijas un epiteliālo struktūru daudzuma audzēja audos atrasts ilgāks no ļaundabīgā procesa progresijas brīvs periods [Chambers et al., 1978]. Pašlaik par visbūtiskākajiem pacienta prognozi ietekmējošiem faktoriem gan tiek uzskatīta audzēja stadija un anaplāzijas esamība vai neesamība [Perlman et al., 2004], taču, lai noskaidrotu dzīvildzi ietekmējošos faktorus labvēlīgas histoloģiskās ainas nefroblastomas gadījumā, atsevišķi autori pētījuši arī morfoloģiskās struktūras t.skaitā epiteliālās diferenciācijas ietekmi uz prognozi. Tā, 2010. gadā datētā publikācijā pirms operācijas ķīmijterapeitiski ārstētu audzēju gadījumā zinātnieki atspoguļo 90,2% lielu 5 gadu dzīvildzi epiteliāla tipa un 94,3% lielu 5 gadu dzīvildzi stromāla tipa nefroblastomu gadījumā salīdzinot ar analogisku 86,4% lielu rādītāju citu histoloģisko tipu vidējas malignitātes audzējiem. Šajā gadījumā nevar izslēgt arī stadijas ietemi uz rezultātu, jo 93% no epiteliālā tipa nefroblastomām veidoja I un II stadijas audzēji. Tomēr tika konstatēta statistiski būtiska atšķirības sarp I stadijas epiteliālā tipa un I stadijas citu histoloģisko tipu vidējas malignitātes pakāpes veidojumu pacientu dzīvildzi. Tā kā aprakstītajā pētījumā lielākā daļa pacientu bija jaunāki par 2 gadiem, tad par vecuma ietekmi uz prognozi izteikties bija grūti. Autori izdarījuši secinājumu, ka pirms operācijas ķīmijterapeitiski ārstēto audzēju grupā I stadijas epiteliāla un stromālā tipa nefroblastomām sagaidāma laba prognoze un tāpēc līdz minimumam samazināma pēcoperācijas periodā izdarāmā ķīmijterapija [Verschuur et al., 2010]. Imūnhistoķīmiska epiteliālo struktūru vizualizācija vairāk tiek lietota diferenciālās diagnostikas vajadzībām (sk. nodaļu 1.1.2). Tomēr vairākos pētījumos imūnhistoķīmiski izmeklējumi, piemēram citokeratīnu noteikšana, tiek lietoti epiteliālo struktūru

raksturošanai. Citokeratīni ir intermediāro filamentu proteīni, kuri veido visu epiteliālo šūnu citoskeleta struktūras. Tie tiek ekspresēti gan ļaundabīgās, gan malignā procesa neskartās šūnās atkarībā no to diferenciācijas pakāpes [Leong et al., 2003]. Pētot citokeratīna pozitīvo šūnu izvietojumu nefroblastomas audos (ieskaitot tā blastematozo komponentu) atklāti sekojoši ekspresijas tipi: 1) no atsevišķām, samērā tālu vienai no otras izvietotām pozitīvām šūnām veidotas grupas, kuras izvietotas negatīvā stromā. Arī citokeratīna pozitīvās šūnas satur tikai atsevišķas citokeratīna fibrillas; 2) fokāli pozitīvo šūnu sakopojumi ar labi izteiktu pozitīvu citoplazmatisku fibrilāru tīklojumu; 3) no pozitīvām šūnām veidotas rozetes bez skaidra lūmena veidošanās ar izteiktāku citokeratīna ekspresiju centrā; 4) tubulāras struktūras ar skaidru lūmenu. Citokeratīna ekspresija izteiktāka šūnu subapikālajā daļā [Denk et al., 1985]. Tāpat tiek atzīmēts, ka nediferencētās blastēmas šūnās ir atrodama vimentīna pozitivitāte, bet blastēmas šūnām diferencējoties parādās arī citokeratīna pozitīvas šūnas [Schmidt, 1989]. Savukārt attiecībā uz EMA ekspresiju nefroblastomas audos publicēts pētījums liecina, ka minētā marķiera pozitivitāte tiek konstatēta tubulāras diferenciācijas apvidos, bet to neatrod blastematozajā komponentā. Atšķirība būtiska $p < 0,01$ līmenī [Kumar et al., 1986].

2. MATERIĀLS UN METODES

2.1. Pētījuma uzbūve

Pētījuma mērķa populācija bija bērni un jaunieši no dzimšanas brīža līdz 18 gadu vecumam ar BKUS ķirurģiski ārstētiem primāriem nieru jaunveidojumiem vai to metastāzēm. Analizētie audzēji diagnosticēti laika posmā no 1997. gada janvāra līdz 2012. gada jūlijam. Pētījuma uzbūve laikā bija kombinēta. No 1997. gada janvārim līdz 2008. gada decembrim diagnosticētie veidojumi analizēti retrospektīvi, bet laika posmā no 2008. gada decembrim līdz 2012. gada jūlijam diagnosticēto audzēju pacienti novēroti pētījuma laikā. Ja nieres biopsija vai nefrektomija izdarīta sekundāru nieru audzēju vai retroperitoneālu jaunveidojumu (neiroblastoma ar invāziju nierē) dēļ, tā materiāls pētījumā netika iekļauts. Diagnosticēto audzēju audu histoloģiskais materiāls, BKUS Bērnu patoloģijas birojā noteiktās morfoloģiskās diagnozes un slimnieku klīnisko slimības vēsturu dati (tai skaitā personu apliecinošie), iegūti no BKUS arhīva. Materiāli no laika posmā no 2008. gada decembrim līdz 2012. gada jūlijam novēroto slimnieku klīniskajām slimības vēsturēm papildus saņemti pielietojot slimnīcas iekšējo elektronisko pacientu datu bāzi „Andromeda”. Darbā analizēti no klīniskajām slimības vēsturēm iegūtie dati par ķīmijterapijas veikšanu pirms vai pēc operācijas, audzēja stadiju, pavadošajām slimībām un ģenētisko patoloģiju, audzēja progresiju vai remisiju, kā arī par pacienta dzīvildzi. Pētījumā analizētā nefroblastomu histoloģiskā malignitātes pakāpe noteikta salīdzinot pārskata mikroskopijā noteikto audzēja histoloģisko tipu ar klīniskajās slimības vēsturēs iegūtajiem datiem attiecībā uz preoperatīvas ķīmijterapijas izdarīšanu. Dati par pacientu dzīvildzi papildus pārbaudīti izmantojot LR Iekšlietu ministrijas Pilsonības un migrācijas lietu pārvaldes piedāvāto elektronisko pakalpojumu portālā www.latvija.lv - „Pārbaude, vai persona ir iekļauta Iedzīvotāju reģistrā un vai nav ziņu par personas nāvi”. Pēdējā datu salīdzināšana veikta 2012. gada 10. jūlijā. Potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija primāras nefroblastomas gadījumā analizēta sadalot audzējus atkarībā no stadijas, histoloģiskā tipa, histoloģiskās malignitātes pakāpes, pirms operācijas periodā izdarītās ķīmijterapijas un klīniski novērotās reakcijas uz minēto ārstēšanu. Atsevišķi analizēta mirušo un izdzīvojušo pacientu, kā arī pacientu, kuriem novērota ļaundabīgā procesa progresija uz izdarītās terapijas fona, grupa. Papildus primāro audzēju grupai pētīta imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija nefroblastomas metastāžu un recidīva grupā. P16^{INK4a} proteīna ekspresija gan primāro, gan metastātisko audzēju gadījumā analizēta arī atkarībā no DNS sekvencēšanā atklātajām audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16^{INK4a} izmaiņām. Pētījuma realizācijai izmantoti materiāli tehniskie līdzekļi, kuri ir BKUS Bērnu Patoloģijas biroja un RSU Patoloģijas katedras rīcībā. 9p21 hromosomas esošā CDKN2a/ p16^{INK4a} lokusa ģenētisko izmaiņu izpēte veikta LU Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā sadarbībā ar bioloģijas zinātņu doktori D.Pjanovu. Papildus rabdoīdo audzēju diagnozes imūnhistoķīmiskā verifikācija izdarīta Dublinas (Īrija) bērnu slimnīcā sadarbībā ar profesori Maurīnu O’Sullivanu (Maureen J. O’Sullivan, Our Lady’s Children’s Hospital, Dublin, Ireland). Histoloģisko preparātu

attēli iegūti ar digitālo fotokameru Leica DFC 290, makroskopiskā materiāla fotogrāfiju iegūšanai izmantota digitālā kamera BENQ DC E1050t, datortomogrāfijas attēlu pārveidošana digitālā formātā veikta salonā „Fotolukss” Rīgā, Brīvības ielā 263a.

Sākotnēji, primāro nierēs audzēju morfoloģiskā spektra noteikšanai un nefroblastomu padziļinātas izpētes grupas izveidošanai, izdarīts visu izmeklēto audzēju materiāla H&E mikropreparātu pārskats un BKUS Bērnu Patoloģijas birojā noteikto diagnožu verifikācija. Ja primārās morfoloģiskās izmeklēšanas laikā noteiktā diagnoze radīja diagnostiskas problēmas, tika veikta papildus imūnhistoķīmiskā krāsošana diagnozes precizēšanai (izmeklēšanas metodiku un izmantotos reaģentus sk. nod. 2.2) un, vajadzības gadījumā, pieaicināts patologu konsīlijs (doc. Sokolova, dr. Heimane, dr. Melderis- BKUS Bērnu Patoloģijas birojs, dr. Sperga- Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca). Preparātu pārskats veikts 49 audzēju gadījumā. Diagnostiskos nolūkos atkārtoti imūnhistoķīmiski izmeklēti 31 audzēja gadījumi jeb 63,26% no visa izmantotā materiāla. No tālāk imūnhistoķīmiski un ģenētiski analizējamās nefroblastomu grupas izslēgti audzēji, kuru saglabātā histoloģiskā materiāla kvalitāte nebija atbilstoša atkārtotas, pētnieciskos nolūkos veicamas, izmeklēšanas izdarīšanai vai primārajā morfoloģiskajā izmeklēšanā noteiktā nefroblastomas diagnoze radīja diagnostiskas problēmas. Visos tālākai analīzei izvēlētajos nefroblastomas gadījumos H&E preparātos pārskata mikroskopijā tika noteikts arī histoloģiskais audzēja tips saskaņā ar jaunāko klasifikāciju [Vujanic et al, 2010]. Prognostiski potenciāli svarīgo svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru analīze veikta 26 primāras nefroblastomas gadījumiem un 8 attālo metastāžu un 1 recidīva gadījumiem. Kopumā pētīti 35 gadījumi, izmantojot 8 potenciāli svarīgos imūnhistoķīmiskos marķierus. Ģenētiski analizēto nefroblastomu gadījumā DNS izolēta no parafīnā ieguldītajiem audiem, DNS amplifikācija un sekvenēšana veikta ar PCR metodi. Ģenētiskā izmeklēšana izdarīta 14 nefroblastomas audu paraugiem. 11 gadījumos izmantots primārā audzēja materiāls, 2 gadījumos plaušu metastāzes, bet vienā recidīva audi. Darbā analizēts tikai Bērnu Klīniskajā universitātes slimnīcā diagnostiskām vajadzībām lietotais materiāls. Ievēroti visi ar Helsinku vienošanos saistītie noteikumi. Pētījuma veikšanai saņemta RSU Ētikas komisijas atļauja (veidlapa nr. E-9 (2), 24.11.2011).

2.2. Analizētā materiāla imūnhistoķīmiskā izmeklēšana

2.2.1. Histoloģiskās un imūnhistoķīmiskās audu apstrādes metodika

Visi audu paraugi vismaz 24 stundas fiksēti 10% buferētā formalīnā un, pēc audu paraugu skalošanas tekošā ūdenī 1 stundu un 24 stundu ilgas atūdeņošanas 96% spirta šķīdumā, ieguldīti paraplata (Diapath S.r.l. Bergamo, Itālija) blokos. Audzēju izmeklēšanai gan hematoksilīna-eozīna preparātos, gan imūnhistoķīmiskai vizualizācijai iegūti 3 µM biezi griezumī. Imūnhistoķīmisko preparātu pagatavošanai lietoti elektrostatiskie priekšmetstikli (Histobond, Marienfelde, Vācija). Lai nodrošinātu adekvātu griezumu adhēziju pie priekšmetstikla, sagatavotie preparāti 24 stundas inkubēti 37⁰ C temperatūrā. Deparafinizācijai un rehidratācijai izmantots ksilols (2 x 5 min) un 96% spirta šķidrums (2 x 5 min), pēc tam griezumi noskaloti destilētā ūdenī un

pakļauti antigēna struktūras atjaunošanai mikrovilņu krāsnī 15 minūtes 97⁰ C temperatūrā Tris/EDTA bufera šķīdumā ar pH 9.0 (Target Retrieval Solution, pH9,Dako, Dānija) un 20 minūtes atdzesēti līdz 65⁰ C temperatūrai. Pēc sekojošas skalošanas TBS buferī (0,05 mol/L Tris-HCl, 0,15 mol/L NaCl, pH7,6, Dako, Dānija) 3 reizes katru reizi 10 minūtes ilgi, tika izdarīta endogēnās peroksidāzes bloķēšana inkubējot audus 3% ūdeņraža peroksīda šķīdumā 5 minūtes. Endogēnās peroksidāzes bloķēšanai seko audu griezumu skalošana TBS buferī 2 reizes katru pa 5 minūtēm un griezumu inkubācija atbilstošās primārās antivielas šķīdumā 30 līdz 45 minūtes ilgi atkarībā no izmantotās antivielas. Koncentrēto primāro antivielu atšķaidīšanai tika pielietots specializēts šķīdums (DAKO REALTM Antibody Diluent, Dako, Dānija). Diagnostiskos nolūkos pielietota imūnhistoķīmiskā izmeklēšana izmantojot primārās antivielas WT1 proteīna, vimentīna, CKAE1/AE3, EMA, Ki67, bcl-2, aktīna, desmīna, CK7, LCA, CD99, NSE, hromogranīna, sinaptofizīna, S100, mioglobīna, miogenīna MyoD1, CD34 antigēna noteikšanai (visas antivielas Dako, Dānija, sk. tabulu 2.1). Precīzai rabdoīda tumora diagnostikai izmantota INI1 proteīna imūnhistoķīmisku noteikšana (Santa Cruz Biotechnology, ASV). Potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija analizēta izmantojot antivielas WT1 proteīna, CKAE1/AE3, p53, e-kadherīna, Ki67 un CD34, CD44s (visas antivielas Dako, Dānija) un p16^{INK4a} proteīna antigēna noteikšanai (Abcam, Kembridža, Masačūsetsas štats, ASV). Imūnhistoķīmiskā krāsošana veikta manuāli, tālākai vizualizācijai pielietojot polimēru konjugēto sistēmu EnVision. Pēc atkārtotas audu griezumu skalošanas TBS buferī (2 x 5 min) griezumi inkubēti 30 minūtes sekundārās antivielas (Dako REALTM EnVisionTM/HRP truša anti-peles antigēnu, Dako, Dānija) šķīdumā. Pēc tam audi atkārtoti skaloti TBS buferī (3 x 5 minūtes) un veikta manuāla hromogēna (Dako REALTM DAB + Chromogen) pievienošana histoloģijas laboranta tiešā uzraudzībā. Pēc sekojošas griezumu noskalošanas tekošā ūdenī veikta kodolu krāsošana ar hematoksilīnu 5 min, bet pēc atkārtotas skalošanas mikropreparātu dehidratācija ar 96% spirta šķīdumu 2 reizes katru reizi pa 5 minūtēm un inkubācija ksilolā 2 reizes katru pa 7 minūtēm preparātu vizuālās kvalitātes uzlabošanai. Sagatavotie audu griezumi pārklāti ar segstiklu. Visos etapos izmantotas adekvātas pozitīvās un negatīvās kontrolreakcijas. Potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas noteikšanai izmantotās kontroles reakcijas atsevišķi atspoguļotas nodaļā 2.2.2.

**Diagnostiskajiem un pētnieciskajiem nolūkiem darbā izmantotās primārās
antivielas**

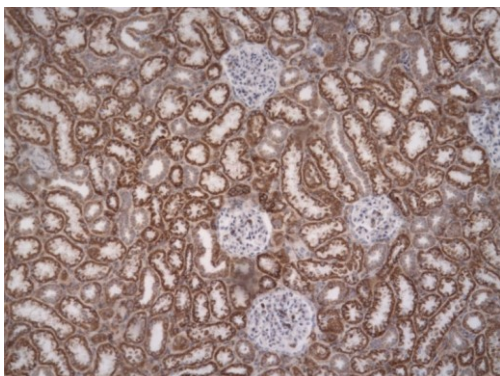
Nosaukums	Klona numurs un ražotāja nosaukums	Antivielas tips	Pielietotais atšķaidījums
Aktīns	HHF35 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
Bcl-2	124 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
CD34	QBEnd10 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
CD44s	DF1485, Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	1:50
CD99	12E7 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
CDKN2a/p16 ^{INK4a}	2D9A12 Abcam, Kembridža Masačūsetas štats, ASV	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	1:400
Kopējais citokeratīns	AE1/AE3 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
Citokeratīns 7	OV-TL 12/30 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	1:50
Desmīns	D33 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
EMA	E29 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
E- kadherīns	NCH-38 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	1:50
Hromogranīns	DAK-A3 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	1:100
Ki67	MIB1 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
LCA	PD7/26 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
Miogenīns	F5D Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret žurkas antigēnu	1:50

Nosaukums	Klona numurs un ražotāja nosaukums	Antivielas tips	Pielietotais atšķaidījums
Mioglobīns	Dako, Dānija	Poliklonāla truša antiviela pret cilvēka antigēnu	1:800
MyoD1	5. 8A Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	1:50
NSE	Dako, Dānija	Poliklonāla truša antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
P53 proteīns	DO-7 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
Sinaptofizīns	SY38 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
S100 proteīns	Dako, Dānija	Poliklonāla truša antiviela pret liellopa antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
Vimentīns	V9 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai
WT1 proteīns	6F-H2 Dako, Dānija	Monoklonāla peles antiviela pret cilvēka antigēnu	Antiviela gatava lietošanai

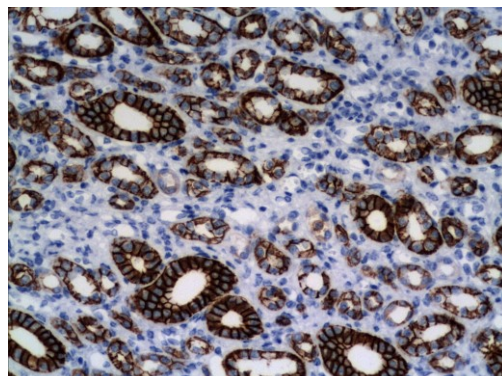
2.2.2. Imūnhistoķīmisko reakciju kontrole analizēto nefroblastomu grupā

Lai precīzi izvērtētu potenciāli prognostiski nozīmīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresivitāti pētīto nefroblastomu grupā, CD44s imūnhistoķīmiskās reaktivitātes pozitīvai iekšējai kontrolei, saskaņā ar literatūras datiem [Ghanem et al., 2011] izmantota reakcija audzēja neskartās nieres kanāliņu epitēlija šūnās (sk. 2.1.att.), bet WT1 proteīna reaktivitātes pozitīvai iekšējai kontrolei reakcija nieres kamoliņa šūnās t. skaitā podocītos [Mundlos et al., 1993] (sk. 2.4.att.). E-kadherīna un CKAE1/AE3 ekspresivitātes izvērtēšanai izmantota pozitīva iekšēja kontrole audzēja neskartās nieres kanāliņu šūnās un nieres bļodiņas urotēlijā (sk. 2.3.att.) atbilstoši minēto antivielu spējai vizualizēt epiteliālos audus [Moll et al., 1982; Gumbiner et al., 1986]. CD34 reaktivitātes izvērtējumam, atbilstoši antivielas spējai vizualizēt endotēlija šūnas [Ramani et al., 1990], lietota pozitīva iekšējā kontrole audzēja neskartās nieres asinsvados. P16^{INK4a} proteīna reaktivitātes izvērtējumam, saskaņā ar ražotāja instrukciju pielietot pozitīvu kontroli normālos cilvēka galvas smadzeņu audos vai galvas smadzeņu audzējos, tika izmantota pozitīva ārēja kontrole galvas smadzeņu astro-citomas audos (sk. 2.3.att.). Ki67 reaktivitātes izvērtējumam, atbilstoši Ziemeļvalstu patoloģijas laboratorijas apvienojošās zinātniskās organizācijas NordiQC imūnhisto-ķīmiskās kvalitātes kontroles protokolam (Nordic immunohistochemical quality

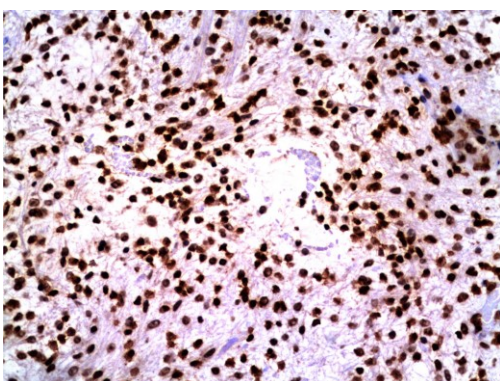
control), tika pielietota pozitīva ārējā kontrole mandeļu limfoīdo audu vairošanās centros, bet p53 reaktivitātes izvērtējumam iekšēja negatīva kontrole normālos niere audos.



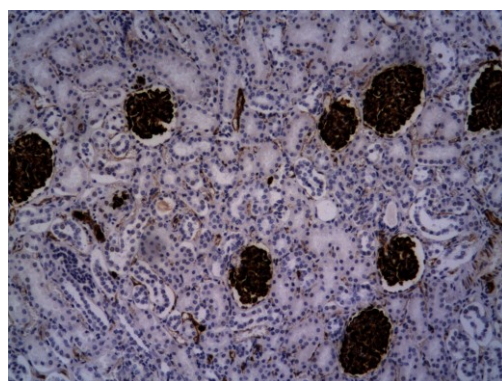
2.1.att. Izteikta CD44s pozitivitāte audzēja neskartās nierēs kanāliņu epitēlija šūnās, palielinājums x100.



2.2.att.E-kadherīna pozitivitāte audzēja neskartās nierēs kanāliņu epitēlija šūnās, palielinājums x200.



2.3.att. Izteikta p16^{INK4a} proteīna pozitivitāte šūnu kodolos galvas smadzeņu audos astrocitomas gadījumā, palielinājums x200.



2.4.att. Nukleāra WT1 pozitivitāte audzēja neskartās nierēs kamoliņu šūnās, palielinājums x100.

2.2.3. Imūnhistoķīmisko reakciju izvērtēšanas metodika analizēto nefroblastomu grupā

Viss pētītais materiāls izmeklēts gaismas mikroskopā. Analizējot CD44s, Ki67, p53 un p16^{INK4a} proteīna ekspresiju reakcijas pozitivitāte izvērtēta atsevišķi visos trijos audzēja komponentos, stromālajā, epiteliālajā un blastematozajā redzes laukos ar vizuāli vislielāko reakcijas intensitāti. E-kadherīna, WT1 proteīna, CKAE1/AE3 un CD34 ekspresija izvērtēta redzes laukos ar vizuāli vislielāko reakcijas intensitāti neatkarīgi no histoloģiskā audzēja komponenta, kurā atrodas minētais redzes lauks. Ja pārskata mikroskopijā H&E preparātos bija grūtības diferencēt blastematozu komponentu no ļoti primitīva embrionāla epiteliāla komponenta vai epiteliālais komponents nebija diferencējams ķīmioterapijas inducētu izmaiņu dēļ, tā vizualizācijai tika lietota

imunohistoķīmiska kopējā citokeratīna antigēna noteikšana (CKAE1/AE3, Dako, Dānija). Par pilnvērtīgu epiteliālu komponentu uzskatītas tubulāras vai glomerulāras struktūras ar pozitīvu citokeratīna ekspresiju audzēja šūnu citoplazmā un imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija noteikta šajās struktūrās. Ja kāds no histoloģiskajiem komponentiem veidoja mazāk par 5% no izmeklētajām audzēja struktūrām, imūnhistoķīmisko reakciju intensitāte tajā netika noteikta. Analizējot CD44s ekspresiju, par pozitīvu uzskatīta membranoza reakcija. Stromālajā un blastematozajā komponentā CD44s ekspresija izvērtēta skaitot pozitīvās šūnas gaismas mikroskopā (palielinājums x400) un procentuāli izsakot pozitīvi reaģējušo šūnu attiecību pret visām dotajā redzes laukā esošajām šūnām. Epiteliālajā komponentā minētās imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitāte noteikta skaitot CD44s pozitīvās epiteliālās struktūras vienā redzes laukā (palielinājums x100). Reakcija epiteliālajā struktūrā novērtēta kā pozitīva, ja vismaz 50% no tās šūnām parādās pozitīva reakcija nosakot CD44s antigēnu. P53, Ki67 un p16^{INK4a} proteīna pozitivitāte tika izvērtēta skaitot pozitīvās šūnas gaismas mikroskopā (palielinājums x400) un procentuāli izsakot pozitīvi reaģējušo šūnu attiecību pret visām dotajā redzes laukā esošajām šūnām. Izvērtējot reakciju p53, Ki67 un p16^{INK4a} proteīna antigēna noteikšanai, par pozitīvu uzskatīta reakcija audzēja šūnu kodolos. CD34 ekspresija noteikta skaitot asinsvadu struktūru skaitu ar minētā marķiera pozitivitāti endotēlija šūnās vienā redzes laukā (palielinājums x100). Par asinsvadu struktūrām, atbilstoši citu pētnieku publicētajiem darbiem [Ghanem et al., 2011] uzskatītas gan CD34 pozitīvas nobriedušas struktūras ar izveidotu lūmenu, gan CD34 pozitīvu šūnu sakopojumi bez lūmena veidošanās. E-kadherīna ekspresija noteikta skaitot pozitīvo struktūru skaitu vienā redzes laukā (palielinājums x100). Par pozitīvām uzskatītas gan nobriedušas tubulāras struktūras ar izveidotu lūmenu, gan minētā marķiera fokālas ekspresijas perēkļi bez lūmena veidošanās. Reakcija tubulārajās struktūrās novērtēta kā pozitīva, ja vismaz 50% no tās šūnām parādās pozitīva reakcija nosakot e-kadherīna antigēnu. Par pozitīvu uzskatīta membranoza reakcija. WT1 proteīna ekspresija noteikta skaitot pozitīvās šūnas gaismas mikroskopā vienā redzes laukā (palielinājums x400) un procentuāli izsakot pozitīvi reaģējušo šūnu attiecību pret visām dotajā redzes laukā esošajām šūnām. Atbilstoši literatūras datiem [Bahrami et al., 2008] reakcija var būt pozitīva blastematozajā un primitīvajā epiteliālajā komponentā. Par pozitīvu uzskatīta reakcija audzēja šūnu kodolos. Epiteliālo struktūru skaits tika noteikts vienā redzes laukā (palielinājums x100) redzes laukos ar vislielāko reakcijas intensitāti. Epiteliālās struktūras vizualizētas imūnhistoķīmiski nosakot CKAE1/AE3 antigēnu. Par pilnvērtīgu epiteliālu komponentu uzskatītas tubulāras un glomerulāras struktūras ar pozitīvu citokeratīna ekspresiju audzēja šūnu citoplazmā. Reakcija epiteliālajā struktūrā novērtēta kā pozitīva, ja vismaz 50% no tās šūnām parādās pozitīva reakcija. Izvērtējot reakcijas intensitāti netika ņemta vērā dažviet sastopamā un literatūrā aprakstītā [Coffin et al., 2006] difūzā citokeratīna pozitivitāte blastematozā komponenta šūnu citoplazmā.

2.3. Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16^{INK4a} ģenētisko izmaiņu noteikšanas metodika nefroblastomu audos

2.3.1. DNS ekstrakcija no parafīnā ieguldītiem audiem

DNS ekstrakcija no parafīnā ieguldītiem audiem tika izdarīta pielietojot metodiku, kuru 1999. gadā aprakstīja amerikāņu zinātnieks M. D. Mailmans [Mailman et al., 1999], izdarot tajā nelielas izmaiņas. Proti, audzēju DNS izmeklēšanai no parafīnā ieguldītā materiāla iegūti 10 µM biezi griezumi, kuri ievietoti 1.5 mL lielā mikrocentrifūgas stobriņā. Sagatavotie audu griezumi deparafinizēti iegremdējot tos 1mL ksilola, 10 minūtes inkubējot tos istabas temperatūrā un centrifugējot 5 minūtes pie 13000g. Minētās procedūras atkārtotas divas reizes. Pēc tam izdarīta pakāpeniska audu rehidratācija atkārtojot centrifugēšanu 1 mL 100% (divas reizes), 80% un 50% etanola šķīdumā. Lai pabeigtu rehidratāciju tika pievienots 1mL ūdens un stobriņš ievietots ledusskapī uz 24 stundām 4⁰ C temperatūrā. Šūnu lizēšana veikta uzsildot materiālu līdz istabas temperatūrai, centrifugējot 5 minūtes pie 13000g, aizstājot ūdeni ar 700µL kodolu līzes buferšķīduma (10 mM Tris, 400 mM NaCl, 2 mM Na₂EDTA, pH=8.4) un stobriņa saturu sajaucot. Lai veiktu membrānu un proteīnu degradāciju, audu paraugiem pievienots 70 µL proteināzes K (1 mg/ml) and 30 µL 200 g/L nātrija dodecilsulfāta šķīdums. Stobriņa saturs sajaukts un inkubēts 44⁰C temperatūrā 24 stundas. Tālākā DNS izdalīšana jau tika veikta pielietojot standarta fenola-hloroforma DNS izdalīšanas metodi. Audu paraugi deproteinēšanai 10 minūtes inkubēti istabas temperatūrā 700 µL fenola šķīdumā un pēc tam 10 minūtes centrifugēti pie 13000g. Atdalītā, DNS saturošā ūdens fāze ievietota jaunā mikrocentrifūgas stobriņā, tai pievienots 700 µL hloroforma šķīdums un materiāls 5 minūtes centrifugēts. Pēc centrifugēšanas izveidotā apakšējā kārtā atdalīta no izmeklējamā materiāla pie 13000g. Minētā procedūra atkārtota divas reizes. Lai veiktu DNS precipitāciju, materiālam tika pievienots 700 µL 96% etanola, un tas inkubēts -20⁰C temperatūrā līdz nākošajam rītam. DNS iegūšanai audu paraugi 10 min centrifugēti pie 14000g. Iegūtais šķidrums atdalīts, bet DNS saturošās nogulsnes skalotas 1mL 75% etanola. Skalošana atkārtota divas reizes. Pēc tam nogulsnes žāvētas istabas temperatūrā un šķīdinātas TBE bufera šķīdumā. Iegūtās DNS koncentrācija noteikta spektrofotometriski ar NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

2.3.2. CDKN2A/p16^{INK4a} gēna pavairošana izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju

Polimerāzes ķēdes reakcijās (PCR) tika pavairoti CDKN2A/p16^{INK4a} gēna divi eksoni (1α (126 nt) un 2 (307 nt)). Reakcija veikta 25 µL tilpumā, kurš satur 2.5 µL 10xPCR bufera, 3 µL dNTP (200 µM katrs dezoksiribonukleotīds), 1.5 µL MgCl₂ (25 mM), 4µM forvardētā praimera, 4µM reversā praimera, 1.25 µL dimetilsulfoksīda (DMSO), 0.25 U Taq polimerāzes un 50 ng genomiskās DNS (visi reaģenti no MBI Fermentas, Lietuva). Polimerāzes ķēdes reakcijas apstākļi bija sekojoši: iniciāla DNS denaturācija 95⁰C temperatūrā 10 minūtes, kurai seko 35 cikli, kas sastāv no

denaturācijas posma 95⁰C temperatūrā 30 sekundes, praimeru piesaistīšanās pie 55⁰C 30 sekundes un sintēzes 72⁰C temperatūrā 1 minūti, kam seko beigu sintēzes fāze 7 min 72⁰C temperatūrā. Darbā izmantotos praimerus iepriekš aprakstījusi D. Pjanova un citi [Pjanova et al., 2007]. Tie atspoguļoti atspoguļoti tabulā 2.2. (sintezēti Metabion International GA).

2.2. tabula

CDKN2A/p16^{INK4a} gēna 1α and 2. eksonu pavairošanai izmantotie praimeri

Praimera nosaukums	Nukleotīdu secība (5'-3')	Praimera garums (bp)
p16 E1α F	CAG CAC CGG AGG AAG AAA G	19
p16 E1α R	GCG CTA CCT GAT TCC AAT TC	20
p16 E2 F	GGA AAT TGG AAA CTG GAA GC	20
p16 E2 R	GGA AGC TCT CAG AAT TC	17

Lai pārliecinātos par PCR rezultātā iegūtā produkta esamību, materiāls analizēts 1,5% agarozes gēla elektroforēzē un vizualizēts ar etīdija bromīda (1μg/ml) palīdzību. Lai degradētu reziduālos oligonukleotīdus un defosforilizētu trinukleotīdus, pirms sekvenēšanas iegūtais produkts attīrīts izmantojot eksonukleāzi 1 un garneļu sārmaino fosfatāzi (visi reaģenti no MBI Fermentas, Lietuva) un izturot maisījumu 30 minūtes 37⁰C temperatūrā. Minētajai procedūrai seko enzīmu inaktivācija 80⁰C temperatūrā 15 minūtes.

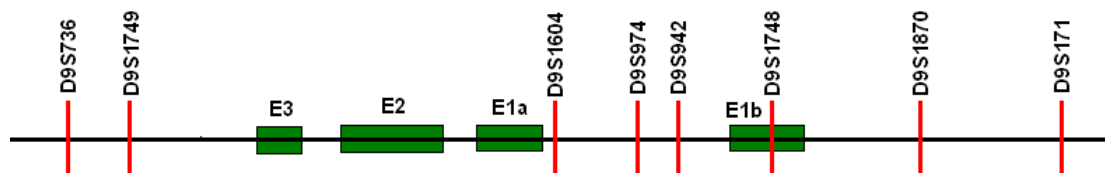
2.3.3. CDKN2A/p16^{INK4a} gēna sekvenēšana

DNS sekvenēšana veikta izmantojot reģentu komplektu *ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* atbilstoši ražotāju rekomendācijām. Sekvenēšanas PCR apstākļi bija sekojoši: izdarīti 25 cikli, kur katrs cikls satāvēja no denaturācijas posma 94⁰C temperatūrā 30 sekundes, praimeru piesaistīšanās 53⁰C temperatūrā 30 sekundes un sintēzes 60⁰C temperatūrā 4 minūtes. Pēc tam paraugi tika attīrīti tos pārgulsnējot ar 3M nātrija acetātu un etanolu. Sekvenētie paraugi analizēti ar gēnu analizatoru 3100 (Applied Biosystems). Iegūtās sekvences analizētas gan automātiski, gan manuāli pārskatītas izmantojot programmu *Vector NTI Suite v.6.0*. Sekvenēšana izdarīta abos virzienos sākot gan no sākotnējās DNS pavairošanas gaitā izmantotā forvardētā, gan no reversā praimera.

2.3.4. Heterozigotitātes zuduma analīze CDKN2A lokusā izmantojot mikrosatelītu marķierus

Izmantojot Gēnu Bankā pieejamos un Applied Biosystems sintezētos praimerus, no audzēja un tā paša pacienta audzēja neskartajiem audiem tika pavairoti septiņi (D9S942, D9S1604, D9S974, D9S1748, D9S1870, D9S171 un D9S736) CDKN2A

lokusa mikrosatelītu marķieri, kas tika izvēlēti lokusa raksturošanai. Katrā izmantotajā praimeru komplektā viens praimeris bija marķēts ar fluorescējošu krāsvielu 5' galā (PET, 6-FAM, VIC un NED). Izmmantoto mikrosatelītu marķieru izvietojums CDKN2A lokusā ir parādīts 2.5.att.



2.5.att. CDKN2A lokusa uzbūves shematisks attēlojums ar attēlotu analizēto mikrosatelītu marķieru izvietojumu.

Mikrosatelītu pavairošanas PCR tika izdarīta 15 µL lielā tilpumā, kurš satur 1.5 µL 10xPCR buferi, 2.5 µL MgCl₂ (25 mM), 1.5 µL dNTP (200 µM katrs dezoksinukleotīds), 1 µL praimeru maisījuma, 0.15 U Taq polimerāzi un 50 ng genomiskās DNS. DNS pavairošanas gaitā veikta materiāla sākotnējā denaturācija 95°C temperatūrā 10 minūtes, kurai seko 35 reakcijas cikli, kur katrs cikls sastāvēja no denaturācijas posma 95°C temperatūrā 30 sekundes, praimeru piesaistīšanās pie 55°C (D9S942, D9S1604, D9S974, D9S1748, D9S7369) vai pie 50°C (D9S1870), vai 58°C (D9S171) 30 sekundes un sintēzes 72°C temperatūrā 1 minūti. Procedūra pabeigta ar beigu sintēzes posmu 7 min 72°C temperatūrā. PCR rezultātā iegūtais produkts analizēts ar gēnu analizatoru 3100 (Applied biosystems, Anglija).

2.4. Datu statistiskās apstrādes metodes

Iegūtie dati analizēti ar datorprogrammu Microsoft Excel un programmatūras paketi SPSS (angļu val. „Statistical Package for the Social Sciences”) versija 17, to apstrādei tika izmantotas vispārpieņemtās aprakstošās statistikas metodes. Proporcijas starp dažādiem analizētajiem bērnu vecuma nieru audzēju histoloģiskajiem tiem pirms un pēc atkārtotās imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas izteiktas procentuāli. Potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija primāras nefroblastomas grupās (sk. nodaļu 2.1) kā arī metastāžu/recidīva grupā raksturota nosakot katra mainīgā vidējo aritmētisko lielumu, mainīgā lieluma standartnovirzi, vidējā aritmētiskā lieluma ticamības intervālu (CI) un mainīgo lielumu diapazonu. Ja aprēķinot vidējā aritmētiskā lieluma CI, zemākā robeža matemātiski tika aprēķināta kā negatīvs skaitlis, rezultātos tā tika atspoguļota kā nulle, ņemot vērā to, ka negatīvam rezultātam šajā gadījumā nav bioloģiskas jēgas. Ja kāds no histoloģiskajiem komponentiem veidoja mazāk par 5% no izmeklētajām audzēja struktūrām imūnhistoķīmisko reakciju intensitāte tajā netika noteikta un iegūtais negatīvais rezultāts netika izmantots statistiskajos aprēķinos. Savukārt, ja histoloģiskais komponents audzēja audos bija saglabāts, bet kāda no

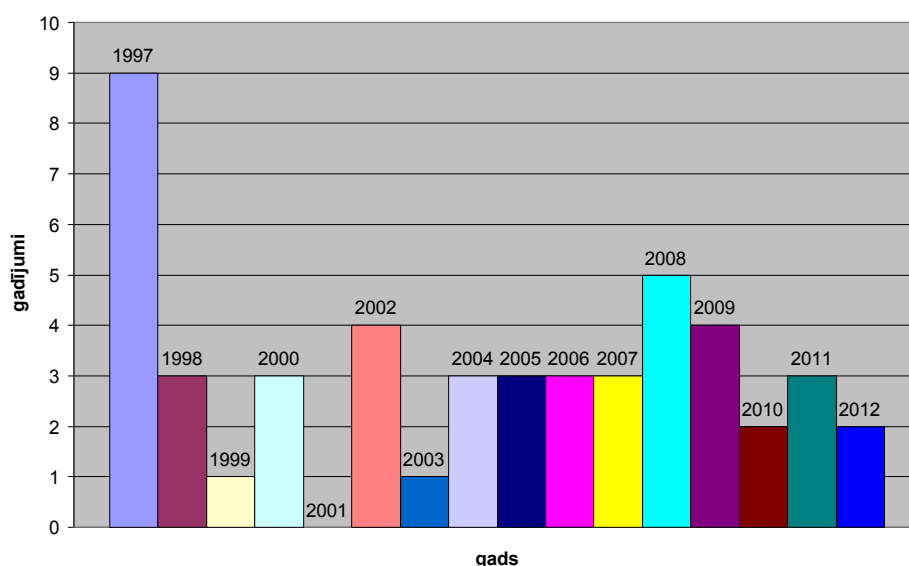
imūnhistoķīmiskajām reakcijām tajā bija negatīva, tad rezultāts tika atzīmēts kā nulle un iegūtais lielums izmantots statistiskajos aprēķinos. Iegūtie dati pārbaudīti normālajam sadalījumam izmantojot vienu no empīriskā un normālā sadalījuma atbildes pārbaudes analītiskajām metodēm: Kolmogorova-Smirnova kritēriju. Mainīgo sadalījums neatbilda normālajam, tāpēc turpmākajā analīzē izmantotas neparametriskās datu statistiskās apstrādes metodes. Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas salīdzināšanai starp primāro audzēju un metastāžu/recidīva grupu, kā arī savstarpēji dažādās primāro audzēju grupās tika izmantots Manna-Vitneja kritērijs. Par statistiski nozīmīgu uzskatīts būtiskuma līmenis (p), kas ir mazāks vai vienāds ar 0,05. Lai analizētu imūnhistoķīmisko reakciju intensitāti atkarībā no klīniski noteiktās audzēja stadijas, dati tika sadalīti divās grupās, respektīvi, tika salīdzinātas zemas stadijas (I un II stadija) un augstas stadijas (III, IV un V stadija) audzēju grupas. Tāpat dati tika sadalīti attiecībā uz histoloģisko malignitātes pakāpi. Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija zemas un vidējas malignitātes pakāpes audzēju grupā tika salīdzināta ar augstas malignitātes audzējiem. Analizējot reakciju intensitāti dažādu histoloģisko tipu gadījumā, imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija katrā no tiem salīdzināta ar visu pārējo tipu materiālu. Analizējot primāro audzēju grupas izmeklēšanā iegūtos datus, lai noteiktu saistību starp imūnhistoķīmiski pozitīvo šūnu vai struktūru (asinsvadi, epiteliālas struktūras) daudzumu katrā audzēja histoloģiskajā komponentā, audzēja stadiju un histoloģiskā riska pakāpi lietota Spīrmena neparametriskā korelāciju analīze. Lai izvērtētu CDKN2A/p16^{INK4a} gēna analīzē atrasto izmaiņu lomu nefroblastomas attīstībā, tās sastopamības biežums slimnieku grupā salīdzināts ar tās biežumu kontroles grupā, kura sastāvēja no 203 praktiski veselīgu, Valsts iedzīvotāju genoma datubāzes dalībniekiem, kuriem CDKN2A gēna analīze ir aprakstīta iepriekš [Pjanova et al., 2007]. Lai salīdzinātu CDKN2A/p16^{INK4a} gēna izmaiņu biežuma atšķirību izmeklētajā nefroblastomu grupā un kontroles grupā izmantots Fišera tests ar CI 95%.

3. REZULTĀTI

3.1. Latvijas pediatriko nieru audzēju morfoloģiskā spektra raksturojums

3.1.1. Primāro nieru audzēju morfoloģiskā spektra raksturojums pēc sākotnējās histoloģiskās izmeklēšanas datiem

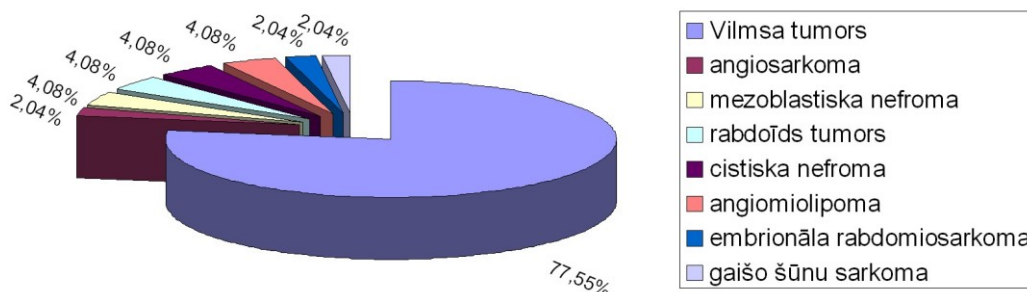
Klīniski diagnosticētu primāru nieru audzēju dēļ laika posmā no 1997. gada janvāra līdz 2012. gada jūlijam BKUS tika izdarītas 50 nefrektomijas un 3 daļējas nieru rezekcijas. Diagnostiska punkcijas biopsija pirms nefrektomijas veikta 1 gadījumā. Audzēja diagnoze morfoloģiski tika apstiprināta 49 jeb 92,45% no izmeklētajiem gadījumiem, bet 4 jeb 7,55% histoloģiskā izmeklēšana neapstiprināja klīnisko audzēja diagnozi. 3 jeb 5,66% no morfoloģiski izmeklētā materiāla klīniskā diagnoze bija primārs nieru audzējs (primāra limfoma, nieru šūnu vēzis), bet histoloģiski tika konstatēts ksantogranulomatozs pielonefrīts. 1 gadījumā (1,89%) patoloģiskais process morfoloģiski netika atrasts. Pirms operācijas veiktās biopsijas materiālā tika konstatēta nefroblastoma, diagnoze tika apstiprināta arī veicot operācijas materiāla histoloģisko izmeklēšanu. Diagnosticēto audzēju sadalījums pa gadiem ir atspoguļots 3.1.att.



3.1.att. Primāro nieru audzēju skaits BKUS (1997. gada janvāris-2012. gada jūlijs).

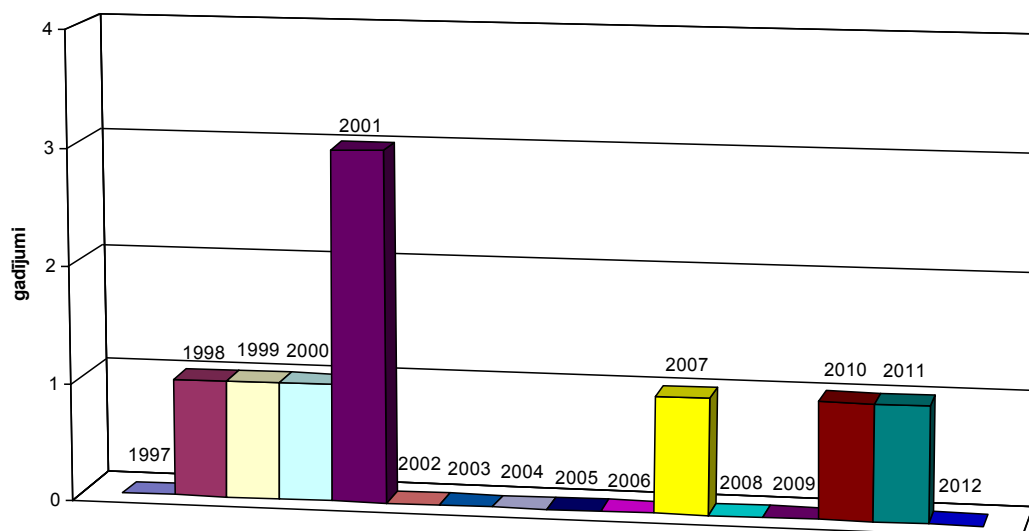
Analizējot BKUS Bērnu Patoloģijas birojā pieejamās histoloģiskās diagnozes, noskaidrots, ka morfoloģiskajā izmeklēšanā tika konstatēti sekojoši audzēju histoloģiskie tipi: 1) nefroblastoma jeb Vilmsa audzējs - 77,55% (n=38), 2) gaišo šūnu sarkoma - 2,04% (n=1), 3) rabdoīds tumors - 4,08% (n=2), 4) angiomiolipoma - 4,08% (n=2), 5) embrionāla rabdomiosarkoma - 2,04% (n=1), 6) mezoblastiska nefroma - 4,08% (n=2), 7) multicistiska nefroma - 4,08% (n=2), 8) angiosarkoma - 2,04% (n=1). Nefroblastomu grupā 34,21% (n=13) veidoja blastematoza tipa audzēji, bet 23,7% (n=9) jaukta, 21,05% (n=8) epiteliāla, 10,52% (n=4) stromāla, 7,89% (n=3) regresīva tipa audzēji. 2,63% no gadījumiem (n=1) atrasta cistiska nefroblastoma. Anaplāzija netika

konstatēta nevienā no primārajām nefroblastomām. Praktizējošo patologu birojā veiktās morfoloģiskās izmeklēšanas rezultāti parādīti 3.2.att.



3.2.att. Audzēju morfoloģiskais sadalījums pēc BKUS Bērnu Patoloģijas Birojā veiktās izmeklēšanas datiem (1997. gada janvāris-2012. gada jūlijs).

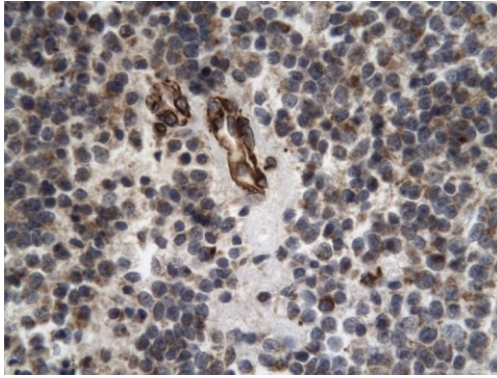
Aplūkotajā laika periodā morfoloģiski izmeklēts 9 primāru nieru audzēju attālo metastāžu materiāls un metastātiskā procesa diagnoze apstiprināta 6 pacientiem, kuriem jau izdarīta audzēja rezekcija un sekojoša ķīmijterapija. Laika posmā no 1997. gadam līdz 2001. gadam (ieskaitot) izmeklēti 6 gadījumi, no 2002. līdz 2006. gadam (ieskaitot) operatīva metastātiskā procesa ārstēšana nebija veikta, no 2007. līdz 2012. gadam izmeklēti 3 gadījumi (sk. 3.3.att.). Histoloģiski vienā gadījumā konstatētas rabdoīda audzēja metastāzes, pārējos gadījumos primāri atrasta nefroblastoma. 5 gadījumos metastāzes lokalizējas plaušās, 1 gadījumā intraperitoneāli, 1 gadījumā liesas augšpolā un intraperitoneāli, 1 gadījumā diafragmas kupolā. Jāatzīmē, ka izmeklēto pacientu skaits metastātiskā procesa gadījumā bija mazāks nekā izdarīto operāciju daudzums, jo 2000. un 2001. gadā trīs reizes tika veikta atkārtota nefroblastomas metastāžu rezekcijas vienai un tai pašai pacientei, bet 2010. un 2011. gadā atkārtoti nefroblastomas metastāzes konstatētas citai slimniecei. Analizētajā laika posmā morfoloģiski izmeklēts arī 2 nieru audzēju recidīvu audu materiāls no retroperitoneālās telpas. 2005. gadā diagnosticētā blastematoza tipa nefroblastomas gadījumā recidīvs attīstījās 4 mēnešus pēc primārā procesa ekscīzijas, atkārtotā procesa gadījumā morfoloģiski tika konstatēta difūza anaplāzija. 2011. gadā Bērnu Patoloģijas birojā analizēts pirms četriem gadiem, respektīvi, 2007. gadā diagnosticēta blastematoza tipa nefroblastomas recidīvs. Histoloģiskā un imūnhistoķīmiskā aina atkārtotā audzēja audos vairāk atbilda neiroblastomai. Pēc, šī darba ietvaros veiktās, imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas arī primārais audzējs izslēgts no nefroblastomu grupas un apstiprināta neiroblastomas diagnoze (sk. nodaļu 3.1.2.).



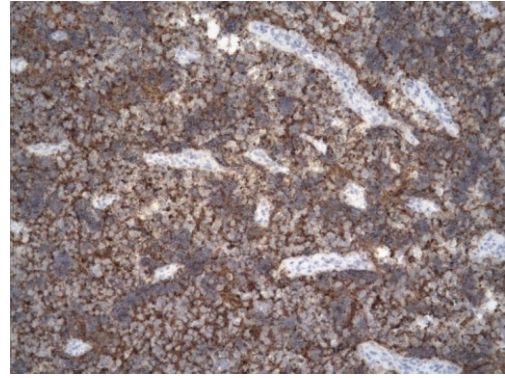
3.3.att. Morfoloģiski izmeklēto primāro nieres audzēju metastāžu sadalījums pa gadiem VSIA BKUS (1997. gada janvāris-2012. gada jūlijs).

3.1.2. Primāro nieres audzēju morfoloģiskā spektra raksturojums pēc atkārtotas morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas datiem

Atkārtotā H&E preparātu un imūnhistoķīmiskajā izmeklēšanā tika apstiprinātas 37 no 38 nefroblastomas diagnozēm. Viens no gadījumiem tika interpretēts kā neuroblastoma. Histoloģiski audzēja šūnas bija sīkas, monomorfās ar apaļu, bazofilu kodolu un niecīgu citoplazmu. Tika konstatētas atsevišķas Homēra Vraitā (Homer Wright) rozetes. Imūnhistoķīmiskajā izmeklēšanā atrasta pilnībā negatīva reakcija WT1 antigēna noteikšanai (sk. 3.4.att.), veidojumā nebija EMA un CKAE1/AE3 pozitīvu epiteliālu struktūru, bet reakcija neironālo marķieru NSE, sinaptofizīna (sk. 3.5.att.) un hromogranīna noteikšanai bija izteikti pozitīva. Reakcija citu bērnu vecuma “sīko apaļo šūnu audzēju” (small round cell tumours) marķieru kā LCA, desmīna, vimentīna, muskuļu specifiskā aktīna, mioglobīna, miogenīna un CD99 noteikšanai bija negatīva. Izmantojot Ki67 kodolu antigēnu identifikāciju konstatētais PI bija 40%. Atbilstoši histoloģiskajai un imūnhistoķīmiskajai ainai, pieaicinot patologu konsīliju (dr. Sokolova, dr. Heimane) audzējs tika izslēgts no pētāmo nefroblastomu grupas.

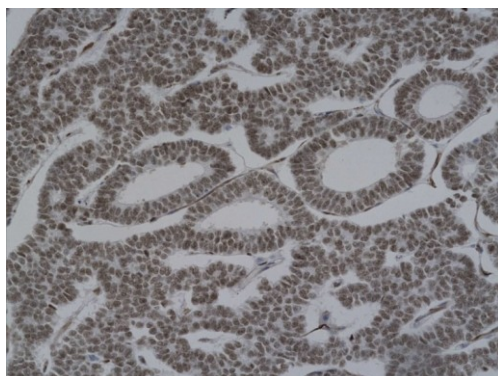


3.4.att. Neuroblastoma- negatīva WT1ekspresija audzēja šūnu kodolos, palielinājums x400.

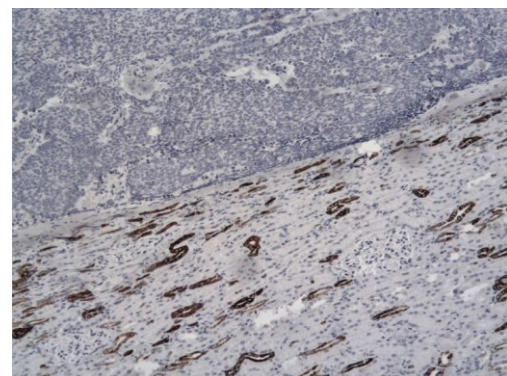


3.5.att. Neuroblastoma – pozitīva sinaptofizīna ekspresija audzēja šūnu citoplazmā, palielinājums x100.

Jāatzīmē, ka diagnostiskas problēmas atkārtotā materiāla pārskatā tika konstatētas vēl vienas nefroblastomas gadījumā. Histoloģiskā diagnoze BKUS Bērnu Patoloģijas birojā veiktajā morfoloģiskajā izmeklēšanā bija jaukta tipa (epiteliāli blastematoza) nefroblastoma. Audzējs bija labi norobežots, bet nebija iekapsulēts. Histoloģiski audzēju veidoja primitīvas, acellulārā stromā kompakti izvietotas acināras struktūras. Hemorāģiskus apvidus, kalcifikāciju un nekrozi histoloģiskajā izmeklēšanā neatrada. Imūnohistoķīmiski atzīmējama difūza membranoza CKAE1/AE3 pozitivitāte visās audzēja struktūrās. EMA un vimentīna ekspresiju nenovēroja, taču audzēja šūnās atrada difūzu, izteiktu, nukleāru reakciju WT1 antigēna noteikšanai (sk. 3.6.att.). CK7 bija negatīvs audzēja šūnās, kamēr nieru kanāliņu epitēlija šūnās konstatēja tā pozitivitāti, ko var izmantot par iekšēju pozitīvu kontroli reakcijas kvalitātes novērtēšanai (sk.attēlu 3.7). Vidējais Ki67 proliferācijas indeksa lielums bija 18,44%. Histoloģiskā un imūnohistoķīmiskā atradne šajā gadījumā vairāk raksturīga literatūrā aprakstītajai metanefrītiskai adenomai [Kokashi et al., 2009], bet PI atradne neatbilst adenomas ainai, tāpēc tika pieņemts lēmums neizmainīt nefroblastomas diagnozi, taču uzsvērt, ka tas ir epiteliāls, pēc metanefrītiskas adenomas tipa diferencēts audzējs.

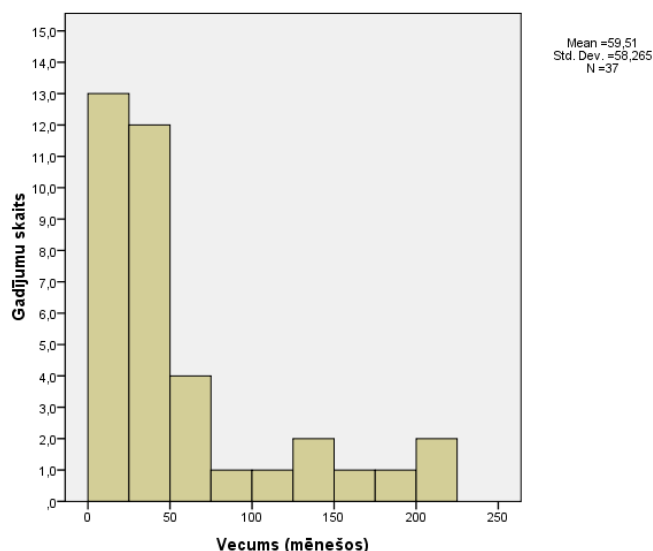


3.6.att. Pēc metanefrītiskas adenomas tipa diferencēta nefroblastoma - pozitīva WT1ekspresija audzēja šūnu kodolos, palielinājums x200.



3.7.att. Pēc metanefrītiskas adenomas tipa diferencēta nefroblastoma- CK7 negativitāte audzēja šūnās, pozitīva kontrole nieru kanāliņu šūnās, palielinājums x100.

Atsevišķi analizējot pēc atkārtotās izmeklēšanas izveidoto nefroblastomu grupu, redzams, ka 20 no 37 jeb 54,05% pacientiem bija zēni, bet 17 jeb 45,95% meitenes. Pacientu vecums bija robežās no 8 mēnešiem līdz 17 gadiem 11 mēnešiem (M 58.29 mēneši, SD 58.26, moda 36 mēneši). 70,27% (n=26) bija pacienti vecumā līdz 4 gadiem, bet 86,48% (n=32) ietilpa vecuma grupā līdz 10 gadiem (sk. 3.8.att.).

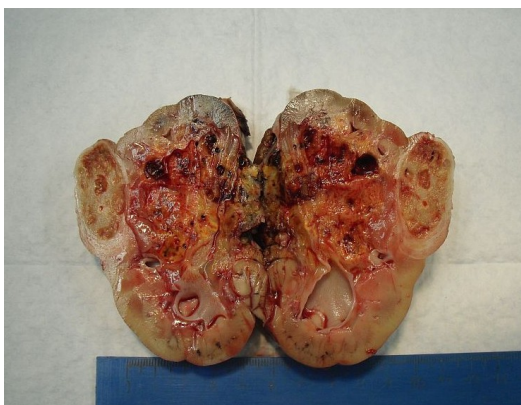


3.8.att. Nefroblastomas pacientu sadalījums atkarībā no vecuma diagnozes brīdī.

Diagnosticēto nefroblastomu sadalījums pa gadiem bija sekojošs: 1997. gadā konstatēti 7 gadījumi, 1998. gadā-3, 1999. gadā-1, 2000. gadā-3, 2001. gadā neviens, 2003. gadā-1, 2002. gadā-1, 2004.gadā-3, 2005. gadā-3, 2006. gadā neviens, 2007. gadā-1, 2008. gadā-4, 2009. gadā-3, 2010. gadā-2, 2011. gadā-3, bet 2012. gadā (līdz jūlijam) 2 audzēja gadījumi. Atkārtoti nosakot histoloģiskos apakštīpus atbilstoši pašreiz lietotajai SIOP 2001. gada klasifikācijai [Vujanic et al., 2002] konstatētais sadalījums bija sekojošs: blastemāla tipa audzēji veidoja 32,43% (n=12) no analizētajām nefroblastomām, epiteliāla – 24,32% (n=9), jaukta tipa – 18,925% (n=7), mezenhimāla tipa – 8,1% (n=3), regresīva tipa – 13,51% (n=5), 2,7% (n=1) cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma. Arī pārskata gaitā netika konstatēta anaplāzija nevienā no primārās nefroblastomas audiem. Kā jau konstatēts analizējot histoloģisko atbilžu datus, difūza anaplāzija atrasta viena blastematoza tipa audzēja recidīva gadījumā. Pacients bija 8 mēnešus vecs zēns, 4 mēnešus pēc primārā audzēja ekstirpācijas attīstījās audzēja recidīvs. Slimnieks miris 18 mēnešus pēc pirmās operācijas. Astoņās (88,89%) no deviņām epiteliālā tipa nefroblastomām konstatēta tubulāra diferenciacija, vienā audzējā varēja redzēt glomerulāru diferenciaciju (11,11%). Viens no tubulārās diferenciacijas gadījumiem bija iepriekš aprakstītā metanefrītiskai adenomai līdzīgā nefroblastoma. Sadalījums atkarībā no stadijām primārā procesa konstatācijas brīdī bija sekojošs: 1. stadijas audzēji konstatēti 8,11% (n=3) gadījumos, bet 2.stadijas 45,95% (n=17), 3.stadijas 21, 62% (n=8), 4.stadijas 13,51% (n=5), 5. stadijas 2,7% (n=1) gadījumos. 3 jeb 8,11 % no diagnosticētajām nefroblastomām precīzu audzēja stadiju neizdevās noskaidrot. Makroskopiski Bērnu Patoloģijas birojā lielākais konstatētais nefroblas-

tomas svars ir 2100g, bet lielākais izmērs 18x18x13 cm. Mazākā makroskopiski izmeklētā nefroblastoma bija 5 cm diametrā, tās svars kopā ar nieri bija 140 g. Jāatzīmē, ka izmēra samazināšanās līdz 5 cm konstatējama pirms operācijas periodā izdarītās ķīmijterapijas gadījumos, kad klīniski novēro audzēja involūciju, bet histoloģiski regresīvas izmaiņas (sk. 3.9.att. un 3.10.att.). Vienā gadījumā pēc ķīmijterapijas makroskopiski konstatējamu veidojumu nierē neatrod (pirms tam ultrasonogrāfiski konstatētais audzējs 8x8 cm liels), nefroblastomas diagnoze apstiprināta tikai histoloģiskajā izmeklēšanā.

Pašlaik, 2012. gada 10. jūlijā, dzīvi bija 86,49% (n=32) no nefroblastomas pacientiem, 10,81% (n=4) bija miruši, bet 2,7% (n=1) precīzus datus par slimnieku dzīvildzi neizdevās iegūt. Pēdējos piecos gados laika posmā no 2008. līdz 2012. gadam (ieskaitot) diagnosticēti 14 nefroblastomas gadījumi, visi pacienti 2012. gada 10. jūlijā bija dzīvi, lai gan vienai slimniecei konstatētas atkārtotas metastāzes plaušās un izteikts kaula smadzeņu nomākums pēc ķīmijterapijas. Pašlaik pacients atrodas paliatīvajā aprūpē. Laika posmā no 1997. līdz 2007. gadam diagnosticētas 23 nefroblastomas, no šajā periodā diagnosticēto audzēju pacientiem miruši 17,39% (n=4), precīzus datus par pacientu dzīvildzi neizdevās iegūt 4,35% (n=1), līdz ar to piecu gadu dzīvildze konstatēta 78,26% (n=18) gadījumos.



3.9.att. Makroskopiskā aina regresīva tipa nefroblastomas gadījumā. Audzējs pēc pirms operācijas periodā izdarītās ķīmijterapijas. Griezumā redzami mezgli subkapsulāri un medullārajā daļā.

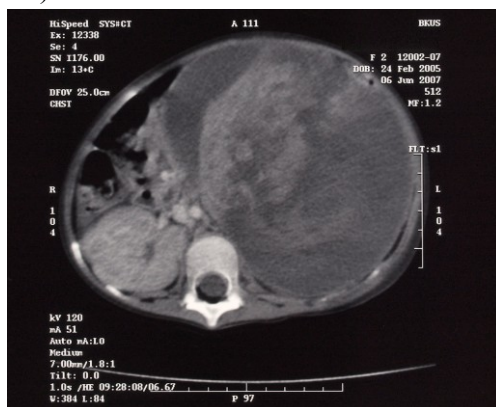


3.10.att. Makroskopiskā aina jaukta tipa nefroblastomas gadījumā. Audzējs pēc pirms operācijas periodā izdarītās ķīmijterapijas. Redzamas arī no bļodiņas un urīnvada izņemtās audzēja masas ar masīviem asins izplūdumiem.

Analizējot pacientu klīniskās slimības vēstures netika atrastas audzēja saistība ar nevienu no iedzimtajiem dismorfiskajiem sindromiem. Runājot par pavadošajām anogenitālās sistēmas iedzimtām anomālijām, tikai vienā gadījumā 4 mēnešus pirms nefroblastomas manifestācijas 8 mēnešus vecam zēnam tika atrasta un operatīvi ārstēta iedzimta urīnvada attīstības anomālija. Vienā gadījumā pacientam bija iedzimta sirdskaite - perimembranozs ventrikulu starpsienas defekts, šim pacientam novērota arī abpusēja hidrocele. Anamnētiski iedzimta sirdskaite bijusi arī citas pacientes mātei. Vienā gadījumā konstatēts recidivējošs HLA B27 pozitīvs artrīts un hipotalamusa disfunkcija. Šis pacients atradās metabolā sindroma riska grupā, viņa tēvam konstatēta

progresējoša muskuļu distrofija, cukura diabēts un posttraumatiskais epileptisks sindroms, bet tēva mātei 2. tipa cukura diabēts. Vienā gadījumā pacientei atzīmēta celiakija. Jau pēc sekmīgas audzēja terapijas, 10 gadus pēc pirmreizējās nefroblastomas diagnozes, vienam no slimniekiem BKUS veikta ceļu locītavas epifiziodēze kāju garuma diferences korekcijai, bet cits pacients ārstējies sakarā ar recidivējošiem bronhītiem. Vienā gadījumā novērota policistozē saglabātajā nierē. No komplikācijām, kuras saistītas ar paša audzēja attīstību un tā terapiju bez ķīmijterapijas izraisītā kaulu smadzeņu nomākuma, kurš novērojams vairumā gadījumu, jāmin metastātiskā procesa izraisīts specifisks pleirīts un ascīts, audzēja apaugšana ap vēdera aortu un sekojoša asiņošana operācijas laikā, paraneoplastisks sindroms ar izteiktām koagulogrammas izmaiņām, pēcoperācijas saugumu ileuss, sekundāra arteriāla hipertensija, dobās vēnas jatrogēns bojājums, septiska vēdera dobuma infekcija ar ascītu, aknu bojājumu, trombocitopēniju un hiperferitīnēmiju, polineiropātijas sindroms, starpzarnu hematoma un apakšdelma tromboflebīts (katra no komplikācijām novērota vienā gadījumā). Divos gadījumos slimnieka klīniskajā slimības vēsturē atzīmēta sekundāras kardiomiopātijas attīstība. Viena paciente pēcoperācijas periodā pārslimojusi vējbakas, bet vienai pacientei ultrasonogrāfiski (USG) konstatēts veidojums otrā nierē. Sākotnēji domāts par bilaterālu nefroblastomu, tomēr šī atradne intraoperatīvi un atkārtotā USG izmeklēšanā netika apstiprināta. Klīniskā diagnoze bija angiomiolipoma otrā nierē taču audzēja ekstirpācija netika izdarīta.

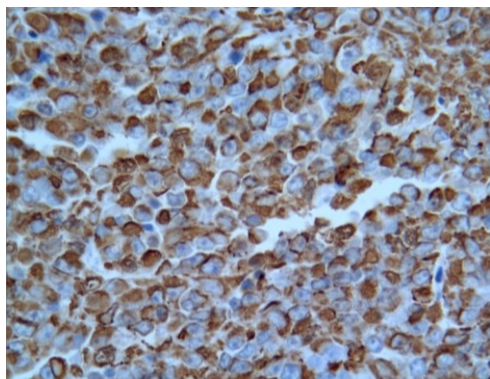
Analizētajā laika posmā BKUS Bērnu Patoloģijas birojā veiktajā morfoloģiskajā izmeklēšanā pavisam konstatēti 2 rabdoīdi nierēs audzēji. Pacienti bija 18 mēnešus vecs zēns un 27 mēnešus veca meitene. Vienā gadījumā diagnoze neradīja diferenciāldiagnostiskas grūtības, otrajā histoloģiskā atbilde pēc primārā procesa audu izmeklēšanas bija blastematoza tipa nefroblastoma. Diagnoze Bērnu Patoloģijas birojā mainīta pēc plaušu metastāzes audu morfoloģiskās izmeklēšanas. Makroskopiski, vienā gadījumā veidojums bija 5x8 cm, bet otrā 17x13,6 cm liels un kompjūtertomogrāfiskajā (CT) izmeklēšanā bija redzams kā heterogēns, sfērisks, retroperitoneāls veidojums ar asām robežām (sk. 3.11.att.).



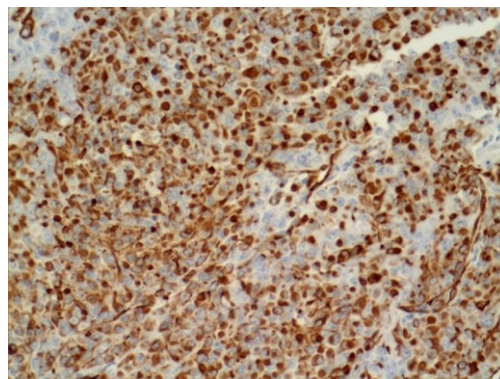
3.11.att. Nieres rabdoīds audzējs—kompjūtertomogrāfijas attēlā redzams liels, heterogēns uzbūves veidojums labajā pusē.

Pirmajā gadījumā audzēja šūnās tika konstatēta tipiskā citoloģiskā triāde: vezikulārs kodols, prominenti tumši sarkani kodoliņi un hialīna sārti citoplazmatiski

ieslēgumi. Otrajā audzējā primārā veidojuma šūnās konstatētie citoplazmātiskie ieslēgumi nebija prominenti. Diagnostiskas grūtības radīja arī izteiktā veidojuma nekroze. Abos gadījumos diagnozes apstiprināšanai tika izdarīta atkārtota imūnhistoķīmiskā izmeklēšana, kurā atrasta vimentīna pozitivitāte, EMA un CKAE1/AE3 pozitivitāte (sk. 3.12.att. un 3.13.att.). Reakcija WT1 proteīna, bcl-2, muskuļu specifiskā aktīna, S100, CD99, NSE, LCA, desmīna, sinaptofizīna un CD34 antigēnu noteikšanai audzēja šūnās bija negatīva (sk. 3.14.att.). Pirmajā gadījumā Ki67 PI bija 42.5%, bet otrajā varēja novērot nespecifisku reakciju šūnu membrānās un PI reāli bija tikai 17.41%.



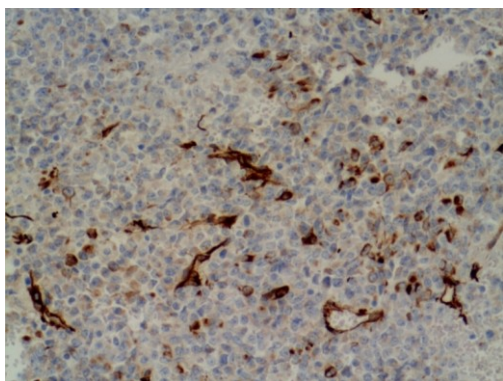
3.12.att. Nieres rabdoīds audzējs - pozitīva vimentīna ekspresija, palielinājums x400.



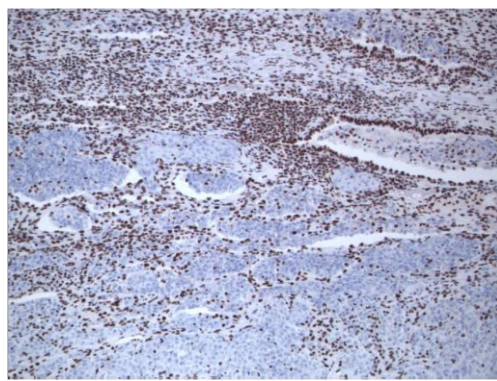
3.13.att. Nieres rabdoīds audzējs- pozitīva CKAE1/AE3 ekspresija, palielinājums x200.

Abos gadījumos tika noteikta INI1 proteīna imūnhistoķīmiskā ekspresija un atrasta negatīva reakcija audzēja šūnu kodolos, kamēr reakcija saglabātajos nierēs audos bija pozitīva (sk. 3.15.att.), kas atbilst 1.1.2. nodaļā aprakstītajam NRA imunoprofīlam.

Klīniski abiem pacientiem novērota rabdoīdajam nierēs audzējam raksturīgā agresīvā gaita. Abiem slimniekiem konstatēja metastāzes plaušās. Vienā gadījumā izdarīta plaušu segmentāra rezekcija, taču pacientei attīstījās atkārtotas plaušu metastāzes, multiplas metastāzes aknās un kaulos, kā arī recidīvs primārā audzēja ložā. Paciente mirusi 9 mēnešus pēc pirmās operācijas. Otram pacientam papildus metastāzēm abu plaušu apakšējās daivās, pēcoperācijas periodā pēc ķīmijterapijas kursa pievienojās dziļa kaulu smadzeņu aplāzija, toksisks kuņģa zarnu trakta bojājums ar asiņošanu, akūts pankreatīts ar toksiskā šoka sindromu un akūta nieru nepietiekamība. Pacients miris nepilnus 2 mēnešus pēc primārā audzēja ekscīzijas.

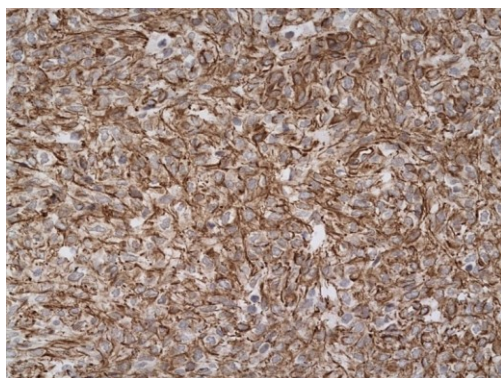


3.14.att. Nieres rabdoīds audzējs negatīva WT1 proteīna ekspresija audzēja šūnu kodolos, nespecifiska reakcija endotēlija šūnās, palielinājums x400.

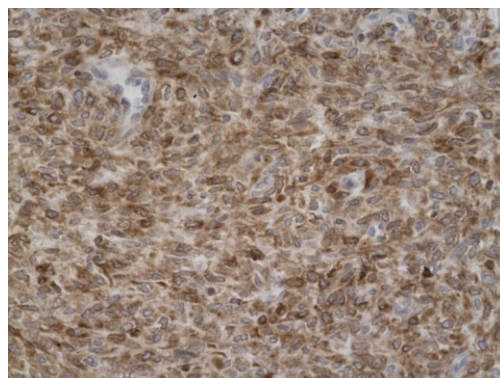


3.15.att. Nieres rabdoīds audzējs- negatīva INI1 ekspresija audzēja šūnu kodolos, pozitīva iekšējā kontrole saglabātajos niere audos, palielinājums x200.

Apskatītājā laika periodā tika diagnosticēts arī tāds rets primārs pediatriks nieru audzējs kā gaišo šūnu sarkoma. Pacients bija 8 mēnešus vecs zēns. Operācijas laikā konstatēts metastātisks process aknu audos. Veidojums cieši saistīts ar vēdera priekšējās sienas muskuļiem. Makroskopiskajā izmeklēšanā patoloģijas nodaļā konstatēts multicistiskas uzbūves audzējs saistīts ar nieres medullāro daļu. Tā svars bija 1050 g, bet izmēri 18x15x9 cm. Preparātu pārskatā konstatēts solīds veidojums ar augstu cellularitāti. Tas sastāv no vārpstveida šūnām ar normohromiem kodoliem, neakcentētiem kodoliņiem. Šūnas vienu no otras atdala ekstracelullārs miksoīds materiāls, kurš vizuāli atgādina gaišu citoplazmu. Veidojumā bieži cistiski deģeneratīvas izmaiņas. Audzēja kompleksi atrasti arī vēdera priekšējās sienas šķērsvītrotajā muskulatūrā. Imūnhistoķīmiski konstatēta vimentīna and bcl-2 citoplazmatiska pozitivitāte (sk. 3.17.att.), kamēr reakcijas WT1 proteīna, CD34, EMA muskuļu specifiskā aktīna, desmīna CKAE1/AE3, LCA noteikšanai bija negatīvas (sk. 3.16.att.). PI bija 30%. Konstatētā histoloģiskā aina un imūnhistoķīmiskais profils bija atbilstošs literatūrā aprakstītajai atradnei nieru gaišo šūnu sarkomas gadījumā (sk. nodaļu 1.1.4.). Pašlaik, 4 gadus pēc diagnozes noteikšanas, konstatēta audzēja remisija.



3.16.att. Nieres gaišo šūnu sarkoma - negatīva nukleāra WT1 proteīna ekspresija, pozitīva reakcija audzēja šūnu citoplazmā, palielinājums x200.



3.17.att. Nieres gaišo šūnu sarkoma- pozitīva bcl-2 ekspresija audzēja šūnu citoplazmā, palielinājums x200.

Preparātu pārskats izdarīts arī primārajā morfoloģiskajā izmeklēšanā diagnosticētās embrionālās rabdomiosarkomas gadījumā. Paciente bija 25 dienas veca meitene ar iedzimtu, fokāli cistisku makroskopiski dzeltenas krāsas nieres audzēju. Audzēja diametrs bija 5,5 cm, makroskopiski operācijas laikā atrasta infiltratīva augšana apkārtējos audos. H&E preparātos konstatēts augstas cellularitātes audzējs, ko veido apaļas, miofibroblastiem līdzīgas vārpstveida šūnas, kuras infitrē nieres audus. Atzīmē arī atsevišķas audzēja nekrozes. Atkārtotajā imūnhistoķīmiskajā izmeklēšanā atrasta vimentīna pozitivitāte. Domājot par embrionālu rabdomiosarkomu, atkārtoti tika veikta muskulāro marķieru MyoD1, muskuļu specifiskā aktīna, desmīna, miogenīna un mioglobīna noteikšana. Visas minētās reakcijas traktējamas kā negatīvas. Arī WT1 proteīna, EMA, CKAE1/AE3, CD34, CD31, LCA antigēni imūnhistoķīmiski netika konstatēti. Atrasta bcl-2 pozitivitāte atsevišķās retās šūnās. Ki67 proliferācijas indekss bija 44.44%. Klīniskie dati, kā arī histoloģiskā un imūnhistoķīmiskā aina vairāk bija atbilstoša diagnozei celullāra mezoblastiska nefroma (infantila renāla fibrosarkoma). Paciente pēcoperācijas periodā saņēmusi mīksto audu sarkomai atbilstošu staru un ķīmijterapiju. Pašlaik, 6 gadus pēc pirmreizējās diagnozes noteikšanas, slimniecei konstatēta audzēja remisija, taču pievienojies vienīgās saglabātās nieres bojājums un hroniska nieru nepietiekamība.

Laikā no 1997. gada janvāra līdz 2012. gada jūlijam BKUS Bērnu Patoloģijas birojā diagnosticēti 2 klasiskas mezoblastiskas nefromas gadījumi. Šajā gadījumā izdarīts H&E preparātu pārskats. Atkārtota imūnhistoķīmiskā izmeklēšana netika veikta, jo diagnoze neradīja šaubas. Audzēju veidoja vārpstveida šūnas, kuras kūlīšu veidā ieaug starp normālajiem audiem. Nekrozes nekonstatē, mitozes ļoti retas. Viens no pacientiem bija pusotru gadu vecs zēns, bet otrā gadījumā konstatēts iedzimts veidojums jaundzimušais neiznestai meitenei, kura mirusi 12. dzīves dienā 3 dienas pēc audzēja un nieres izņemšanas. Pacientes nāvi izraisīja hipoksisks CNS un iekšējo orgānu bojājums. Autopsijā atrasta periventrikulāra leukomalācija galvas smadzenēs un labās nieres kortikāla nekroze.

Arī abi diagnosticētās cistiskās nefromas gadījumi tika izvērtēti tikai H&E preparātos, jo šiem audzējiem ir raksturīga histoloģiskā uzbūve, bet nav raksturīgu imunohistoķīmisku marķieru. Pirmais pacients bija 17 gadus vecs zēns ar nieres audzēju, kura izmērs bija 10x7.5x7 cm. Audzēju veidoja cistas un to septas, kuras izklāj viens epiteliālo šūnu slānis. Otrs pacients bija 9 mēnešus vecs zēns ar nieres cistisku audzēju, kura izmērs bija 20x11x9 cm. Histoloģiski arī šajā veidojumā konstatē cistas un to septas, cistas izklāj kubisks epitēlijs, septās konstatē variablu celullaritāti, tās satur diferencētus un mazdiferencētus mezenhimālos audus. Blastēmas šūnas un nefroblastematozus elementus nekonstatē.

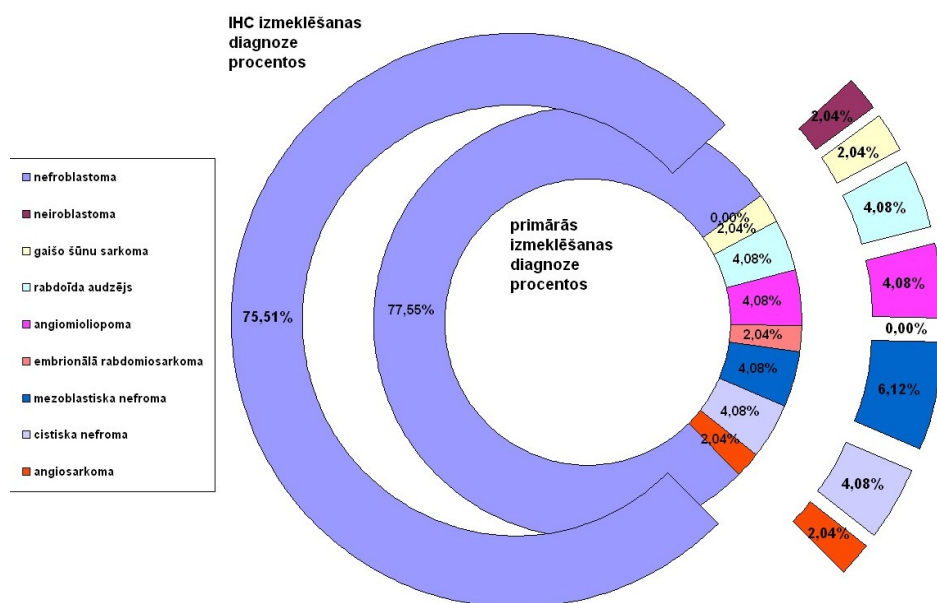
Savukārt abi diagnosticētās angiomiolipomas gadījumi tika analizēti arī imunohistoķīmiski. Pacienti bija 13 gadus vecs zēns un 17 gadus veca meitene. Pirmajā gadījumā veidojums bija 4, bet otrajā 6 cm diametrā. Abiem audzējiem histoloģiski konstatēta samērā tipiska uzbūve. Tie sastāvēja no taukaudiem, vārpstveida un epiteloīdām gludās muskulatūras šūnām un patoloģiskas uzbūves asinsvadiem ar biezu sienu. Imunohistoķīmiski redzama muskuļu specifiskā aktīna un perēklaina S100 pozitivitāte, reakcija epiteliālo marķieru EMA un CKAE1/AE3 noteikšanai bija

negatīva, CD34 bija pozitīvs vaskulārajās struktūrās atbilstoši angiomiolipomas histoloģiskajai ainai. PI bija 4% pirmajā gadījumā un mazāk par 1% otrajā gadījumā.

Vienīgajā konstatētās primāras nieru angiosarkomas gadījumā tika veikts tikai preparātu pārskats H&E preparātos, jo audzējs diagnosticēts 1997. gadā un parafīna blokos saglabāto audu materiāla kvalitāte nebija pietiekoša atkārtotas imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas veikšanai. Līdz ar to nebija pamata veikt esošās diagnozes izmaiņas. Paciente bija 16 gadus veca meitene, kura mirusi nepilnus divus gadus pēc diagnozes noteikšanas.

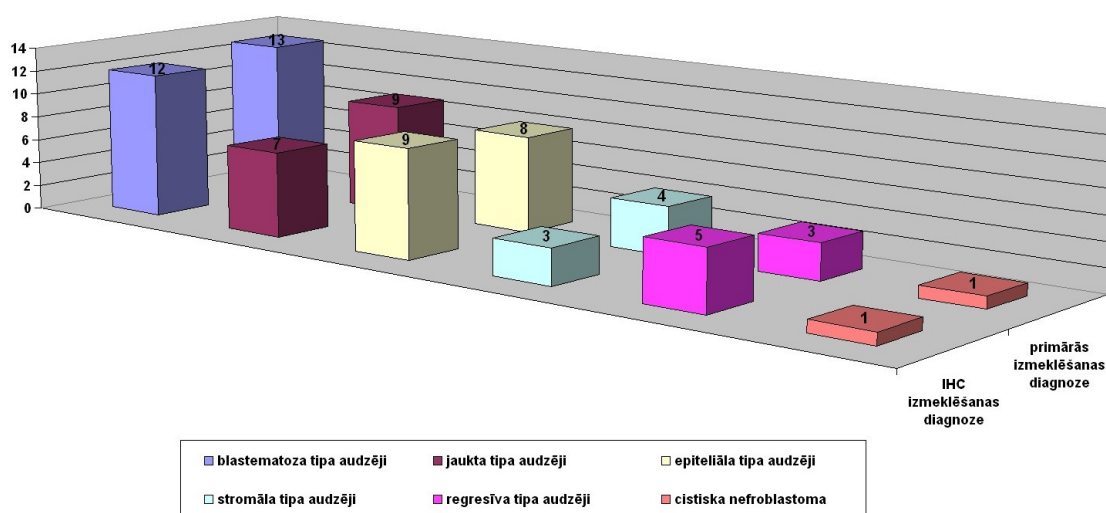
3.1.3. Primāro nieru audzēju morfoloģiskā spektra salīdzinājums pirms un pēc atkārtotas morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas

Analizējot BKUS diagnosticēto primāro nieru audzēju spektru pirms un pēc atkārtotās morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas, redzams, ka abos gadījumos visbiežāk sastopamais jaunveidojums ir nefroblastoma. Saskaņā ar praktizējošo patologu Bērnu patoloģijas birojā veiktās histoloģiskās izmeklēšanas datiem tā veidoja 77,55% (n=38) no visiem nieru audzējiem. Savukārt pēc atkārtotas izmeklēšanas konstatēti 37 nefroblastomas gadījumi, kas bija 75,51% no analizētajiem veidojumiem. Atrasta 1 pirmajā izmeklēšanā nekonstatēta neiroblastoma, kas veidoja 2,04% no visiem audzējiem. Mainīta Bērnu Patoloģijas birojā diagnosticētās embrionālās rabdomiosarkomas diagnoze. Audzējs traktēts kā cellulāra mezoblastiska nefroma (infantila renāla fibrosarkoma), līdz ar to mezoblastiska nefroma veidoja jau vairs ne 4,08 %, bet gan 6,12% no analizētajiem audzējiem. Atkārtotā izmeklēšanā apstiprināta nieru gaišo šūnu sarkomas, nieru rabdoīda audzēja, cistiskas nefromas, angiomiolipomas un angiosarkomas diagnozes (sk. 3.18.att.). Tātad kopumā diagnostiskas neprecizitātes atrastas 2 gadījumos jeb 4,08% no visiem izmeklētajiem audzējiem.



3.18.att. Bērnu Patoloģijas birojā izdarītās morfoloģiskās izmeklēšanas un atkārtotās imūnhistoķīmiskā pārskata rezultātu salīdzinājums (1997. g. janvāris-2012. g. jūlijs).

Atsevišķi aplūkojot nefroblastomu grupu, diagnostiska neprecizitāte konstatēta 1 gadījumā jeb 2,63% no sākotnēji diagnosticētajām nefroblastomām. Analizējot nefroblastomas histoloģiskos tipus pirms un pēc preparātu pārskata redzams, ka no 3 līdz 5 jeb no 7,89% līdz 13,51% pieaudzis regresīva tipa audzēju skaits. Sākotnēji konstatēto blastematozo audzēju skaits bija 13 jeb 34,21% no analizētās grupas. Pēc atkārtotās izmeklēšanas izveidotajā grupā atrastas 12 jeb 32,43% blastematozā tipa nefroblastomas. Minētās izmaiņas saistītas ar to, ka viens no sākotnēji diagnosticētajiem minētajiem audzējiem tika interpretēts kā neuroblastoma. No 23,7% (n=9) uz 18,92% (n=7) mainījies jaukta tipa audzēju skaits, no 21,05% (n=8) uz 24,32% (n=9) mainījies epiteliāla tipa audzēju skaits, bet no 10,52% (n=4) uz 8,1% (n=3) mainījies mezenhimāla tipa audzēju skaits. Abās grupās konstatēta viena cistiska, daļēji diferencēta nefroblastoma. Tā kā mainījies arī kopējais grupā ietilpstošo audzēju skaits, tas veido attiecīgi 2,63% un 2,7% no kopējās grupas. Nefroblastomas histoloģisko tipu sadalījums pirms un pēc atkārtotās morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas atspoguļots arī 3.19.att.



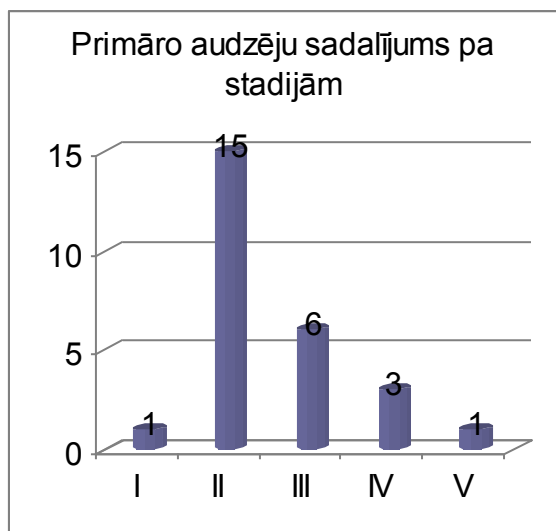
3.19.att. Nefroblastomas histoloģisko tipu sadalījums pirms un pēc atkārtotas izmeklēšanas(1997. gada janvāris-2012. gada jūlijs).

3.2. Imūnhistoķīmiski noteikto, potenciāli prognostiski svarīgo marķieru ekspresija nefroblastomas gadījumā

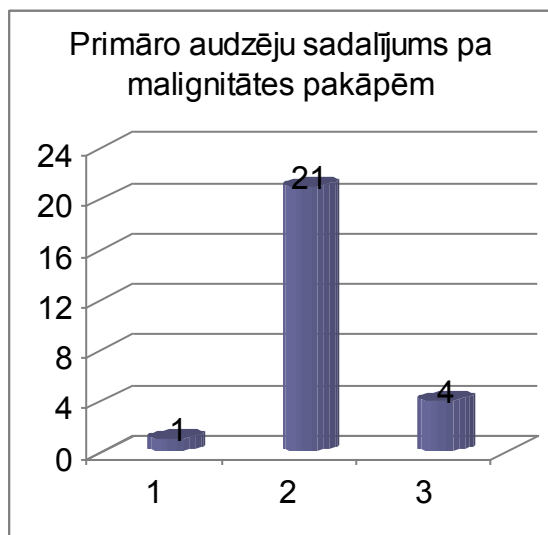
3.2.1. Pētītās grupas pacientu klīnisko un histoloģisko parametru raksturojums

Turpmākajam darbam potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru noteikšanai izmantots materiāls no BKUS Bērnu Patoloģijas birojā analizētajā laika posmā diagnosticētajām 26 primārajām nefroblastomām, kuru gadījumā saglabāto audu kvalitāte bija pietiekoša pilnvērtīgas imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas veikšanai. Papildus veikta arī 8 attālo metastāžu un 1 recidīva audu imūnhistoķīmiskā

izmeklēšana, tātad kopumā analizēti 35 gadījumi. Pacienti pētītajā primāro audzēju grupā bija vecumā no 8 līdz 215 mēnešiem ($M=53,92$, $SD=55,36$, $Mo\ 36$). 3,85% ($n=1$) bija I stadijas audzēji, 57,69% ($n=15$) II stadijas, 23,08% ($n=6$) III stadijas, 11,54% ($n=3$) IV stadijas, bet 3,85% ($n=1$) V stadijas audzēji (sk. 3.20.att.). Analizētā materiāla lielāko daļu 80,77% ($n=21$) veidoja vidējas malignitātes pakāpes audzēji, augstas malignitātes pakāpes audzēji konstatēti 15,38% ($n=4$), bet zemas malignitātes pakāpes 3,85% ($n=1$) gadījumu (sk. 3.21.att.).

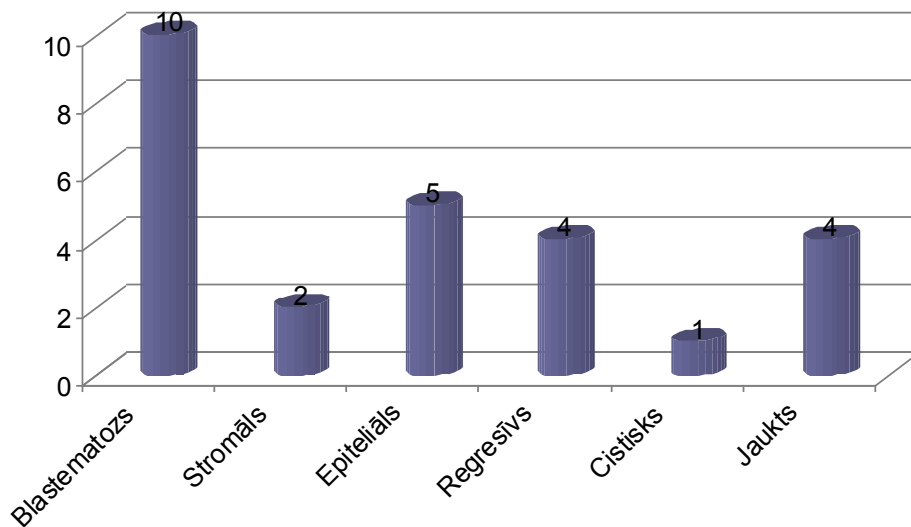


3.20.att. Primāro audzēju sadalījums pa stadijām imūnhistoķīmiski analizētajā grupā.



3.21.att. Primāro audzēju sadalījums pa malignitātes pakāpēm imūnhistoķīmiski analizētajā grupā.

Atkarībā no histoloģiskā tipa pētītie audzēji tika iedalīti sekojoši: blastematoza tipa audzēji 38,46% ($n=10$), epiteliāla tipa 19,23% ($n=5$), jaukta tipa 15,38% ($n=4$), regresīva tipa 15,38% ($n=4$), stromāla tipa 7,69% ($n=2$), bet 3,85% ($n=1$) atrasta cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma (sk. 3.22.att.). Visos primārajos veidojumos konstatēta labvēlīga histoloģiskā aina. Difūza vai fokāla anaplāzija netika atrasta. 57,69% no gadījumiem ($n=15$) pirms operācijas veikta ķīmijterapija, 42,31% pacientiem ($n=11$) vispirms veikta nieres un audzēja izņemšana.

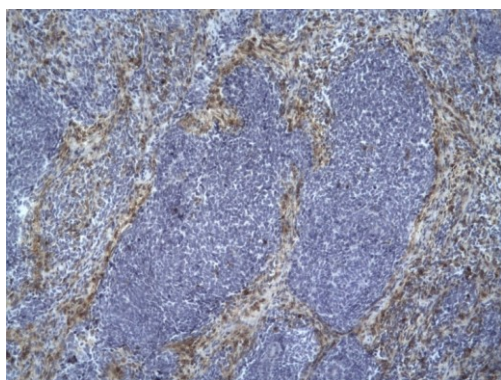


3.22.att. Primāro audzēju sadalījums pa histoloģiskajiem tipiem imūnhistoķīmiski analizētajā primāro audzēju grupā.

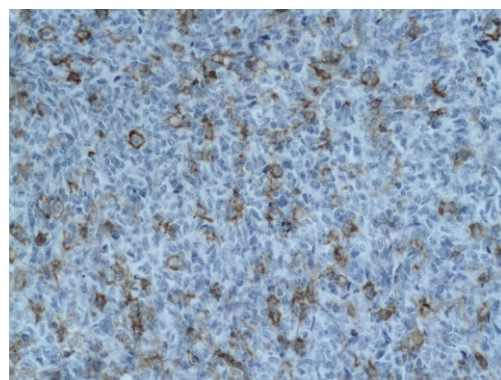
Pirms operācijas ārstēto audzēju grupā 10 gadījumos jeb 66,67% klīniski atzīmēja labu audzēja reakciju uz izdarīto ķīmijterapiju, bet 5 gadījumos jeb 33,33% atrasta nelielu veidojuma izmēru samazināšanās vai pat tā palielināšanās uz izdarītās ārstēšanas fona. 92,31% (n=24) no analizēto nefroblastomu pacientiem bija dzīvi, 7,69% (n=2) pacienti bija miruši. Abos gadījumos mirušo pacientu dzīvildze pēc diagnozes noteikšanas bija mazāka par diviem gadiem. Progresējoša slimības gaita (recidīva vai metastāžu attīstību pēc primārā audzēja izņemšanas un sekojošas ķīmijterapijas) novērota 11,54% (n=3) gadījumu, kamēr 88,46% (n=23) ļaundabīgā procesa progresiju nekonstatē. Vienā no progresējošas slimības gaitas gadījumiem metastātiskais process plaušās attīstījies atkārtoti un ķirurģiski ārstēts 2 reizes. Pašlaik trešo reizi konstatētas metastāzes plaušās, kuras ķirurģiski netiek ārstētas. Vienā no audzēja progresijas gadījumiem pacients pašlaik ir miris, otrā gadījumā atrodas paliatīvajā aprūpē, bet trešajā konstatēta audzēja remisija un paciente pašlaik, 11 gadus pēc metastātiskā procesa konstatācijas, ir dzīva. Metastāžu un recidīva grupā pavisam izmeklēts materiāls no 9 gadījumiem (8 metastāzes un 1 recidīvs) 6 pacientiem, jo 2 slimniecēm konstatētas atkārtotas metastāzes (sk. nodaļu 3.1.1.). Pacienti pirmā metastātiskā procesa diagnostikas brīdī bija vecumā no 120 līdz 14 mēnešiem. 3 jeb 50% no slimniekiem pašlaik konstatēta audzēja remisija, 2 jeb 33,33% ir miruši. Vienā gadījumā jeb 16,67% paciente atrodas paliatīvajā aprūpē atkārtotas plaušu metastāzes un izteikta kaulu smadzeņu nomākuma dēļ. 3 jeb 50% jeb gadījumu izmeklēšanai ir pieejams un pētāmāajā grupā ir iekļauts arī primārā audzēja audu materiāls. 3 gadījumos primārais audzējs diagnosticēts pirms 1998. gada un atkārtotai imūnhistoķīmiskai izmeklēšanai audu materiāls nebija izmantojams. Vienīgajā recidīva gadījumā atrasta difūza anaplāzija, kuras nebija primārā audzēja materiālā.

3.2.2. CD44s glikoproteīda izoformas ekspresija

Analizējot visus primāras nefroblastomas gadījumus neatkarīgi no klīniskajiem un histoloģiskajiem parametriem vidējais CD44s pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 3,76% (diapazons 0,00%-17,41%; SD 4,85%), stromālajā komponentā M=34,54% (diapazons 8,93%-78,49%; SD 19,93%), savukārt vidējais pozitīvo epiteliālo struktūru skaits redzes laukā bija 7 (diapazons 0-44; SD 14,2;). Metastāžu un recidīva grupā blastematozajā komponentā M=3,39% (diapazons 0,76%-9,98%; SD 3,16%), stromālajā komponentā M=48,69% (diapazons 16,62%-97,42%; SD 28,22), bet epiteliālajā komponentā M=3,75 (diapazons 0-9; SD 4,11). Visaugstākā reakcijas intensitāte atrasta stromālajā komponentā, kas būtībā atbilst normai un ir izskaidrojama ar parasti eksistējošo pozitīvo CD44s ekspresiju fibroblastos (sk. 3.23.att.). Salīdzinoši zemāku reakcijas intensitāti gan primāro audzēju, gan atkārtota procesa gadījumā konstatē blastematozajā veidojuma daļā (sk. 3.24.att.).

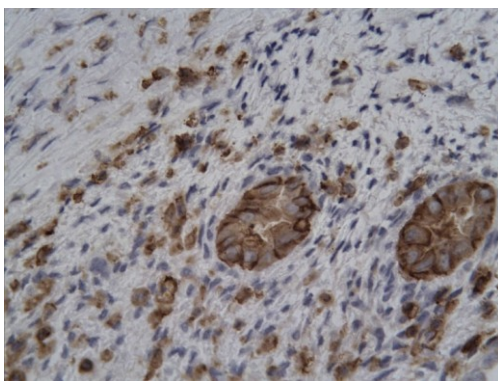


3.23.att. Pozitīva CD44s ekspresija blastematoza tipa nefroblastomas stromā, negatīva reakcija blastematozā komponenta šūnās, palielinājums x100.

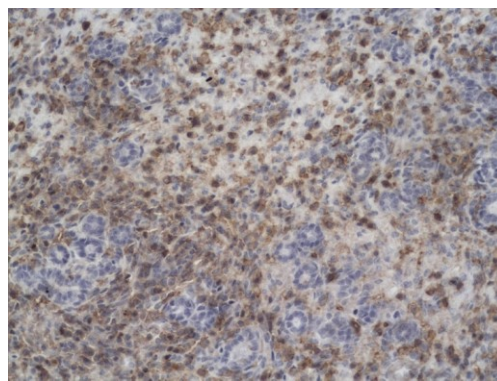


3.24.att. Pozitīva CD44s ekspresija blastematoza tipa nefroblastomas recidīva blastematozās daļas šūnās, palielinājums x200.

Epiteliālajā komponentā pārsvarā konstatē nevienmērīgu reakcijas intensitāti, kad daļa epiteliālo struktūru ir pilnībā negatīvas, bet daļa pilnībā pozitīvas (sk. 3.25.att. un 3.26.att.).



3.25.att. Atsevišķas CD44s pozitīvas epiteliālas struktūras jaukta tipa nefroblastomas gadījumā (audzējs pēc preoperatīvas ķīmijterapijas), palielinājums x100.



3.26.att. CD44s pozitīvitate blastematozās un stromas daļās šūnās jaukta tipa nefroblastomas gadījumā (audzējs pēc preoperatīvas ķīmijterapijas), palielinājums x200).

Jāatzīmē, ka vidējais lielums metastāžu/recidīva grupā aprēķināts izmantojot visus šajā grupā ietilpstošos gadījumus, taču vienīgajā recidīva un audzēja anaplāzijas materiālā konstatētais CD44s pozitīvo šūnu skaits bija 9,98%, kas ir augstāks par vidējo šajā grupā. Stromālajā komponentā CD44s pozitīvās šūnas veidoja 20,36%, savukārt epiteliālā komponenta materiāla praktiski nebija. Salīdzinot reakciju trijos pieejamos primārā audzēja un tā paša procesa metastāzes vai recidīva audos iegūtais rezultāts atspoguļots tabulā 3.1.

3.1.tabula

CD44s pozitīvo šūnu un epiteliālo struktūru daudzums primārā audzēja un atkārtotā procesa gadījumā

N.p.k.	Primārais audzējs			Atkārtotais audzējs		
	blastem. komp.	stromāls komp.	epit. komp.	blastem. komp.	stromāls komp.	epit. komp.
1.	—	26,76%	0,00	3,33%	16,62%	9,00
2.	11,88	34,21%	—	9,98%	20,36%	—
3.	—	48,61%	0,00	1) — 2) 0,76%	1) 34,53% 2) —	1) 5,00 2) 1,00

„—” lielums nav noteikts

Lai gan iegūtos datus nevar korekti statistiski salīdzināt, tomēr redzams, ka izteiktas CD44s ekspresijas atšķirības primāro audzēju un atkārtotā procesa gadījumā nav. Interesanti, ka 3.gadījumā primārais audzējs pieder pie epiteliālā tipa un tajā praktiski nav blastematozā komponenta. Tāpat minētajam pacientam blastematozā komponenta nav pirmās metastāzes audos, savukārt otrā metastāze sastāv pārsvarā no blastēmas šūnām. Arī 1. gadījumā primārajā audzējā praktiski nav blastēmas šūnu. Tās konstatētas tikai metastāzes audos. Izmantojot Manna-Vitneja testu CD44s ekspresijas salīdzināšanai kopējā primāro audzēju un metastāžu/recidīva grupā, statistiski būtiski paaugstinātu CD44s ekspresiju metastātisko audzēju stromā salīdzinot ar primāras nefroblastomas stromu nekonstatē ($p=0,186$). Tāpat nebija statistiski būtiskas atšķirības

starp reakcijas intensitāti abās grupās blastematozajā un epiteliālajā audzēja komponentā (attiecīgi $p=0,664$; $p=0,488$).

Aplūkojot CD44s ekspresiju atkarībā no veidojuma stadijām, redzams, ka vienīgajā I stadijas audzēja gadījumā blastematozu reakcijas pozitivitāti neatrod. Šajā gadījumā audzējs pieder pie regresīva tipa veidojumu grupas un blastematozā komponenta tajā praktiski nav. Savukārt stromālajā komponentā noteiktais CD44s pozitīvo šūnu skaits ir 73,15%. Epiteliālajā komponentā atrastas 44 CD44s pozitīvas tubulāras struktūras, kas ir maksimālais primāro audzēju grupā konstatētais skaits. Analizētajā grupā vienīgajā V stadijas audzēja gadījumā CD44s pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā bija 12%, stromālajā 28,5%, un tika konstatētas 2 pozitīvas epiteliālas struktūras. CD44s pozitīvo šūnu daudzums atspoguļots tabulā 3.2 un 3.27.att.

3.2. tabula

CD44s pozitīvo šūnu daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	—	—	—	—	—	—
II	3,98	5,56	0,00	17,41	0,23	7,72
III	1,36	1,99	0,00	4,23	0,00	4,53
IV	3,40	2,30	0,78	5,27	0,00	9,20
V	12,00	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

CD44s pozitīvo šūnu daudzums stromālajā komponentā atspoguļots 3.3. tabulā.

3.3. tabula

CD44s pozitīvo šūnu daudzums (%) stromālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	73,15	—	—	—	—	—
II	35,92	17,0	10,11	78,49	26,05	45,89
III	21,53	16,08	8,93	48,61	1,55	41,50
IV	38,72	2,30	30,15	70,88	36,18	113,63
V	28,50	—	—	—	—	—

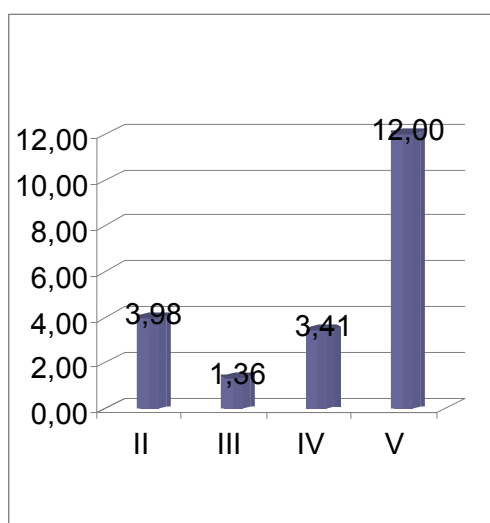
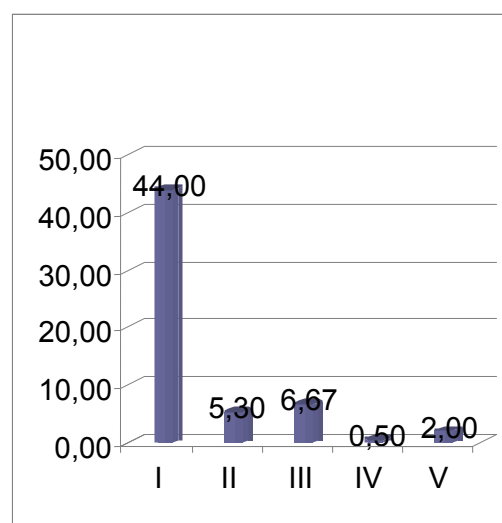
„—” lielums nav noteikts

CD44s pozitīvo epiteliālo struktūru daudzums atspoguļots tab. 3.4. un 3.28.att.

CD44s pozitīvo epiteliālo struktūru daudzums atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	44,00	—	—	—	—	—
II	5,30	10,49	0,00	33,00	0,00	12,81
III	6,66	16,32	0,00	40,00	0,00	23,80
IV	0,50	0,70	0,00	1,00	0,00	6,85
V	2,0	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

**3.27.att. CD44s pozitīvo šūnu vidējais daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas.****3.28.att. CD44s pozitīvo struktūru vidējais daudzums epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas.**

Izmantojot Manna – Vitneja testu CD44s ekspresijas salīdzināšanai zemas un augstas stadijas audzēju gadījumā (I un II stadijas audzēju grupa salīdzināta ar III, IV un V stadijas audzēju grupu) statistiski būtiski atšķirīgu reakcijas intensitāti nekonstatē ne blastematozajā, ne stromālajā, ne epiteliālajā komponentā (attiecīgi $p=0,13$; $p=1$; $p=0,35$).

Pētot CD44s ekspresiju saistībā ar nefroblastomas malignitātes pakāpi redzams, ka vienīgajā zemas malignitātes audzēja gadījumā pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 0%. Tāpat netika atrastas pozitīvas epiteliālas struktūras. Stromālajā daļā reakcijas intensitāte netika raksturota, jo audzējs sastāvēja galvenokārt no liela izmēra cistām, kuru septās atrodami atsevišķi nefroblastiski elementi līdz ar to šī komponenta reaktivitāte adekvāti nebija nosakāma. Vidējas malignitātes audzēju grupā vidējais CD44s pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā atspoguļots tabulā 3.5 un 3.29.att.

3.5. tabula

CD44s pozitīvo šūnu daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes

Malignitātes pakāpe	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Zema	0,00	—	—	—	—	—
Vidēja	2,76	3,23	0,00	12,00	0,89	4,60
Augsta	8,19	7,80	1,20	17,41	0,00	20,60

„—” lielums nav noteikts

CD44s pozitīvo šūnu daudzums stromālajā komponentā atkarībā no malignitātes pakāpes atspoguļots tabulā 3.6.

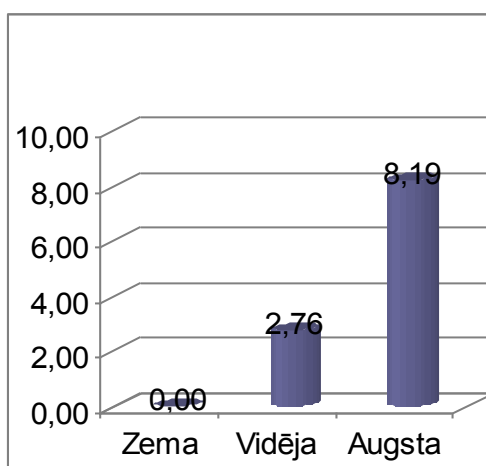
3.6. tabula

CD44s pozitīvo šūnu daudzums (%) stromālajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes

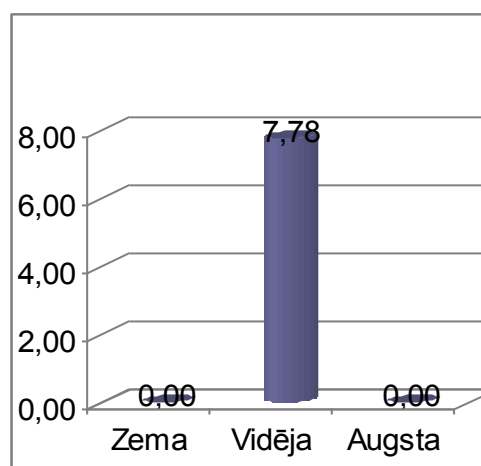
Malignitātes pakāpe	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Zema	—	—	—	—	—	—
Vidēja	33,55	21,07	8,93	78,49	21,07	33,55
Augsta	41,55	6,97	34,21	48,11	24,17	58,82

„—” lielums nav noteikts

Runājot par epiteliālo komponentu, vidējas malignitātes audzēju grupā tajā vidēji atrastas 7,77 CD44s pozitīvas struktūras (diapazons 0%-44%, SD 14,08%, CI 95% ar apakšējo robežu 0,41, augšējo 15,13). Visi 4 augstas malignitātes pakāpes audzēji piederēja pie blastematozā apakštipa, trijos praktiski nebija epiteliālā komponenta (<5%) un CD44s ekspresija netika raksturota. Vienā augstas malignitātes pakāpes nefroblastomas gadījumā epiteliālais komponents bija saglabāts, bet netika atrasta neviena CD44s pozitīva struktūra (sk. 3.30.att.).



3.29.att. CD44s pozitīvo šūnu vidējais daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes.



3.30.att. CD44s pozitīvo struktūru vidējais daudzums epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes.

Izmantojot Manna-Vitneja testu, statistiski būtiska atšķirība starp CD44s ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā zemas un vidējas malignitātes audzēju grupā salīdzinot ar augstas malignitātes audzēju grupu netika konstatēta (attiecīgi $p=0,16$; $p=0,25$; $p=0,75$).

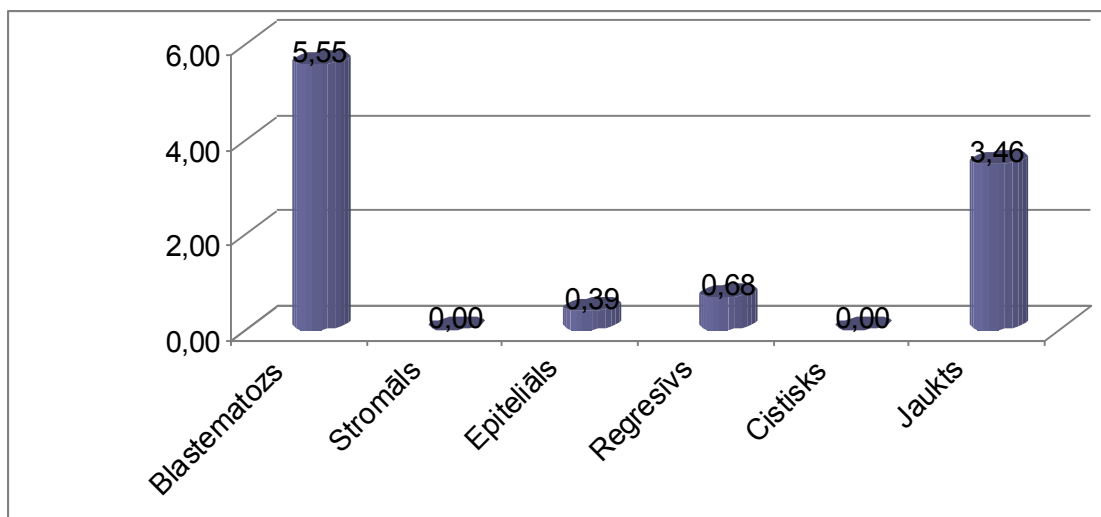
CD44s ekspresivitāte blastematozajā komponentā atkarībā no prevalējošā histoloģiskā tipa redzama tabulā 3.7 un 3.31.att. Stromāla tipa audzējos blastematozais komponents bija niecīgs tāpēc imūnhistoķīmisko marķieru ekspresivitāte tajos netika noteikta, cistiskas daļēji diferencētas nefroblastomas gadījumā CD44s pozitīvas šūnas blastematozajā komponentā netika atrastas.

3.7. tabula

CD44s pozitīvo šūnu daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Blastematozs	5,55	5,99	0,00	17,41	1,26	9,83
Stromāls	—	—	—	—	—	—
Epiteliāls	0,39	0,55	0,00	0,78	0,00	5,34
Regresīvs	0,68	0,96	0,00	1,36	0,00	9,32
Jaukts	3,45	1,99	0,63	5,27	0,28	6,62
Cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	0,00	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts



3.31.att. CD44s pozitīvo šūnu daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa.

Vidējais CD44s pozitīvo šūnu daudzums stromālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa redzams tabulā 3.8.

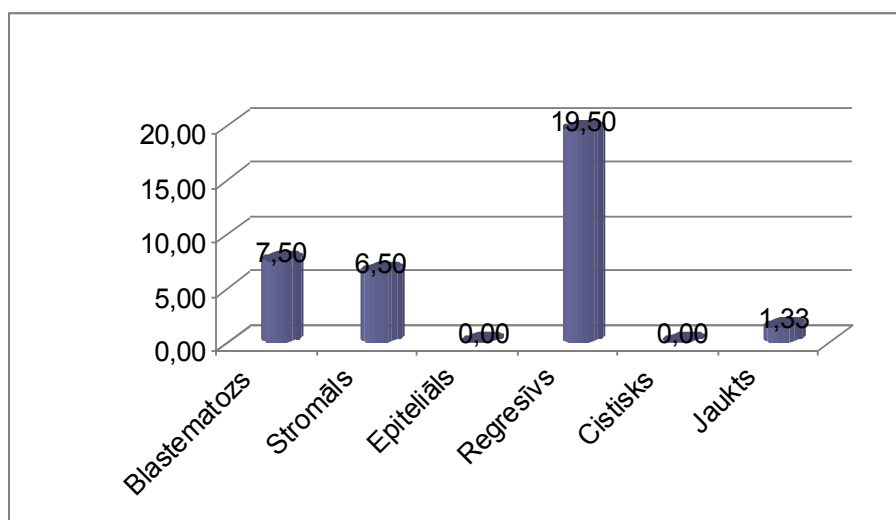
3.8. tabula

CD44s pozitīvo šūnu daudzums (%) stromālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Blastematozs	26,81	14,05	8,93	48,11	16,00	37,61
Stromāls	38,36	22,47	22,47	54,26	0,00	240,33
Epiteliāls	30,17	13,45	11,08	48,61	13,46	46,88
Regresīvs	33,39	27,94	10,11	73,15	0,00	77,85
Jaukts	56,64	21,36	34,21	78,49	22,64	90,64
Cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	—	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

Vidējais CD44s pozitīvo epiteliālo struktūru skaits atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa redzams tabulā 3.9 un 3.32.att.



3.32.att. CD44s pozitīvo epiteliālo struktūru vidējais daudzums atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa.

3.9. tabula

CD44s pozitīvo epiteliālo struktūru daudzums atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Blastematozs	7,50	15,97	0,00	40,00	0,00	24,26
Stromāls	6,50	9,19	0,00	13,00	0,00	89,09
Epiteliāls	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Regresīvs	19,50	22,39	0,00	44,00	0,00	55,14
Jaukts	1,33	0,57	1,00	2,00	0,00	2,76
Cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	0,00	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

Izmantojot Manna-Vitneja testu statistiski būtisku atšķirību starp CD44s ekspresiju blastematoza tipa audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā, salīdzinot ar pārējiem histoloģiskajiem tipiem, nekonstatē (attiecīgi $p=0,093$; $p=0,21$; $p=0,791$). Tāpat netika atrasta statistiski būtiska atšķirība starp imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitāti stromāla tipa audzēju stromālajā un epiteliālajā komponentā salīdzinot ar pārējiem histoloģiskajiem variantiem ($p=0,676$; $p=0,84$). CD44s ekspresija epiteliāla tipa veidojumu blastematozajā un stromālajā komponentā nebija būtiski atšķirīga no reakcijas intensitātes citu audzēju gadījumā ($p=0,125$; $p=0,749$), bet bija būtiski pazemināta epiteliālajā komponentā ($p=0,043$). Regresīva tipa audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā reakcijas intensitāte nebija būtiski atšķirīga no CD44s ekspresijas citu histoloģisko tipu gadījumā ($p=0,257$; $p=0,58$; $p=0,172$). Salīdzinot jaukta tipa audzējus ar pārējiem veidojumiem būtisku atšķirību starp CD44s ekspresiju blastematozajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē

($p=0,482$; $p=0,428$), bet ir būtiski paaugstināta CD44s ekspresija stromālajā komponentā ($p=0,027$).

Vidējais CD44s pozitīvo šūnu un epiteliālo struktūru skaits audzējiem, kuriem pirms operācijas veikta ķīmijterapija redzams tabulā 3.10.

3.10. tabula

CD44s pozitīvo šūnu (%) un epiteliālo struktūru daudzums histoloģiskajos komponentos audzējiem pēc izdarītas ķīmijterapijas

Histoloģiskais komponents	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	aAugšējā robeža
Blastematozs	4,20%	6,19%	0,00%	17,41%	0,00	8,97
Stromāls	40,06%	20,25%	10,11%	78,49%	27,82	52,30
Epiteliāls	7,75	15,00	0,00	44,00	0,00	17,28

Vidējais CD44s pozitīvo šūnu un epiteliālo struktūru skaits ķīmijterapijas neietekmētā materiālā redzams tabulā 3.11.

3.11. tabula

CD44s pozitīvo šūnu (%) un epiteliālo struktūru daudzums histoloģiskajos komponentos ķīmijterapijas neietekmētā audzēja materiālā

Histoloģiskais komponents	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Blastematozs	3,35%	3,55%	0,00%	12,00%	0,81	5,90
Stromāls	28,02%	18,32%	8,93%	70,88%	15,71	40,33
Epiteliāls	5,87	13,82	0,00	40,00	0,00	17,43

Statistiski būtiska atšķirība starp CD44s ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā ķīmijterapijas ietekmētā un neietekmētā materiālā netika konstatēta (attiecīgi $p=0,53$; $p=0,14$; $p=0,62$). Atsevišķi analizējot pirms operācijas periodā ārstēto nefroblastomu grupu atrasta paaugstināta CD44s ekspresija visos histoloģiskajos komponentos tajos audzējos, kuru reakcija uz ķīmijterapiju bija slikta salīdzinot ar tiem gadījumiem, kad klīniski konstatēta izteikta veidojuma izmēru samazināšanās (sk. tabula 3.12). Ja audzēja reakcija uz ķīmijterapiju bija laba, tad vidējais CD44s pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija $M=0,96\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 2,17), stromālajā komponentā $M=39,8\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 27,84, augšējo 51,75), bet vidējais pozitīvo epiteliālo struktūru skaits bija 6,44 (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 17,75). Ja konstatēta slikta veidojuma reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ārstēšanu blastematozajā komponentā $M=8,26\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 20,76), stromālajā komponentā $M=40,93\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 127,09), bet epiteliālajā daļā vidējais pozitīvo struktūru skaits $M=11,66$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 57,62). Tomēr statistiski būtisku atšķirību starp CD44s ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā audzējiem ar klīniski labu un sliktu reakciju uz ķīmijterapiju neatrod (attiecīgi $p=0,13$; $p=1$; $p=0,35$).

3.12. tabula

CD44s pozitīvo šūnu (%) un epiteliālo struktūru daudzums histoloģiskajos komponentos atkarībā no audzēja reakcijas uz ķīmijterapiju

Histoloģiskais komponents	M		SD		Min		Max	
	+	—	+	—	+	—	+	—
blastematozs	0,96%	8,26%	0,97%	7,86%	0,00%	0,00%	2,27%	17,41%
stromāls	39,80%	40,93%	16,71%	34,68%	18,68%	10,11%	73,15%	78,49%
epiteliāls	6,44	11,66	14,71	18,50	0,00	0,00	44,00	33,00

„+” audzēja reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ķīmijterapiju vērtējama kā laba

„—” audzēja reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ķīmijterapiju vērtējama kā slikta

Mirušo pacientu grupā vidējais CD44s pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā $M=7,89\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 58,55), stromālajā komponentā 25,68% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 134). Epiteliālā komponentā reaktivitāte noteikta tikai vienā gadījumā, kur konstatētas 3 CD44s pozitīvas struktūras redzes laukā. Otram mirušajam pacientam tika konstatēts blastematoza tipa audzējs, kurā praktiski nebija epiteliāla komponenta. Izdzīvojušo slimnieku grupā vidējais CD44s pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā $M=3,27\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,85, augšējo 5,69), stromālajā komponentā 35,35% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 26,25, augšējo 44,44). Epiteliālajā komponentā vidējais pozitīvo struktūru skaits $M=7,2$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,19, augšējo 14,22). Redzams, ka mirušajiem pacientiem ir nedaudz augstāks marķiera ekspresijas līmenis blastematozajā komponentā salīdzinot ar izdzīvojušo slimnieku grupu, bet izdzīvojušajiem pacientiem augstāka CD44s ekspresija stromālajā komponentā salīdzinot ar mirušo slimnieku grupu (sk. tabulu 3.13), tomēr statistiski būtisku atšķirību starp CD44s ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā neatrod ($p=0,182$; $p=0,56$; $p=0,307$).

3.13. tabula

CD44s pozitīvo šūnu (%) un epiteliālo struktūru daudzums histoloģiskajos komponentos izdzīvojušo un mirušo pacientu grupās

Histoloģiskais komponents	M		SD		Min		Max	
	dzīvi	miruši	dzīvi	miruši	dzīvi	miruši	dzīvi	miruši
blastematozs	3,27%	7,89%	4,70%	5,60%	0,00%	3,91%	17,41%	11,18%
stromāls	35,35%	25,68%	8,93%	12,05%	8,93%	17,16%	78,49%	34,21%
epiteliāls	7,20	3,0	14,56	—	0,00	—	44	—

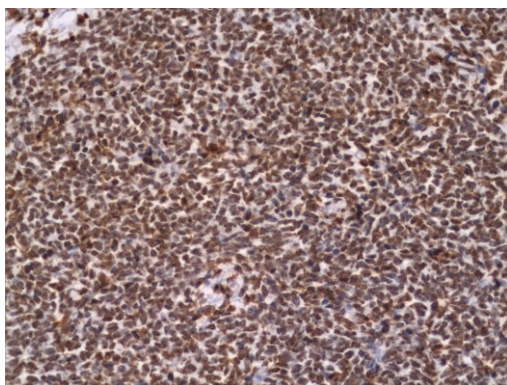
„—” lielums nav noteikts

To nefroblastomu grupā, kurām uz izdarītās operatīvās un ķīmijterapijas fona, konstatēta progresējoša ļaundabīgā procesa gaita, divos gadījumos no esošajiem trim primārie audzēji piederēja pie epiteliālā tipa un izvērtējams blastematozs komponents tajos netika atrasts. Abos gadījumos epiteliālajā komponentā netika konstatēta neviena CD44s pozitīva struktūra. Vienīgajā veidojumā, kurā atrasts blastematozais komponents CD44s pozitīvās šūnas veidoja 11,88% no tā šūnām. Šajā audzējā savukārt praktiski nebija epiteliālā komponenta. Stromālajā komponentā progresējošas gaitas gadījumā

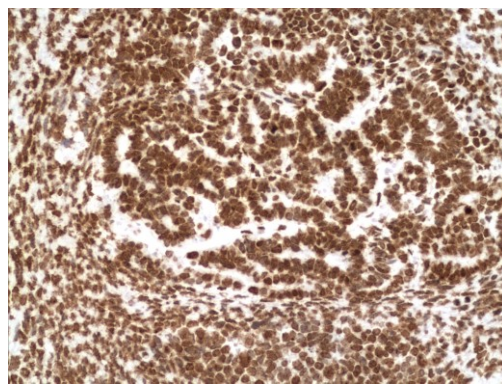
M=36,52% (diapazons 26,76%-48,61; SD 11,1; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 8,93, augšējo 64,11). Tajos gadījumos, kad metastāžu vai recidīva attīstību uz izdarītās ārstēšanas fona nenovēro, blastematozajā komponentā M=3,31% (diapazons 0%-17,41%; SD 4,57; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 1,03, augšējo 5,58), stromālajā komponentā 34,26% (diapazons 8,93%-78,49%; SD 21,07; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 26,44, augšējo 43,85), epiteliālajā komponentā vidēji atrastas 7,77 CD44s pozitīvas epiteliālas struktūras (diapazons 0-44; SD 14,8; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,41, augšējo 15,13). Statistiski būtisku atšķirību starp CD44s ekspresiju abu grupu veidojumu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nenovēro ($p=0,19$; $p=0,6$; $p=0,17$).

3.2.3. Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16^{INK4a} kodētā p16^{INK4a} proteīna ekspresija

Primāro audzēju grupā vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā M=76,91% (diapazons 0,94%-100%; SD 26,31%), stromālajā komponentā M=78,3% (diapazons 0,80%-100%; SD 27,42%), epiteliālajā komponentā M=86,86% (diapazons 0,00%-100%; SD 24,65%). Metastātisko audzēju un recidīva grupā blastematozajā komponentā M=92,73% (diapazons 81,09%-99,23%; SD 6,66%), stromālajā komponentā M=93,47% (diapazons 82,75%-100,00%; SD 6,54%), epiteliālajā komponentā M=91,4% (diapazons 86,53%-97,00%; SD 4,37%). Vienīgajā anaplastiskas histoloģijas audzēja recidīva gadījumā p16^{INK4a} pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 92,77%, bet stromālajā komponentā 92,47%, kas nav atšķirīgs no kopējās metastāžu un recidīva grupas rādītājiem. Šajā grupā atrasta tikai nukleāra pozitivitāte. Kopumā reakcijas intensitāte vērtējama kā augsta. Pozitīvo šūnu skaits vairāk par 80% blastematozajā komponentā jāatzīmē 66,66% ($n=12$), bet epiteliālajā komponentā vairāk par 85% ($n=17$) no analizētajiem primāro audzēju gadījumiem (sk. 3.33.att., 3.34.att.). Metastāžu/ recidīva grupā p16^{INK4a} pozitīvo šūnu skaits vairāk par 80% sastopams 100% no pētītajiem gadījumiem (procentuālie aprēķini veikti izmantojot datus tikai par materiālu, kurā attiecīgais histoloģiskais komponents ir pietiekoši daudzumā).



3.33.att. Pozitīva p16^{INK4a} ekspresija nefroblastomas blastematozā komponenta šūnu kodolos, palielinājums x200.



3.34.att. Pozitīva p16^{INK4a} ekspresija nefroblastomas epiteliālā un blastematozā komponenta šūnu kodolos, palielinājums x200.

Būtiskas imūnhistoķīmiskās reakcijas atšķirības starp primāro audzēju un tā atkārtoto procesu nenovēro (sk. tabulu 3.14). Izmantojot Manna-Vitneja testu p16^{INK4a} ekspresijas salīdzināšanai kopējā primāro audzēju un metastāžu/recidīva grupā, statistiski būtiski paaugstinātu reakcijas intensitāti metastātisko audzēju blastematozajā, epiteliālajā un stromālajā komponentā salīdzinot ar p16^{INK4a} ekspresiju minētajos histoloģiskajos komponentos primāro nefroblastomu gadījumā nekonstatē (attiecīgi p=0,276; p=0,391; p=0,177).

3.14.tabula

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) primārā audzēja un tā atkārtotā procesa gadījumā

N.p.k.	Primārais audzējs			Atkārtotais audzējs		
	blastem. komp.	stromāls komp.	epit. komp.	blastem. komp.	stromāls komp.	epit. komp.
1.	—	91,93	92,63	98,33	95,00	97,00
2.	89,00	77,46	—	92,77	92,47	—
3.	—	88,88	100,00	1) — 2) 94,61	1) 82,75 2) —	1) 92,10 2) 90,00

„—” lielums nav noteikts

Analizējot p16^{INK4a} ekspresiju atkarībā no veidojuma stadijām, analogiski kā pētīt CD44s reaktivitāti, redzams, ka vienīgajā I stadijas audzēja gadījumā blastematozā komponenta tajā praktiski nav, stromālajā komponentā noteiktais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu skaits ir 95,27%, bet epiteliālajā komponentā 96,33%. Analizētajā grupā vienīgajā V stadijas audzēja gadījumā p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā bija 94% un stromālajā 80%, bet epiteliālajā audzēja daļā p16^{INK4a} pozitīvas šūnas netika konstatētas. P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas redzams tabulā 3.15 un 3.35.att.

3.15. tabula

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	—	—	—	—	—	—
II	83,60	14,58	58,80	100,00	73,32	94,19
III	73,88	25,48	35,86	89,58	33,34	114,43
IV	83,47	27,39	51,85	100,00	15,41	151,52
V	94,00	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums stromālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas redzams tabulā 3. 16.

3.16. tabula

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) stromālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	95,27	—	—	—	—	—
II	84,97	18,07	37,97	100,00	74,05	95,89
III	72,10	28,98	25,00	99,20	36,11	108,09
IV	79,93	33,15	41,66	100,00	0,00	162,03
V	80,00	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

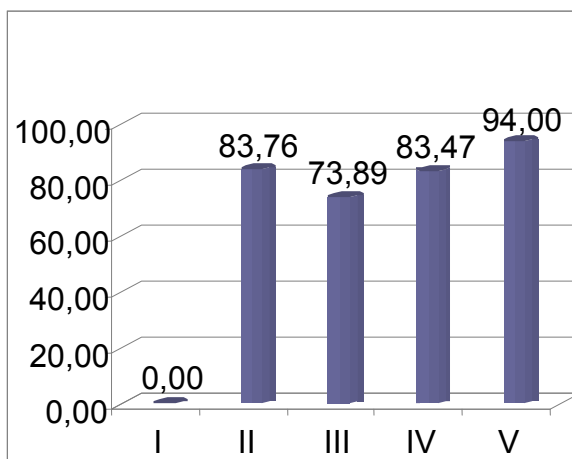
P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas atspoguļots tabulā 3.17 un 3.36.att.

3.17. tabula

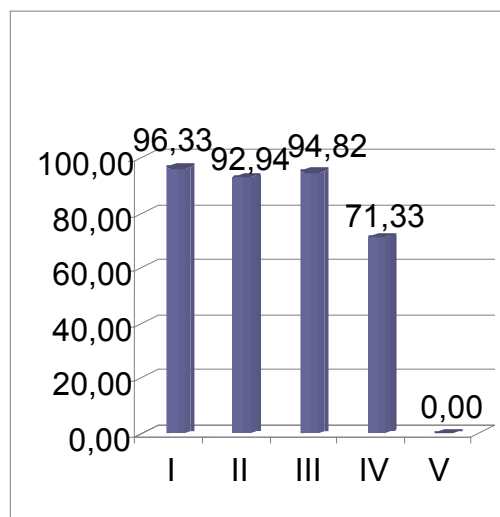
P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	96,33	—	—	—	—	—
II	92,93	9,36	70,58	100,00	86,23	99,63
III	94,81	7,07	80,69	100,00	87,39	102,24
IV	71,33	40,54	42,66	100,00	0,00	435,61
V	0	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts



3.35.att. P16^{INK4a} pozitīvo šūnu vidējais daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas.



3.36.att. P16^{INK4a} pozitīvo šūnu vidējais daudzums epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas.

Statistiski būtisku atšķirību starp p16^{INK4a} ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā zemas un augstas stadijas audzēju gadījumā nekonstatē (attiecināmi $p=0,77$; $p=0,22$; $p=0,21$).

Pētot p16^{INK4a} ekspresiju saistībā ar nefroblastomas malignitātes pakāpi redzams, ka vienīgajā zemas malignitātes audzēja gadījumā pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 83,33%, bet epiteliālajā daļā 96,36%. Stromālajā daļā reakcijas intensitāte netika raksturota, jo audzējs sastāvēja galvenokārt no liela izmēra cistām. Vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā atkarībā no audzēju malignitātes pakāpes redzams tabulā 3.18 un 3.37.att.

3.18. tabula

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes

Malignitātes pakāpe	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
zema	83,33	—	—	—	—	—
vidēja	81,31	21,17	35,86	100,00	68,51	94,11
augsta	84,30	11,50	70,00	97,00	65,98	102,61

„—” lielums nav noteikts

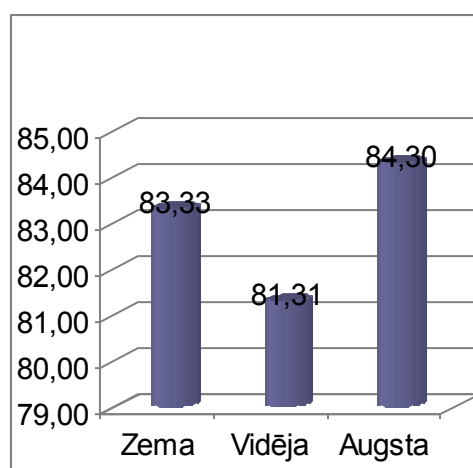
Vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu skaits stromālajā komponentā atkarībā no audzēju malignitātes pakāpes redzams tabulā 3.19.

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) stromālajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes

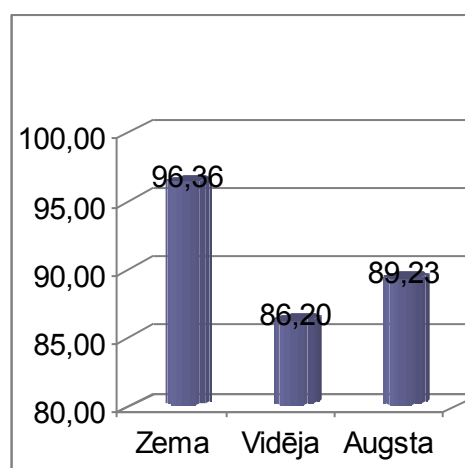
Malignitātes pakāpe	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
zema	—	—	—	—	—	—
vidēja	82,38	22,82	25,00	100,00	71,95	92,81
augsta	77,51	19,73	57,81	97,27	28,50	126,52

„—” lielums nav noteikts

Epiteliālajā komponentā, vidējas malignitātes audzēju grupā vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu skaits bija 86,2% (diapazons 0,00%-100,00%, SD 25,94%, CI 95% ar apakšējo robežu 73,3, augšējo 99,1). Visi 4 augstas malignitātes pakāpes audzēji piederēja pie blastematozā tipa. Epiteliālais komponents bija saglabāts tikai vienā gadījumā, p16^{INK4a} pozitīvo šūnu skaits tajā bija 89,23%. (sk. 3.38.att.).



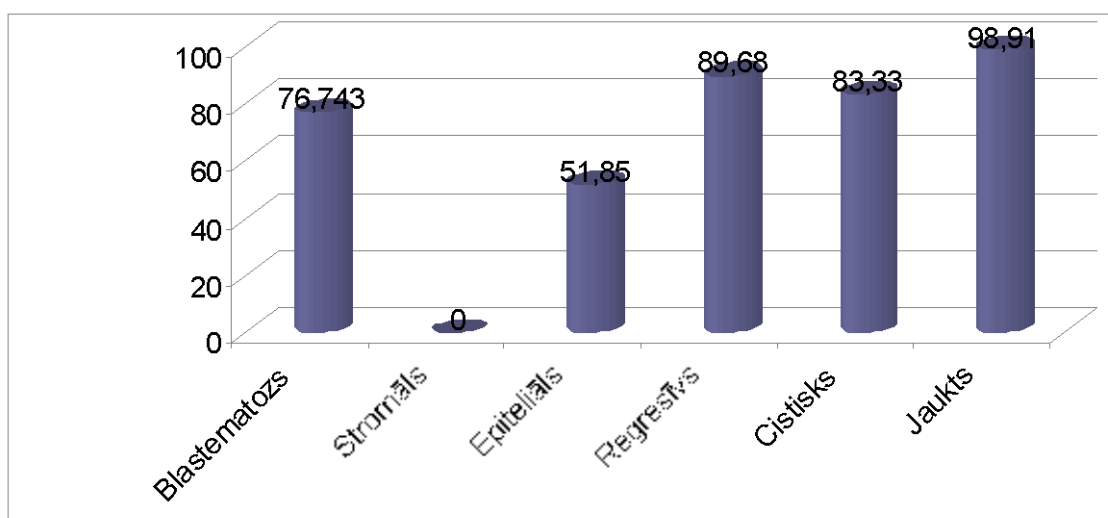
3.37.att. P16^{INK4a} pozitīvo šūnu vidējais daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes.



3.38.att. P16^{INK4a} pozitīvo šūnu vidējais daudzums (%) epitheliālajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes.

Izmantojot Manna-Vitneja testu, statistiski būtiska atšķirība starp p16^{INK4a} ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epitheliālajā komponentā zemas un vidējas malignitātes audzēju grupā salīdzinot ar augstas malignitātes audzēju grupu netika konstatēta (attiecīgi p=0,75; p=0,46; p=0,42)

P16^{INK4a} ekspresivitāte blastematozajā komponentā atkarībā no prevalējošā histoloģiskā tipa atspoguļota tabulā 3.20 un 3.39.att.



3.39.att. P16^{INK4a} pozitīvo šūnu vidējais daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa.

Jāpiezīmē, ka stromāla tipa audzējos blastematozais komponents bija niecīgs tāpēc imūnhistoķīmisko marķieru ekspresivitāte tajos netika noteikta, epiteliāla tipa audzējos izvērtējams blastematozais komponents atrasts tikai vienā gadījumā un p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums tajā bija 51,85%, cistiskas daļēji diferencētas nefroblastomas gadījumā p16^{INK4a} pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 83,33%.

3.20. tabula

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
blastematozs	76,74	19,19	35,86	97	63,00	90,47
stromāls	—	—	—	—	—	—
epiteliāls	51,85	—	—	—	—	—
regresīvs	89,68	6,19	85,3	94,06	34,02	145,33
jaukts	98,91	1,39	97,07	100,00	96,68	101,13
cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	83,33	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

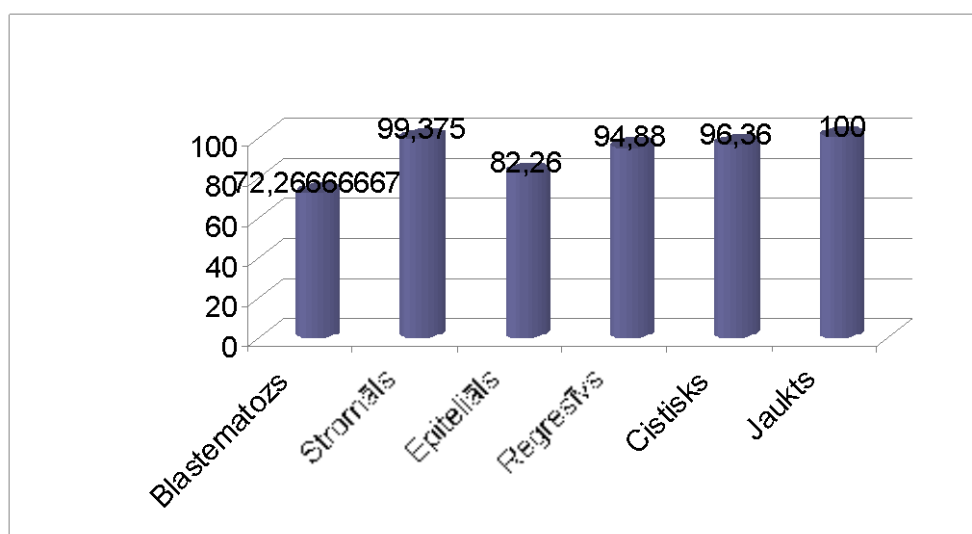
P16^{INK4a} pozitīvo šūnu vidējais daudzums stromālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa redzams tabulā 3.21.

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) stromālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Blastematozs	68,32	24,25	25,00	97,27	49,68	86,97
Stromāls	99,60	0,56	99,20	100,00	94,51	104,68
Epiteliāls	76,74	23,58	41,66	91,93	39,20	114,28
Regresīvs	94,22	3,52	88,99	96,57	88,60	99,80
Jaukts	95,56	6,25	86,30	100,00	85,61	105,50
Cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	—	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu vidējais daudzums epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa redzams atspoguļots tabulā 3.22 un 3.40.att.



3.40.att. P16^{INK4a} pozitīvo šūnu vidējais daudzums (%) epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa.

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Blastematozs	72,26	36,77	0,00	96,60	33,66	110,86
Stromāls	99,37	0,88	98,75	100,00	91,43	107,31
Epiteliāls	82,26	26,59	42,66	100,00	39,93	124,58
Regresīvs	94,88	6,37	85,59	100,00	84,73	105,02
Jaukts	100,00	—	100,00	100,00	—	—
Cistiska daļējo diferencēta nefroblastoma	96,36	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

Izmantojot Manna-Vitneja testu konstatēta statistiski būtiska pazemināta p16^{INK4a} ekspresija blastematoza tipa audzēju stromālajā un epiteliālajā komponentā, salīdzinot ar pārējiem histoloģiskajiem tiem (p=0,007; p=0,03), bet reakcijas intensitāte neatšķirās blastematozajā komponentē (p=0,075). Salīdzinot reakcijas intensitāti stromāla un citu histoloģisko tipu audzēju gadījumā atrasta statistiski būtiski paaugstināta p16^{INK4a} ekspresija stromālajā komponentā, bet netika konstatētas būtiskas atšķirības attiecībā uz epiteliālo komponenti (p=0,03; p=0,18). P16^{INK4a} ekspresija epiteliāla tipa veidojumu blastematozajā, stromālajā komponentā un epiteliālajā komponentā nebija būtiski atšķirīga no reakcijas intensitātes citu audzēju gadījumā (p=0,14; p=0,33; p=0,47). Regresīva tipa audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā reakcijas intensitāte nebija būtiski atšķirīga no p16^{INK4a} ekspresijas citu histoloģisko tipu gadījumā (p=0,77; p=0,33; p=0,81). Salīdzinot jaukta tipa audzējus ar pārējiem veidojumiem atrod būtiski paaugstinātu p16^{INK4a} ekspresiju blastematozajā un epiteliālajā komponentā (p=0,003; p=0,024), bet netika konstatētas atšķirības attiecībā uz stromālo komponentu (p=0,057).

Vidējais p16^{INK4a} pozitīvais šūnu skaits histoloģiskajos komponentos audzējiem, kuriem pirms operācijas veikta ķīmijterapija redzams. tabulā 3.23.

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) histoloģiskajos komponentos audzējiem pēc izdarītas ķīmijterapijas

Histoloģiskais komponents	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
blastematozs	87,12	9,21	70,00	97,07	79,41	94,82
stromāls	89,64	11,89	57,81	100,00	82,08	97,20
epiteliāls	96,04	4,89	85,59	100,00	92,75	99,33

Vidējais p16^{INK4a} pozitīvais šūnu skaits histoloģiskajos komponentos ķīmijterapijas neietekmētā materiālā atspoguļots tabulā 3.24. Statistiski būtisku atšķirību starp p16^{INK4a} ekspresiju abu grupu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā neatrod (p=0,85; p=0,18; p=0,15).

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) histoloģiskajos komponentos ķīmijterapijas neietekmētā audzēja materiālā

Histoloģiskais komponents	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
blastematozs	78,06	23,12	35,86	100,00	61,45	94,67
stromāls	73,14	26,74	25,00	100,00	55,17	91,11
epiteliāls	75,64	34,00	0,00	100,00	49,50	101,77

Pirms operācijas ķīmijterapiju saņēmušo audzēju grupa analizēta atsevišķi (sk. tabulu 3.25). Ja audzēja reakcija uz ķīmijterapiju bija laba, tad vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 89,39% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 77,64, augšējo 101,13), stromālajā komponentā M=90,65% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 80,68, augšējo 100,63), bet epiteliālajā komponentā M=95,01% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 90,54, augšējo 99,48). Ja konstatēta slikta veidojuma reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ārstēšanu blastematozajā komponentā M=84,85% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 66,72, augšējo 102,97), stromālajā komponentā M=86,6% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 63,49, augšējo 109,71), bet epiteliālajā daļā M=98,78% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 93,56, augšējo 104). Statistiski būtisku atšķirību starp p16^{INK4a} ekspresiju abu grupu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē (p=0,77; p=0,22; p=0,21).

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) audzēja histoloģiskajos komponentos atkarībā no audzēja reakcijas uz ķīmijterapiju

Histoloģiskais komponents	M		SD		Min		Max	
	+	—	+	—	+	—	+	—
blastematozs	89,39	84,85	7,38	11,39	81,20	70,00	97,00	97,07
stromāls	90,65	86,60	12,97	9,30	57,81	77,46	100,00	96,06
epiteliāls	95,01	98,78	5,34	2,10	85,59	96,36	100,00	100,00

„+” audzēja reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ķīmijterapiju vērtējama kā laba

„—” audzēja reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ķīmijterapiju vērtējama kā slikta

Mirušo pacientu grupā vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 77,1% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 228,24), stromālajā komponentā 57,71% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 308,59). Vienā no letālajiem gadījumiem konstatēts blastematoza tipa audzējs, kurā praktiski nebija epiteliāla komponenta. Otrā gadījumā p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums epiteliālajā komponentā bija 70,58%. (sk. tabulu 3.26). Izdzīvojušo slimnieku grupā vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 82,71% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 72,53, augšējo 92,88), stromālajā komponentā 84,04% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 74,8, augšējo 93,27), bet epiteliālajā komponentā M=87,72% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 75,65, augšējo 99,78). Statistiski

nozīmīgu atšķirību starp p16^{INK4a} ekspresiju abu grupu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,48$; $p=0,81$; $p=0,18$).

3.26. tabula

P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) histoloģiskajos komponentos izdzīvojušo un mirušo pacientu grupās

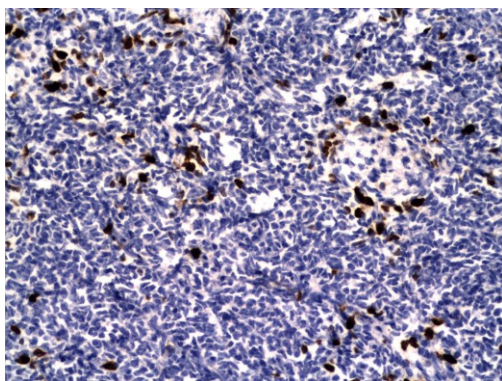
Histol. komponents	Miruso pacientu grupa				Izdzīvojušo pacientu grupa			
	M	SD	Min	Max	M	SD	Min	Max
blastematozs	77,10	16,80	65,21	89,00	82,71	19,09	35,86	100,00
stromāls	57,71	27,92	37,97	77,46	84,04	20,28	25,00	100,00
epiteliāls	70,58	—	—	—	87,72	25,02	0,00	100,00

„—” lielums nav noteikts

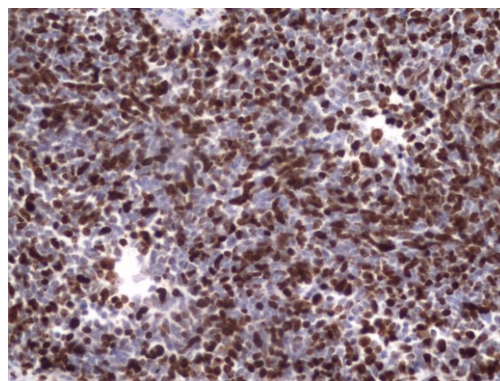
Kā jau iepriekš aprakstīts, (sk. nodaļu 3.2.2), nefroblastomu grupā, kurām uz izdarītās operatīvās un ķīmijterapijas fona, konstatēta progresējoša ļaundabīgā procesa gaita, divos gadījumos no esošajiem trīs primārie audzēji piederēja pie epiteliālā tipa un izvērtējams blastematozs komponents tajos netika atrasts. Vienīgajā veidojumā, kurā atrasts blastematozais komponents p16^{INK4} pozitīvās šūnas veidoja 89% . Epiteliālajā komponentā vidējais pozitīvo šūnu skaits bija 96,31% (diapazons 92,63%-100,00% ; SD 5,21 ; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 49,49 , augšējo 143,13), bet stromālajā komponentā M=86,09% (diapazons 77,46 %-91,93%; SD 7,62 ; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 67,14 , augšējo 105,03). Tajos gadījumos, kad metastāžu vai recidīva attīstību uz izdarītās ārstēšanas fona nenovēro, blastematozajā komponentā M=81,68% (diapazons 35,86 %-100%; SD 18,97 ; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 71,92 , augšējo 91,43), stromālajā komponentā 81,1 % (diapazons 25 %-100%; SD 23,04; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 70,31, augšējo 91,88), epiteliālajā komponentā M=85,81 (diapazons 0,00%-100,00% ; SD 25,8 ; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 72,97, augšējo 98,64). Statistiski būtisku atšķirību starp p16^{INK4} ekspresiju abu grupu audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,92$; $p=0,58$; $p=0,65$).

3.2.4. Ar šūnas proliferāciju saistītā kodolu antigēna Ki67 ekspresija

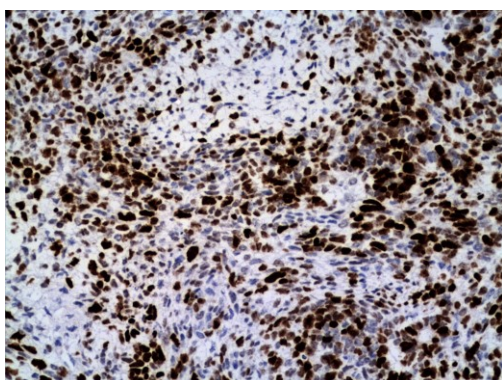
Primāro audzēju grupā vidējais ar Ki67 antigēna palīdzību noteiktais proliferācijas indekss blastematozajā komponentā bija 37,04% (diapazons 3,57%-78,57%; SD 16,82), stromālajā komponentā 13,67% (diapazons 1,12%-37,66%; SD 10,31), epiteliālajā komponentā 23,5% (diapazons 2,33%-38,55%; SD 12,55). Metastātisko audzēju/recidīva grupā blastematozajā komponentā proliferācijas indekss bija 34,78% (diapazons 9,7%-62,29%; SD 17,59), stromālajā komponentā 6,93% (diapazons 1,6%-17,52%; SD 5,8), epiteliālajā komponentā 12,14% (diapazons 5%-28,57%; SD 11,2). Šajā gadījumā jāatzīmē plašais reakcijas intensitātes diapazons, jo pat identiska tipa audzēju gadījumā PI bija atšķirīgs (sk. 3.41.att., 3.42.att., 3.43.att., 3.44.att.).



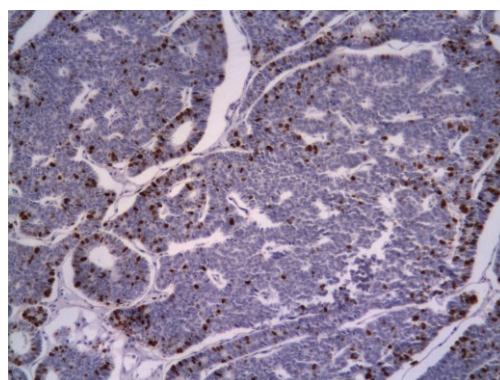
3.41.att. Zema Ki67 ekspresija blastematoza tipa augstas malignitātes nefroblastomas blastēmas šūnu kodolos, audzējs pēc pirms operācijas periodā izdarītas ķīmijterapijas, palielinājums x200.



3.42.att. Augsta Ki67 ekspresija blastematoza tipa vidējas malignitātes pakāpes nefroblastomas blastēmas šūnu kodolos primāras nefrektomijas gadījumā, palielinājums x200.



3.43.att. Augsta Ki67 ekspresija jaukta tipa vidējas malignitātes nefroblastomas blastēmas šūnu un epiteliālo struktūru kodolos, audzējs pēc ķīmijterapijas, palielinājums x200.



3.44.att. Zema Ki67 ekspresija epiteliāla tipa vidējas malignitātes pakāpes nefroblastomas epitēlija šūnu kodolos primāras nefrektomijas gadījumā, palielinājums x200.

Vidējais lielums metastāžu/recidīva grupā aprēķināts izmantojot visus šajā grupā ietilpstošos gadījumus, taču vienīgajā recidīva un audzēja anaplāzijas materiālā konstatētais Ki67 pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 62,29%, bet stromālajā 17,52% kas ir augstāks par vidējo šajā grupā. Epiteliālā komponenta materiālā praktiski nebija. Salīdzinot reakciju trijos pieejamos primārā audzēja un tā metastāzes vai recidīva audos iegūtais rezultāts redzams tabulā 3.27.

3.27. tabula

Proliferācijas indeksa lielums (%) primārā audzēja un tā atkārtotā procesa gadījumā

N.p.k.	Primārais audzējs			Atkārtotais audzējs		
	blastem. komp.	stromāls komp.	epit. komp.	blastem. komp.	stromāls komp.	epit. komp.
1.	—	2,36	13,84	45,00	5,30	28,57
2.	53,33	22,22	—	62,29	17,52	—
3.	—	6,38	26,66	1) — 2) 25,00	1) 5,41 2) —	1) 10,00 2) 5,00

„—” lielums nav noteikts

Izmantojot Manna – Vitneja testu PI salīdzināšanai kopējā primāro audzēju un metastāžu/recidīva grupā, statistiski būtiski paaugstinātu tā lielumu metastātisko audzēju blastematozajā, epiteliālajā un stromālajā komponentā salīdzinot ar primāro nefroblastomu gadījumiem nekonstatē (attiecīgi $p=0,931$; $p=0,75$; $p=0,89$).

Analizējot PI lielumu attiecībā uz audzēju stadijām, redzams, ka vienīgajā I stadijas audzēja gadījumā blastematozajā komponentā Ki67 ekspresija netika noteikta, stromālajā daļā proliferācijas indekss bija 16,6%, bet epiteliālajā 33,98%. Vienīgajā V stadijas audzēja materiālā blastematozajā komponentā proliferācijas indekss bija 34,8%, stromālajā komponentā 18,62% un epiteliālajā 10,38%. PI vidējais lielums blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas redzams tabulā 3.28 un 3.45.att.

3.28. tabula

Proliferācijas indeksa lielums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	—	—	—	—	—	—
II	39,32	16,00	21,66	78,57	28,57	50,07
III	27,09	18,58	3,57	44,73	0,00	56,66
IV	42,71	21,69	29,16	67,74	0,00	96,61
V	34,80	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

PI vidējais lielums stromālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas redzams tabulā 3. 29.

3.29. tabula

Proliferācijas indeksa lielums (%) stromālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	16,6	—	—	—	—	—
II	12,86	11,72	1,12	37,66	6,09	19,62
III	10,20	8,60	5,55	25,50	0,00	20,89
IV	20,67	7,51	12,06	25,86	2,01	39,34
V	18,62	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

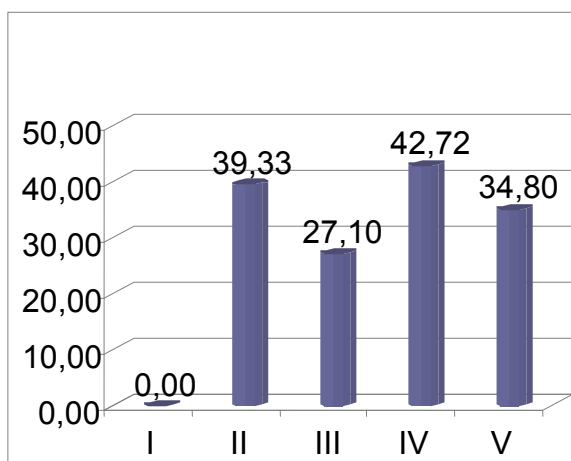
PI vidējais lielums epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas redzams tabulā 3.30 un 3.46.att.

3.30. tabula

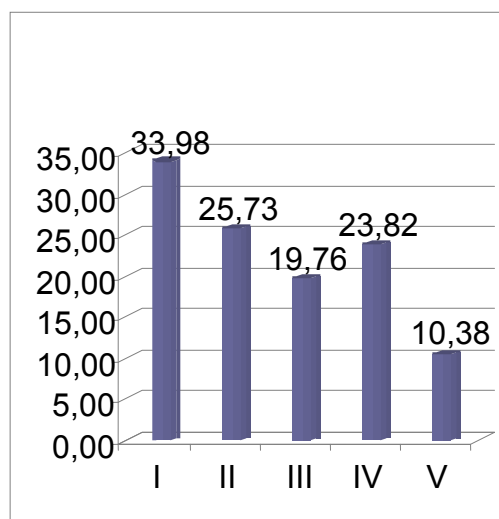
Proliferācijas indeksa lielums (%) epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	33,98	—	—	—	—	—
II	25,72	14,83	2,33	38,55	15,76	35,69
III	19,75	10,01	5,88	3,00	9,24	30,26
IV	23,82	5,40	20,00	27,64	0,00	72,35
V	10,38	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts



3.45.att. Vidējais PI lielums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas.



3.46.att. Vidējais PI lielums (%) epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas.

Salīdzinot PI lielumu zemas un augstas stadijas audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā statistiski būtisku atšķirību starp abām grupām nekonstatē ($p=0,56$; $p=0,38$; $p=0,13$).

Analizējot Ki67 ekspresiju atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes redzams, ka vienīgajā zemas malignitātes cistiskās daļēji diferencētās nefroblastomas gadījumā PI blastematozajā daļā bija 21,25%, bet epiteliālajā 13,63%. Stromālajā komponentā marķiera reaktivitāte netika noteikta. PI vidējais lielums blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes redzams tabulā 3.31 un 3.47.att.

3.31. tabula

Proliferācijas indeksa lielums (%) atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes

Malignitātes pakāpe	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
zema	21,25	—	—	—	—	—
vidēja	39,29	17,71	3,57	78,57	29,06	49,52
augsta	33,14	14,51	21,66	53,33	17,19	29,27

„—” lielums nav noteikts

PI vidējais lielums stromālajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes redzams tabulā 3.32.

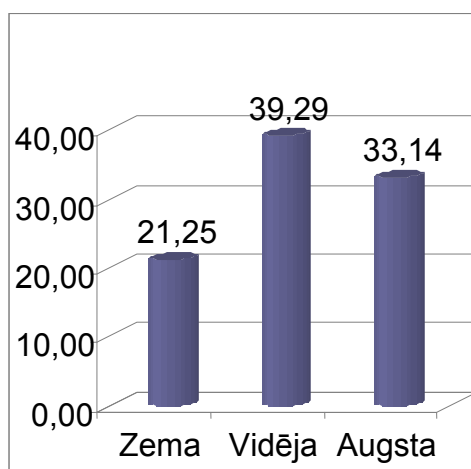
3.32. tabula

Proliferācijas indeksa lielums (%) stromālajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes

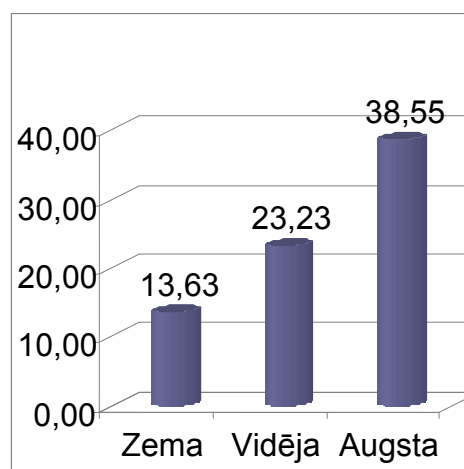
Malignitātes pakāpe	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
zema	—	—	—	—	—	—
vidēja	14,05	10,49	1,12	37,66	9,27	18,82
augsta	11,07	10,44	1,50	22,22	0,00	37,00

„—” lielums nav noteikts

Epiteliālajā komponentā vidējas malignitātes nefroblastomu grupā PI bija 23,23% (diapazons 2,33%-37,93%, SD 12,52; CI 95% ar apakšējo robežu 17,19, augšējo 29,27). Starp augstas malignitātes audzējiem epiteliālais komponents bija atrodams tikai vienā gadījumā un PI tajā bija 38,55% (sk. 3.48.att.). Statistiski būtiska atšķirība starp PI lielumu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā zemas un vidējas malignitātes audzēju grupā salīdzinot ar augstas malignitātes audzēju grupu netika konstatēta ($p=0,48$; $p=0,63$; $p=0,09$).



3.47.att. Vidējais PI (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes.



3.48.att. Vidējais PI (%) epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes.

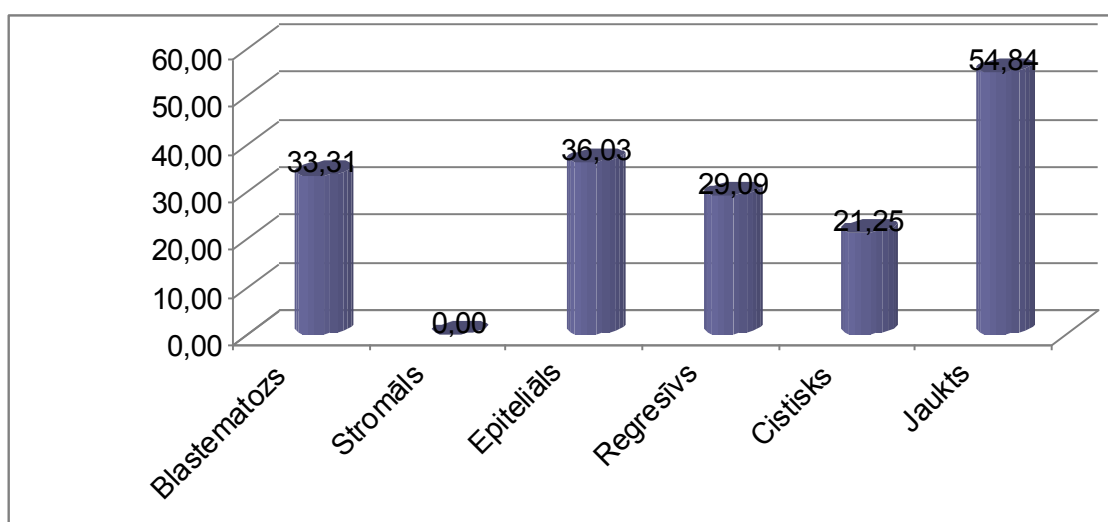
PI vidējais lielums blastematozajā komponentā atkarībā no prevalējošā histoloģiskā tipa atspoguļots tabulā 3.33 un atēlā. 3.49. Jāpiebilst, ka stromāla tipa audzējos blastematozais komponents bija niecīgs tāpēc imūnhistoķīmisko marķieru ekspresivitāte tajos netika noteikta, vienīgās cistiskas, daļēji diferencētas nefroblastomas gadījumā PI bija 21,25%.

3.33. tabula

Proliferācijas indeksa lielums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
blastematozs	33,30	13,95	3,57	53,33	23,32	43,29
stromāls	—	—	—	—	—	—
epiteliāls	36,02	6,75	31,25	40,80	0,00	96,69
regresīvs	29,08	1,85	27,77	30,40	12,37	45,79
jaukts	54,83	22,43	29,16	78,57	19,14	90,52
cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	21,25	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts



3.49.att.Vidējais PI (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa.

PI vidējais lielums stromālajā komponentā atkarībā no prevalējošā histoloģiskā tipa atspoguļots tabulā 3.34.

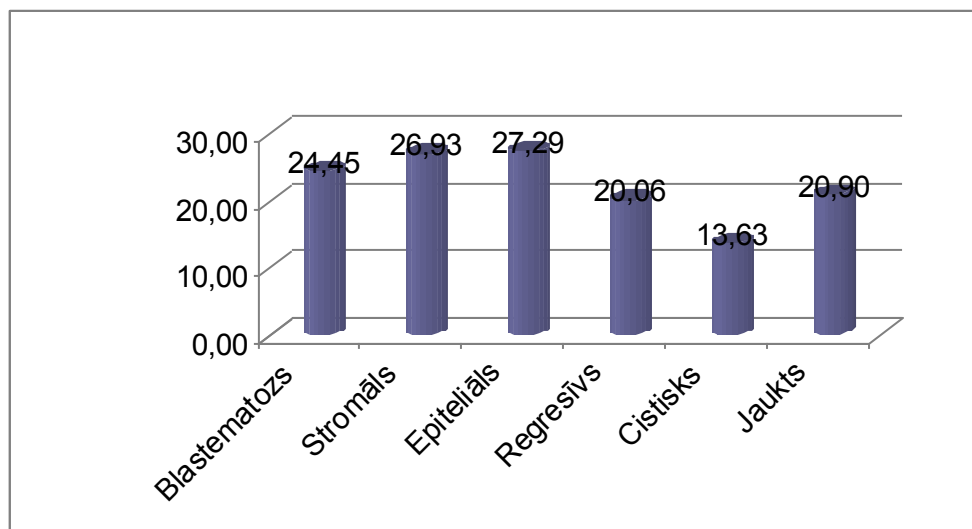
3.34. tabula

Proliferācijas indeksa lielums (%) stromālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
blastematozs	11,93	9,04	1,50	25,00	4,98	18,89
stromāls	16,50	12,02	8,00	25,00	0,00	124,5
epiteliāls	8,82	8,78	2,36	24,11	0,00	19,73
regresīvs	12,63	11,96	1,12	27,65	0,00	31,67
jaukts	23,30	11,12	12,06	37,66	5,60	41,00
cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	—	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

PI vidējais lielums epiteliālajā komponentā atkarībā no prevalējošā histoloģiskā tipa atspoguļots tabulā 3.35 un 3.50.att.



3.50.att.Vidējais PI (%) epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa.

3.35. tabula

Proliferācijas indeksa lielums (%) epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
blastematozs	24,45	13,85	5,88	38,55	9,91	38,98
stromāls	26,92	15,45	16,00	37,85	0,00	165,64
epiteliāls	27,28	8,39	13,84	35,90	16,86	37,7
regresīvs	20,06	18,48	2,33	37,93	0,00	49,47
jaukts	20,90	13,79	7,58	35,13	0,00	55,17
cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	13,63	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

Izmantojot Manna-Vitneja testu statistiski būtisku atšķirību starp PI lielumu blastematoza tipa audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā, salīdzinot ar pārējiem histoloģiskajiem tiem, nekonstatē (attiecīgi $p=0,74$; $p=0,57$; $p=0,75$). Tāpat netika atrasta statistiski būtiska atšķirība starp imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitāti stromāla tipa audzēju stromālajā un epiteliālajā komponentā salīdzinot ar pārējiem histoloģiskajiem variantiem ($p=0,53$; $p=0,54$). PI lielums epiteliāla tipa un citu veidojumu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nebija būtiski atšķirīgs ($p=0,79$; $p=0,27$; $p=0,62$). Regresīva tipa audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā reakcijas intensitāte nebija būtiski atšķirīga no Ki67 ekspresijas citu histoloģisko tipu gadījumā ($p=0,28$; $p=0,64$; $p=0,59$). Arī salīdzinot jaukta tipa audzējus ar pārējiem veidojumiem būtisku atšķirību starp Ki67 ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,072$; $p=0,053$; $p=0,68$).

PI vidējais lielums histoloģiskajos komponentos audzējiem, kuriem pirms operācijas veikta ķīmijterapija redzams tabulā 3.36.

3.36. tabula

Proliferācijas indeksa lielums (%) histoloģiskajos komponentos audzējiem pēc izdarītas ķīmijterapijas

Histoloģiskais komponents	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
blastematozs	36,81	18,74	21,25	78,57	22,4	51,22
stromāls	12,83	11,82	1,12	37,66	5,69	19,98
epiteliāls	22,52	14,00	2,33	38,55	13,62	31,41

Ķīmijterapijas neietekmētā materiālā vidējais PI vidējais lielums histoloģiskajos komponentos redzams tabulā 3.37.

3.37. tabula

Proliferācijas indeksa lielums (%) ķīmijterapijas neietekmētā audzēja materiālā

Histoloģiskais komponents	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
blastematozs	37,25	15,92	3,57	67,74	25,86	48,64
stromāls	14,67	8,63	2,00	25,86	8,87	20,47
epiteliāls	24,81	10,99	5,88	35,51	16,36	33,26

Statistiski būtisku atšķirību starp Ki67 ekspresiju abu grupu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,41$; $p=0,43$; $p=1$).

Ja audzēja reakcija uz ķīmijterapiju bija laba (sk. tabulu 3.38), tad vidējais PI lielums blastematozajā komponentā bija 30,92% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 22,07, augšējo 39,77), stromālajā komponentā $M=10,59\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 3,9, augšējo 17,27), bet epiteliālajā komponentā $M=27\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 16,83, augšējo 37,17). Ja konstatēta slikta veidojuma reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ārstēšanu blastematozajā komponentā $M=44,18\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,92, augšējo 87,43), stromālajā komponentā $M=20,33\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 65,89), bet epiteliālajā daļā $M=9,07\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 19,07).

3.38.tabula

Proliferācijas indeksa lielums(%) histoloģiskajos komponentos atkarībā no audzēja reakcijas uz ķīmijterapiju

Histoloģiskais komponents	M		SD		Min		Max	
	+	—	+	—	+	—	+	—
blastematozs	30,92	44,18	7,12	27,18	21,66	21,25	40,8	78,57
stromāls	10,59	20,33	9,35	18,34	1,50	1,12	27,65	37,66
epiteliāls	27,00	9,07	13,23	4,02	2,33	6,00	38,55	13,63

„+” audzēja reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ķīmijterapiju vērtējama kā laba

„—” audzēja reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ķīmijterapiju vērtējama kā slikta

Statistiski būtisku atšķirību starp PI lielumu abu grupu blastematozajā stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,8$; $p=0,61$; $p=0,52$).

Mirušo pacientu grupā vidējais PI lielums blastematozajā komponentā $M=46,66\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 131,35), stromālajā komponentā 19,6% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 52,89). Vienā no letālajiem gadījumiem konstatēts blastematoza tipa audzējs, kurā praktiski nebija epiteliāla komponenta. Otrā gadījumā PI lielums epiteliālajā komponentā bija 35,51%. (sk. tabulu 3.39). Izdzīvojušo slimnieku grupā vidējais PI lielums blastematozajā komponentā $M=35,91\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 27,01, augšējo 44,82), stromālajā komponentā 13,14 % (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 8,44, augšējo 17,83), bet epiteliālajā komponentā $M=22,9\%$ (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 17,02, augšējo 28,78). Statistiski būtisku atšķirību starp PI lielumu abu grupu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,18$; $p=0,4$, $p=0,32$).

3.39. tabula

Proliferācijas indeksa lielums (%) histoloģiskajos komponentos izdzīvojušo un mirušo pacientu grupās

Histol. Komp.	Mirušo pacientu grupa				Izdzīvojušo pacientu grupa			
	M	SD	Min	Max	M	SD	Min	Max
blastem.	46,66	9,42	40,00	53,33	35,91	17,31	3,57	78,57
stromāls	19,6	3,70	16,98	22,22	13,14	10,58	1,12	37,66
epiteliāls	35,51	—	—	—	22,90	12,56	2,33	38,55

„—” lielums nav noteikts

Vienīgajā progresējošā audzēja gadījumā, kurā atrasts blastematozais komponents PI tajā bija 53,33%, savukārt epiteliālajā komponentā audzēja progresijas gadījumā vidējais PI bija 20,25% (diapazons 13,84%-26,66% ; SD 9,06 ;CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 101,69), stromālajā komponentā $M=10,32\%$ (diapazons 2,36 %-22,22%; SD 10,49 ;CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 36,4). Tajos gadījumos, kad metastāžu vai recidīva attīstību uz izdarītās ārstēšanas fona nenovēro, blastematozajā komponentā vidējais PI 36,14% (diapazons 3,57 %-78,57%; SD 18,97 ;CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 27,77, augšējo 44,51), stromālajā komponentā $M=14,15\%$ (diapazons 1,12%-37,66%; SD 10,45; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 9,4, augšējo 18,91), epiteliālajā komponentā $M=23,84\%$ (diapazons 2,33%-38,55% ; SD 13 ; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 17,57, augšējo 30,11). Statistiski būtisku atšķirību starp PI lielumu abu grupu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,57$; $p=0,63$; $p=0,63$).

3.2.5. P53 proteīna ekspresija

Primāro audzēju grupā vidējais p53 pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 9,71% (diapazons 0,00%-37,37%; SD 11,44), stromālajā komponentā 1,74% (diapazons 0,00%-12,77 %; SD 2,73), epiteliālajā komponentā 6,35% (diapazons

0% - 25,38%; SD 9,03). Metastātisko audzēju/recidīva grupā blastematozajā komponentā M=27,58% (diapazons 1,92%-88,46%; SD 29,03), stromālajā komponentā 3,84% (diapazons no 0%-17,05%; SD 5,95), epiteliālajā komponentā 9,1% (diapazons no 3.03%-20,89%; SD 8,25). Vidējais lielums metastāžu/recidīva grupā aprēķināts izmantojot visus šajā grupā ietilpstošos gadījumus, vienīgajā recidīva un audzēja anaplāzijas materiālā konstatētais p53 pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 37,64%, bet stromālajā 17,05%. (sk. 3.51.att.) Epiteliālā komponenta recidīva materiālā praktiski nebija. Kopumā augstākais p53 pozitīvo šūnu skaits 88,46% atrasts plaušu metastāzes blastematozā komponenta šūnās (sk. 3.52.att.).

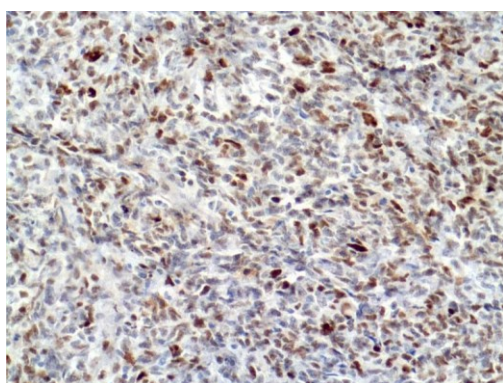
Salīdzinot reakciju trijos pieejamos primārā audzēja un tā metastāzes vai recidīva audos iegūtais rezultāts redzams tabulā 3.40.

3.40. tabula

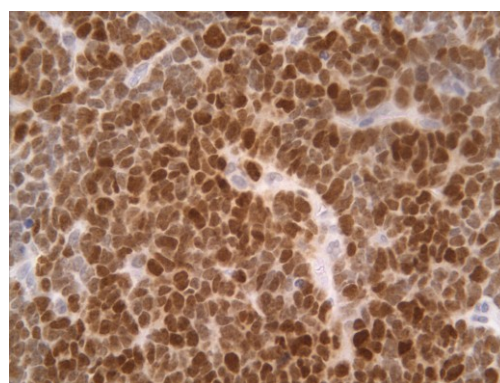
P53 pozitīvo šūnu skaits (%) primārā audzēja un tā atkārtotā procesa gadījumā

N.p.k.	Primārais audzējs			Atkārtotais audzējs		
	blastem. komp.	stromāls komp.	epit. komp.	blastem. komp.	stromāls komp.	epit. komp.
1.	—	1,57	25,38	88,46	2,75	20,89
2.	15,26	2,85	—	37,64	17,05	—
3.	—	20,00	0,00	1) — 2) 19,23	1) 3,77 2) —	1) 2,75 2) 3,03

„—” lielums nav noteikts



3.51.att. P53 ekspresija anaplastiskas histoloģijas blastematoza tipa audzēja recidīva gadījumā, palielinājums x200.



3.52.att. P53 ekspresija plaušu metastāzes blastematozā komponenta šūnās, palielinājums x400.

Izmantojot Manna-Vitneja testu p53 ekspresijas salīdzināšanai kopējā primāro audzēju un metastāžu/recidīva grupā, statistiski būtiski paaugstinātu reakcijas intensitāti metastātisko audzēju, epiteliālajā un stromālajā komponentā salīdzinot ar p53 ekspresiju minētajos histoloģiskajos komponentos primāro nefroblastomu gadījumā nekonstatē ($p=0,179$; $p=0,269$). Blastematozajā komponentā savukārt atrasta statistiski būtiski paaugstināta reakcijas intensitāte metastāžu/recidīva grupā salīdzinot ar primārajiem audzējiem ($p=0,03$).

Pētot p53 ekspresiju atkarībā no veidojuma stadijām, redzams, ka vienīgajā I stadijas audzēja gadījumā, tas pieder pie regresīva tipa veidojumu grupas un blastematozā komponenta tajā praktiski nav. Stromālajā komponentā noteiktais p53

pozitīvo šūnu skaits ir 2,08%%, bet epiteliālajā komponentā 2,27%, Analizētajā grupā vienīgajā V stadijas audzēja gadījumā p53 pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā bija 8,4%, stromālajā 1,17%, epiteliālajā komponentā 0%. P53 pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas redzams tabulā 3.41 un 3.53.att.

3.41. tabula

P53 pozitīvo šūnu daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	—	—	—	—	—	—
II	9,46	11,52	0,86	37,37	1,71	17,2
III	2,05	2,16	0,00	4,73	0,00	5,49
IV	21,33	13,67	11,97	37,03	0,00	55,31
V	8,40	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

P53 pozitīvo šūnu daudzums stromālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas redzams tabulā 3.42.

3.42. tabula

P53 pozitīvo šūnu daudzums (%) stromālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	2.08	—	—	—	—	—
II	1,15	1,44	0,00	5,00	0,32	1,98
III	3,08	5,53	0,00	12,77	0,00	9,95
IV	2,36	1,80	1,23	4,44	0,00	6,83
V	1,17	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

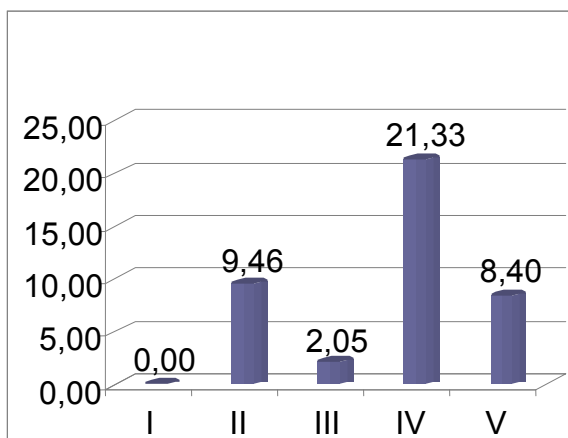
P53 pozitīvo šūnu daudzums epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas redzams tabulā 3.43 un 3.54.att.

3.43. tabula

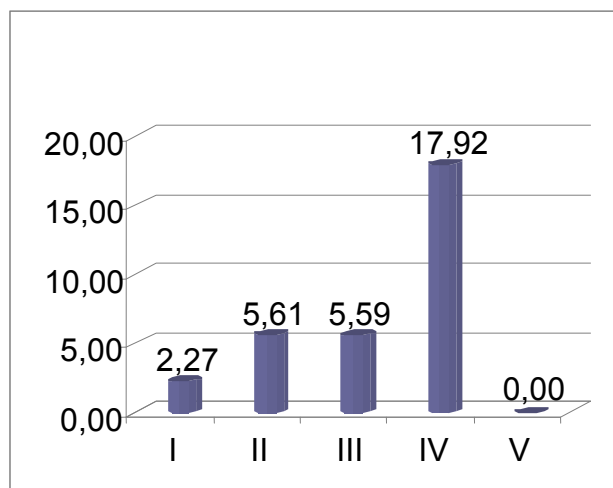
P53 pozitīvo šūnu daudzums(%) epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	2,27	—	—	—	—	—
II	5,61	9,46	0,00	25,38	0,00	11,96
III	5,58	8,30	0,00	20,00	0,00	14,3
IV	17,91	7,65	12,50	23,33	0,00	86,71
V	0,00	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts



3.53.att. Vidējais p53 pozitīvo šūnu daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas.



3.54.att. Vidējais p53 pozitīvo šūnu daudzums (%) epitheliālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas.

Salīdzinot p53 ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epitheliālajā komponentā zemas un augstas stadijas audzēju grupā statistiski būtisku atšķirību abās grupās nenovēro ($p=0,93$; $p=0,58$; $p=0,97$).

Saistībā ar nefroblastomas malignitātes pakāpi redzams, ka vienīgajā zemas malignitātes audzēja gadījumā pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 0,62%, bet epitheliālajā daļā 1,84%. P53 pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes redzams tabulā 3.44 un 3.55.att.

3.44. tabula

P53 pozitīvo šūnu daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes

Malignitātes pakāpe	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					Apakšējā robeža	Augšējā robeža
zema	0,62	—	—	—	—	—
vidēja	8,59	10,41	0,00	37,03	2,58	14,61
augsta	15,91	15,22	2,46	37,37	0,00	40,14

„—” lielums nav noteikts

P53 pozitīvo šūnu daudzums stromālajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas redzams tabulā 3.45.

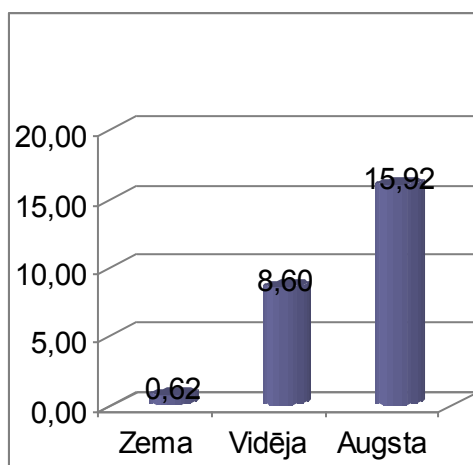
3.45. tabula

P53 pozitīvo šūnu skaits (%) stromālajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes

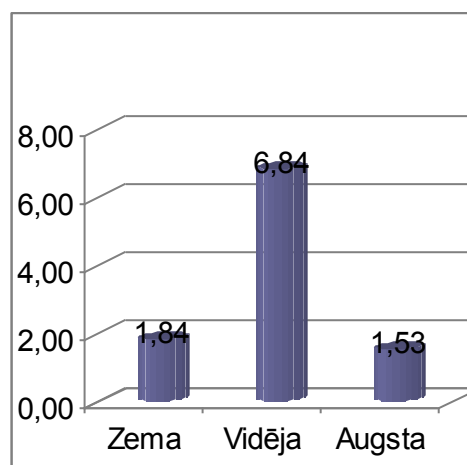
Malignitātes pakāpe	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
zema	—	—	—	—	—	—
vidēja	1,78	2,90	0,00	12,77	0,46	3,10
augsta	1,48	1,23	0,45	2,85	0,00	4,54

„—” lielums nav noteikts

Epiteliālajā komponentā vidējas malignitātes nefroblastomu grupā vidējais p53 pozitīvo šūnu skaits bija 6,84% (diapazons 0,00%-25,38%, SD 9,38; CI 95% ar apakšējo robežu 2,31, augšējo 11,36). Starp augstas malignitātes audzējiem epiteliālais komponents bija atrodams tikai vienā gadījumā un p53 pozitīvo šūnu skaits tajā bija 1,53% (sk. 3.56.att.). Statistiski būtisku atšķirību starp p53 ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā zemas un vidējas malignitātes audzēju grupā salīdzinot ar augstas malignitātes grupu nekonstatē ($p=0,16$; $p=0,68$; $p=1$).



3.55.att. Vidējais p53 pozitīvo šūnu skaits (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes.



3.56.att. Vidējais p53 pozitīvo šūnu skaits (%) epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes.

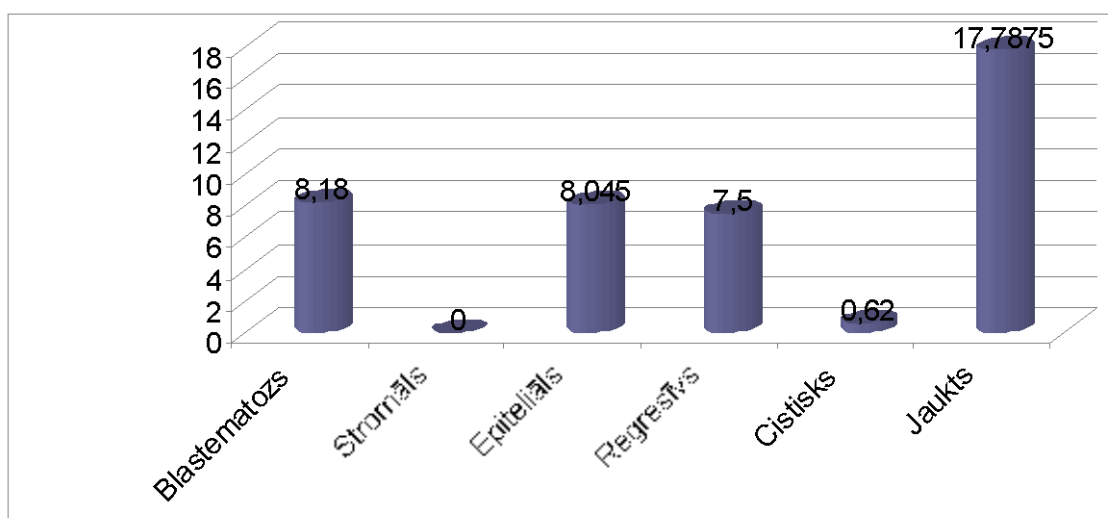
P53 pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa redzams tabulā 3.46 un 3.57.att. Arī šajā gadījumā stromāla tipa audzējos blastematozais komponents bija niecīgs un imūnhistoķīmisko marķieru ekspresivitāte tajos netika noteikta. Epiteliāla tipa audzējos izvērtējams blastematozais komponents atrasts tikai vienā gadījumā un p53 pozitīvo šūnu daudzums tajā bija 8,04%, bet cistiskas daļēji diferencētas nefroblastomas gadījumā 0,62%.

3.46. tabula

P53 pozitīvo šūnu daudzums (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					Apakšējā robeža	Augšējā robeža
blastematozs	8,18	11,27	0,00	37,37	0,11	16,24
stromāls	—	—	—	—	—	—
epiteliāls	8,04	—	—	—	—	—
regresīvs	7,50	7,07	2,50	12,50	0,00	71,03
jaukts	17,78	15,13	1,25	37,03	0,00	41,87
cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	0,62	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts



3.57.att.Vidējais p53 pozitīvo šūnu skaits (%) blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa.

P53 pozitīvo šūnu daudzums stromālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa redzams tabulā 3.47

3.47. tabula

P53 pozitīvo šūnu daudzums (%) stromālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
blastematozs	2,39	4,03	0,00	12,77	0,00	5,48
stromāls	0,83	1,17	0,00	1,66	0,00	11,37
epiteliāls	1,35	1,84	0,00	4,44	0,00	3,64
regresīvs	1,07	1,24	0,00	2,22	0,00	3,05
jaukts	1,91	2,15	0,00	5,00	0,00	5,33

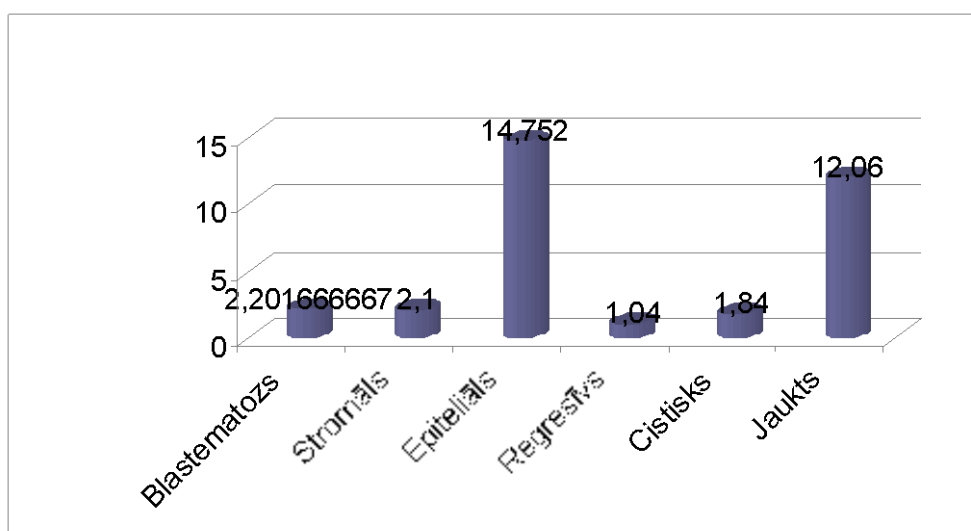
P53 pozitīvo šūnu daudzums epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa redzams tabulā 3.48 un 3.58.att.

3.48. tabula

P53 pozitīvo šūnu daudzums (%) epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
blastematozs	2,20	4,52	0,00	11,36	0,00	6,95
stromāls	2,10	2,96	0,00	4,20	0,00	28,78
epiteliāls	14,75	11,35	1,45	25,38	0,65	28,84
regresīvs	1,00	0,96	0,00	2,27	0,00	2,57
jaukts	12,06	11,84	0,00	23,68	0,00	41,48
cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	1,84	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts



3.58.att. Vidējais p53 pozitīvo šūnu skaits (%) epiteliālajā komponentā atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa.

Statistiski būtisku atšķirību starp p53 ekspresiju blastematoza tipa audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā, salīdzinot ar pārējiem histoloģiskajiem tiem, nekonstatē (attiecīgi $p=0,62$; $p=0,73$; $p=0,09$). Tāpat netika atrasta statistiski būtiska atšķirība starp imūnhistokīmiskās reakcijas intensitāti stromāla tipa audzēju stromālajā un epiteliālajā komponentā salīdzinot ar pārējiem histoloģiskajiem variantiem ($p=0,71$; $p=0,67$). P53 ekspresija epiteliāla tipa veidojumu blastematozajā un stromālajā komponentā nebija būtiski atšķirīga no reakcijas intensitātes citu audzēju gadījumā ($p=0,89$; $p=0,32$), bet bija būtiski paaugstināta epiteliālajā komponentā ($p=0,02$). Regresīva tipa audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā reakcijas intensitāte nebija būtiski atšķirīga no p53 ekspresijas citu histoloģisko tipu gadījumā ($p=0,79$; $p=0,75$; $p=0,34$). Līdzīgi, salīdzinot jaukta tipa audzējus ar pārējiem veidojumiem, būtisku atšķirību starp p53 ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,19$; $p=0,6$; $p=0,44$).

P53 pozitīvo šūnu daudzums histoloģiskajos komponentos audzējiem, kuriem pirms operācijas veikta ķīmijterapija redzams tabulā 3.49.

3.49. tabula

P53 pozitīvo šūnu daudzums (%) histoloģiskajos komponentos audzējiem pēc izdarītas ķīmijterapijas

Histoloģiskais komponents	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					Apakšējā robeža	Augšējā robeža
Blastematozs	11,25	12,09	0,62	37,37	1,95	20,54
Stromāls	1,36	1,45	0,00	5,00	0,48	2,24
Epiteliāls	6,85	9,88	0,00	25,38	0,57	13, 13

P53 pozitīvo šūnu daudzums histoloģiskajos komponentos ķīmijterapijas neietekmētā materiālā redzams tabulā 3.50. Statistiski būtisku atšķirību starp p53 ekspresiju abu grupu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,46$; $p=0,92$; $p=0,38$).

P53 pozitīvo šūnu skaits (%) ķīmijterapijas neietekmētā audzēja materiālā

Histoloģiskais komponents	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Blastematozs	8,33	11,29	0,00	37,03	0,25	16,42
Stromāls	2,19	3,76	0,00	12,77	0,00	4,72
Epiteliāls	5,67	8,30	0,00	23,33	0,00	12,06

Ja audzēja reakcija uz ķīmijterapiju bija laba (sk. tabulu 3.51), tad vidējais p53 pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā bija 11,18% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 30,22), stromālajā komponentā M=0,99% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,36, augšējo 1,61), bet epiteliālajā komponentā M=6,16%(CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 13,5). Ja konstatēta slikta veidojuma reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ārstēšanu blastematozajā komponentā M=11,33% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 25,25), stromālajā komponentā M=2,61 % (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 8,84), bet epiteliālajā daļā M=8,91 % (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 40,68). Statistiski būtisku atšķirību starp p53 ekspresiju abu grupu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,8$; $p=0,26$; $p=0,64$).

P53 pozitīvo šūnu skaits(%) histoloģiskajos komponentos atkarībā no audzēja reakcijas uz ķīmijterapiju

Histoloģiskais komponents	M		SD		Min		Max	
	+	—	+	—	+	—	+	—
Blastematozs	11,18	11,33	15,33	8,74	1,09	0,62	37,37	20,90
Stromāls	0,99	2,61	0,86	2,5	0,00	0,00	2,22	5,00
Epiteliāls	6,16	8,91	9,55	12,78	0,00	1,23	25,38	23,68

„+” audzēja reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ķīmijterapiju vērtējama kā laba

„—” audzēja reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ķīmijterapiju vērtējama kā slikta

Mirušo pacientu grupā vidējais p53 pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā M=8,2% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 96,96), stromālajā komponentā 1,66% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 16,78). Vienā no letālajiem gadījumiem konstatēts blastematoza tipa audzējs, kurā praktiski nebija epiteliāla komponenta. Otrā gadījumā p53 pozitīvas šūnas epiteliālajā komponentā nekonstatē (sk. tabulu 3.52). Izzīvojušo slimnieku grupā blastematozajā komponentā M=9,88% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 3,78, augšējo 15,99), stromālajā komponentā 1,75% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,49, augšējo 3,01), bet epiteliālajā komponentā M=6,66% (CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 2,23, augšējo 10,46). Statistiski būtisku atšķirību starp p53 ekspresiju abu grupu audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,79$; $p=0,52$, $p=0,21$).

P53 pozitīvo šūnu daudzums (%) histoloģiskajos komponentos izdzīvojušo un mirušo pacientu grupās

Histoloģiskais komponents	Miruso pacientu grupa				Izdzīvojušo pacientu grupa			
	M	SD	Min	Max	M	SD	Min	Max
Blastematozs	8,20	9,87	1,30	15,26	9,88	11,87	0,00	37,37
Stromāls	1,66	1,68	0,47	2,85	1,75	2,83	0,00	12,77
Epiteliāls	0,00	—	—	—	6,66	9,15	0,00	25,38

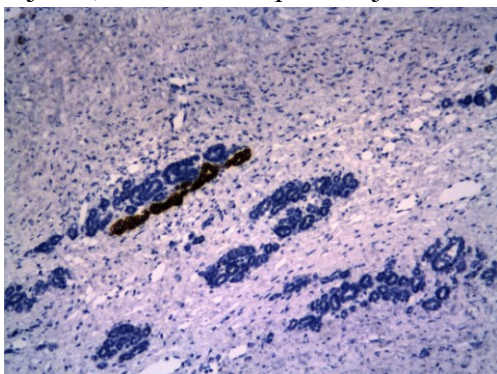
„—” lielums nav noteikts

Vienīgajā progresējošā audzēja gadījumā, kurā atrasts blastematozais komponents p53 pozitīvo šūnu skaits bija 15,26%, savukārt epiteliālajā komponentā audzēja progresijas gadījumā M=22,69% (diapazons 20,00%-25,38%; SD 3,8; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 56,86), stromālajā komponentā M=1,47% (diapazons 0,00%-2,85; SD 1,42; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 5,01). Tajos gadījumos, kad metastāžu vai recidīva attīstību uz izdarītās ārstēšanas fona nenovēro, blastematozajā komponentā M=9,41% (diapazons 0,00%-37,37%; SD 11,7; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 3,59, augšējo 15,22), stromālajā komponentā M=1,78% (diapazons 0,00%-12,77%; SD 2,89; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,46, augšējo 3,1), epiteliālajā komponentā M=4,63% (diapazons 0,00%-23,68%; SD 7,55; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,98, augšējo 8,27). Salīdzinot p53 ekspresiju abās grupās konstatēts, ka reakcijas intensitāte blastematozajā un stromālajā komponentā būtiski neatšķiras ($p=0,27$; $p=0,72$), bet ir būtiski paaugstināta epiteliālajā komponentā audzēja progresijas gadījumā ($p=0,039$).

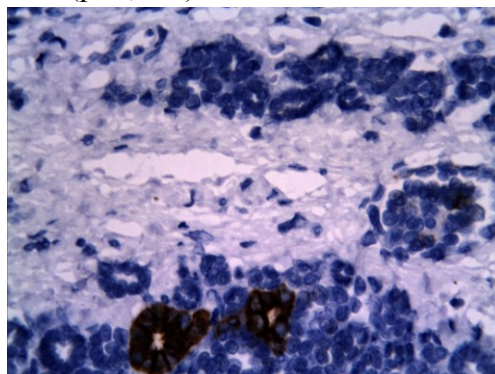
3.2.6. E-kadherīna ekspresija

Primāro audzēju grupā vidējais e-kadherīna pozitīvo struktūru skaits redzes laukā (palielinājums $\times 100$) bija 22,74 (diapazons 0-86; SD 23,21). Primārajos audzējos atrasta gan fokāla reakcijas pozitivitāte bez lūmena veidošanās, gan izteikta e-kadherīna ekspresija labi diferencētās tubulārās struktūrās (sk. 3.59.att., 3.60.att., 3.61.att.). Metastātisko audzēju/recidīva grupā M=9,88 (diapazons 0-40; SD 14,86). Metastāžu gadījumā pozitīva reakcija atrasta tikai tubulārajās struktūrās (sk. 3.62.att.). Vidējais lielums metastāžu/recidīva grupā aprēķināts izmantojot visus šajā grupā ietilpstošos gadījumus, vienīgajā recidīva un audzēja anaplāzijas materiālā netika konstatēta neviena pozitīva struktūra. Salīdzinot reakciju trijos pieejamos primārā audzēja un tā metastāzes vai recidīva audos redzams, ka vienā gadījumā primārajā audzējā nebija nevienas e-kadherīna pozitīvas struktūras, bet metastāzē savukārt konstatētas 29 pozitīvas struktūras. Otrajā gadījumā primārajā audzējā atrastas 13, pirmās metastāzes audos 12, bet otrās metastāzes audos 8 pozitīvas struktūras. Trešajā gadījumā pozitīvas struktūras nekonstatē ne primārā audzēja ne tā recidīva audos. Izmantojot Manna-Vitneja testu,

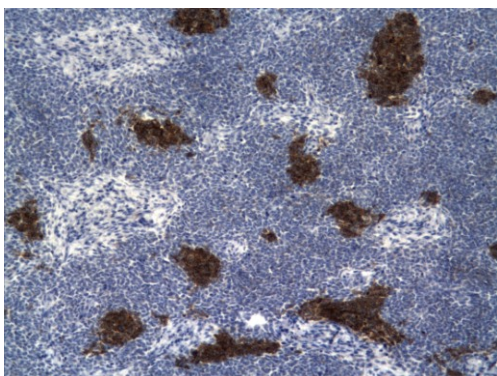
konstatē statistiski būtiski pazeminātu reakcijas intensitāti metastātiskā procesa gadījumā, salīdzinot ar primārajām nefroblastomām ($p=0,046$).



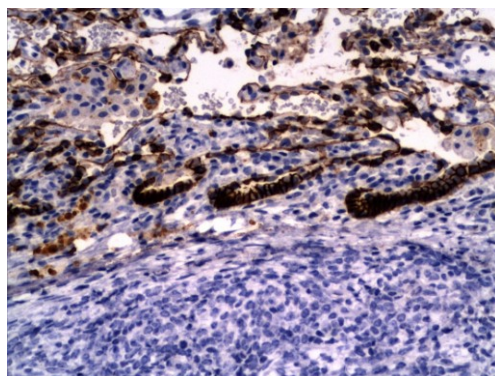
3.59.att. E-kadherīna ekspresija atsevišķās epiteliālā komponenta tubulārajās struktūrās regresīva tipa vidējas malignitātes audzējā pēc pirms operācijas periodā izdarītas ķīmijterapijas, palielinājums x100.



3.60.att. E-kadherīna ekspresija atsevišķās epiteliālā komponenta tubulārajās struktūrās regresīva tipa vidējas malignitātes audzējā pēc pirms operācijas periodā izdarītas ķīmijterapijas,, palielinājums x400.



3.61.att. Fokāla e-kadherīna ekspresija bez tubulāru struktūru veidošanās blastematozo tipa augstas malignitātes pakāpes audzējā pēc pirms operācijas periodā izdarītas ķīmijterapijas, palielinājums x100.



3.62.att. E-kadherīna ekspresija audzēja metastāzes tubulārajās struktūrās uz robežas ar plaušu audiem, palielinājums x200.

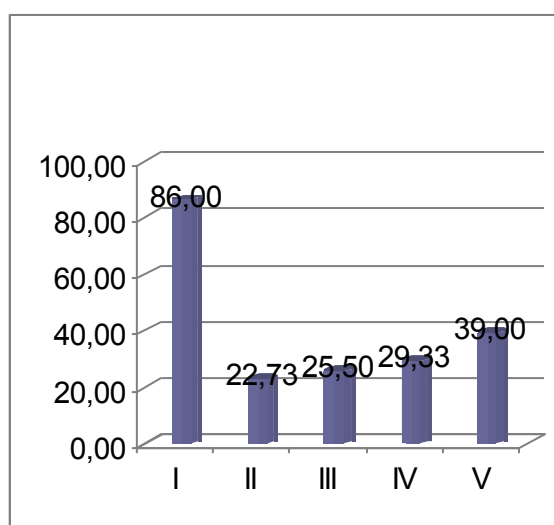
Analizējot e-kadherīna ekspresiju attiecībā uz audzēju stadijām, redzams, ka vienīgajā I stadijas audzējā konstatētas 86 , bet vienīgajā V stadijas audzēja materiālā 39 pozitīvas struktūras. Vidējais e-kadherīna pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja stadijas redzams tabulā 3.53 un 3.63.att.

3.53. tabula

E-kadherīna pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	86,00	—	—	—	—	—
II	22,73	25,69	0,00	73,00	8,51	36,96
III	25,50	14,63	9,00	40,00	10,15	40,85
IV	29,33	12,74	21,00	44,00	0,00	60,98
V	39,00	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

**3.63.att. Vidējais E-kadherīna pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja stadijas.**

Salīdzinot reakcijas intensitāti zemas un augstas stadijas audzēju grupā, statistiski būtisku atšķirību starp abām grupām nekonstatē ($p=0,36$).

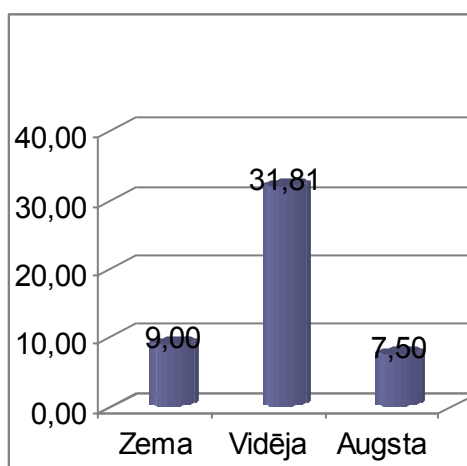
Vidējais e-kadherīna pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes redzams tabulā 3.54 un 3.64.att. Augstas malignitātes audzēju grupā e-kadherīna ekspresija bija būtiski pazemināta salīdzinot ar zemas un vidējas malignitātes audzēju grupu ($p=0,049$).

3.54. tabula

E-kadherīna pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes

Malignitātes pakāpe	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Zema	9,00	—	—	—	—	—
Vidēja	31,81	24,04	0,00	86,00	20,87	42,75
Augsta	7,50	15,00	0,00	30,00	0,00	31,37

„—” lielums nav noteikts



3. 64.att. Vidējais e-kadherīna pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes.

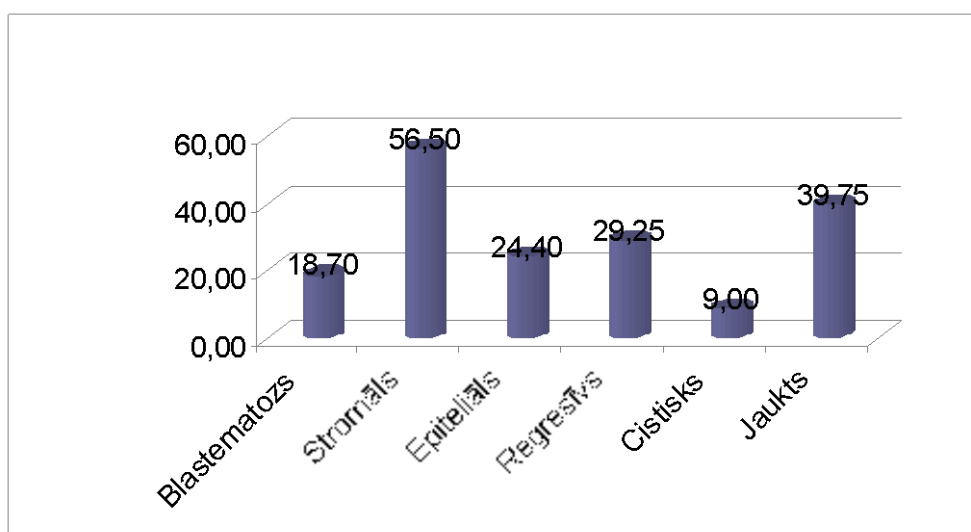
E-kadherīna pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa redzams tabulā 3.55. un 3.65.att.

3.55. tabula

E- kadherīna pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Blastematozs	18,70	17,56	0,00	40,00	6,14	31,26
Stromāls	56,50	23,33	40,00	73,00	0,00	266,15
Epiteliāls	24,40	24,88	0,00	66,00	0,00	55,29
Regresīvs	29,25	38,70	0,00	86,00	0,00	90,84
Jaukts	39,75	16,46	21,00	60,00	13,56	65,94

„—” lielums nav noteikts



3.65.att. Vidējais e-kadherīna pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa.

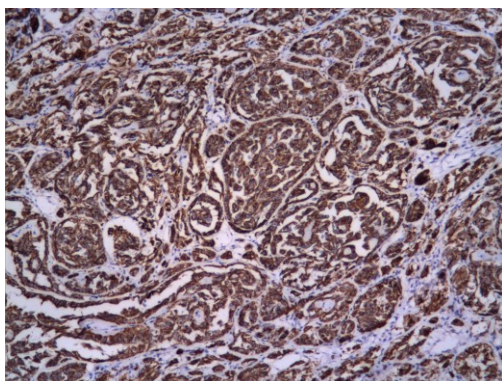
Salīdzinot e-kadherīna ekspresiju starp kopējo audzēju grupu un dažādiem histoloģiskajiem tipiem, konstatē, ka reakcijas intensitāte neviena histoloģiskā tipa gadījumā nav būtiski atšķirīga no reakcijas kopējā grupā ($p=0,24$; $p=0,74$; $p=0,14$; $p=0,86$; $p=0,53$).

Audzējiem, kuriem pirms operācijas veikta ķīmijterapija vidējais e-kadherīna pozitīvo struktūru skaits $M=24,13$ (diapazons 0-86; SD 28,36, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 8,43, augšējo 39,84), bet ķīmijterapijas neietekmētā materiālā $M=31,86$ (diapazons 0-66, SD 17,23, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 19,79, augšējo 42,94). Statistiski būtiska atšķirība starp e-kadherīna ekspresiju abās grupās nav konstatēta ($p=0,15$). Ja audzēja atbilde uz ķīmijterapiju klīniski traktēta kā laba $M=28,2$ (diapazons 0-86, SD 30,26, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 6,55, augšējo 49,85). Nepietiekošas audzēja regresijas gadījumā $M=16$ (diapazons 0-60; SD 25,11; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 47,18). Atšķirība starp abām grupām nav statistiski būtiska ($p=0,34$).

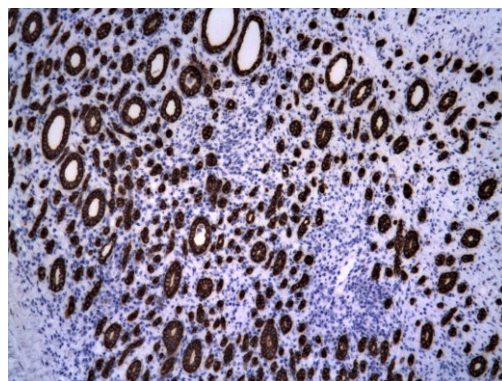
Mirušo pacientu grupā vidējais e-kadherīna pozitīvo struktūru skaits $M=13,5$ (diapazons 0-27, SD 19,09, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu -158,03, augšējo 185). Izdzīvojušo pacientu grupā $M=28,33$ (diapazons 0-86, SD 24,49, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 17,99, augšējo 38,67). Statistiski būtisku atšķirību starp reakcijas intensitāti izdzīvojušo un mirušo pacientu grupā neatrod ($p=0,46$). Gadījumos, ja konstatēta audzēja progresija, primārajos veidojumos noteiktais vidējais e-kadherīna pozitīvo struktūru skaits $M=4,33$ (diapazons 0-13, SD 7,5; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 22,97). Ja audzēja progresiju neatrod, tad $M=30,17$ (diapazons 0-86, SD 24; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 19,79, augšējo 40,55). Minētā ekspresijas atšķirība bija statistiski būtiska ($p=0,05$).

3.2.7. CK AE1/AE3 ekspresija

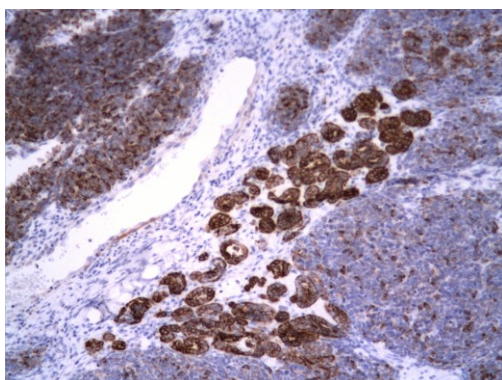
Primāro audzēju grupā vidējais CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits redzes laukā (palielinājums $\times 100$) bija 94,7 (diapazons 0-480; SD 128,61). Lielākais CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits konstatēts epiteliāla tipa glomerulāras diferenciācijas nefroblastomas gadījumā (sk. 3.66.att.) un regresīva tipa nefroblastomas gadījumā (sk. 3.67.att.). Blastematoza tipa audzējos atrod ne tikai atsevišķas epiteliālu struktūru grupas, bet arī perēkļainu difūzu pozitivitāti blastematozajā komponentā (sk. 3.68.att.), taču sastopams arī pilnībā negatīvs rezultāts (sk. 3.69.att.).



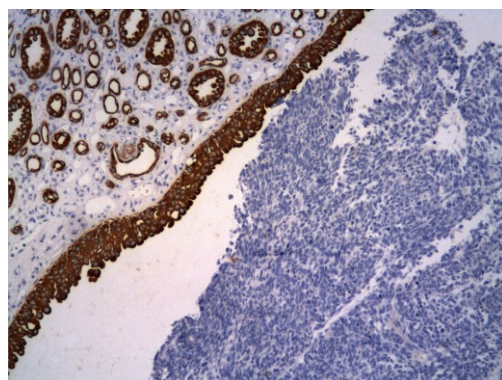
3.66.att. CKAE1/AE3 ekspresija primitīvās tubulārās un glomerulārās struktūrās epiteliāla tipa nefroblastomas gadījumā, palielinājums x200.



3.67.att. CKAE1/AE3 ekspresija tubulārās struktūrās regresīva tipa nefroblastomas gadījumā, palielinājums x100.



3.68.att. CKAE1/AE3 pozitīvu tubulāru struktūru grupa blastematoza tipa nefroblastomas gadījumā, redzama arī difūza perēklaina pozitivitāte blastematozajā komponentā, palielinājums x100.



3.69.att. Negatīva CKAE1/AE3 ekspresija blastematoza tipa nefroblastomas audos, pozitīva iekšējā kontrole nierēs kanāliņu un nierēs blodiņas epitēlija šūnās, palielinājums x100.

Metastātisko audzēju/recidīva grupā $M=9,88$ (diapazons 0-40; SD 14,86). Vidējais lielums metastāžu/recidīva grupā aprēķināts izmantojot visus šajā grupā ietilpstošos gadījumus, vienīgajā recidīva un audzēja anaplāzijas materiālā netika konstatēta neviena pozitīva struktūra. Salīdzinot reakciju trijos pieejamos primārā audzēja un tā metastāzes vai recidīva audos redzams, ka vienā gadījumā primārajā audzējā nebija nevienas CKAE1/AE3 pozitīvas struktūras, bet metastāzē atrastas 18 pozitīvas tubulāras struktūras. Otrajā gadījumā primārajā audzējā atrastas 480 primitīvas CKAE1/AE3 pozitīvas tubulāras un glomerulāras struktūras, pirmās metastāzes audos 7 tubulāras, bet otrās metastāzes audos 15 pozitīvas tubulāras struktūras. Trešajā gadījumā reakcijas pozitivitāti nekonstatē ne primārā audzēja ne tā recidīva audos. Izmantojot Manna-Vitneja testu atrod statistiski būtiski samazinātu imūnhistokīmiski pozitīvo epiteliālo struktūru skaitu atkārtotā procesa gadījumā salīdzinot ar primārajām nefroblastomām ($p=0,005$).

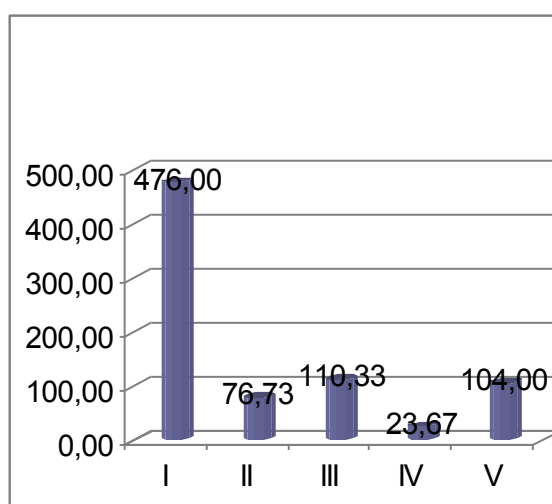
Apskatot CKAE1/AE3 ekspresiju attiecībā uz audzēju stadijām, redzams, ka vienīgajā I stadijas audzējā konstatētas 476 , bet vienīgajā V stadijas audzēja materiālā 104 pozitīvas struktūras. CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja stadijas redzams tabulā 3.56 un 3.70.att. Statistiski būtisku atšķirību starp pozitīvo struktūru skaitu zemas un augstas stadijas audzēju gadījumā nekonstatē ($p=0,36$).

3.56. tabula

CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	476,00	—	—	—	—	—
II	76,73	73,82	0,00	250,00	35,85	117,61
III	110,33	184	9,00	480,00	0,00	303,43
IV	23,66	23,02	0,00	46,00	0,00	80,87
V	104,00	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts



3.70.att. Vidējais CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja stadijas.

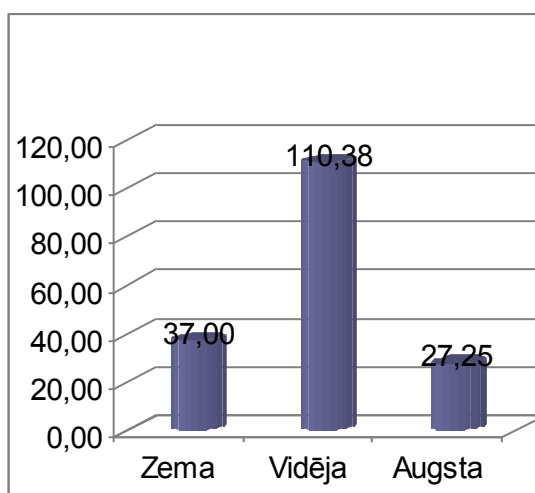
CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes redzams tabulā 3.57 un 3.71.att.

3.57. tabula

CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes

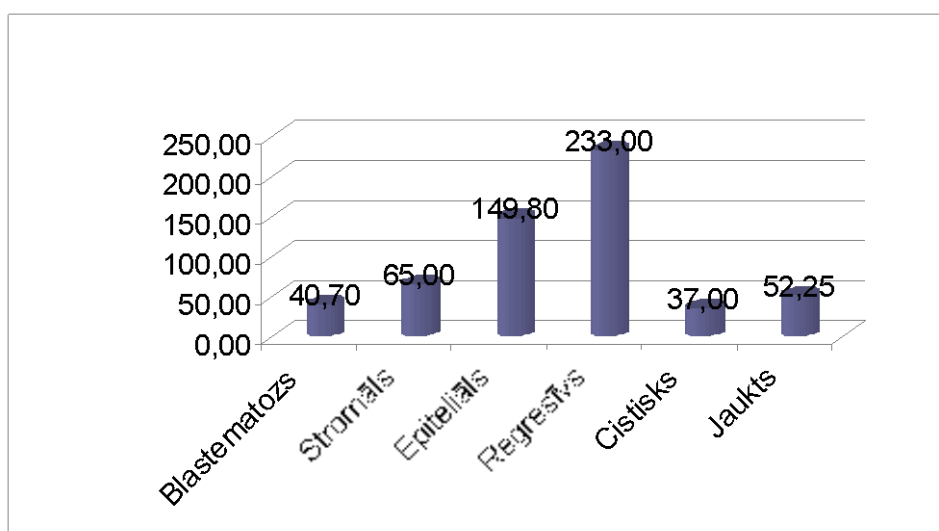
Malignitātes pakāpe	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Zema	37,00	—	—	—	—	—
Vidēja	110,38	138,5	0,00	480,00	47,33	173,42
Augsta	27,25	32,61	0,00	65,00	0,00	79,14

„—” lielums nav noteikts



3. 71.att. Vidējais CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes.

Statistiski būtisku atšķirību starp CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaitu zemas un vidējas malignitātes pakāpes audzēju grupā, salīdzinot ar augstas malignitātes audzēju grupu, neatrod ($p=0,11$). CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa redzams tabulā 3.58 un 3.72.att.



3.72.att. Vidējais CKAE1/AE3 pozitīvo strukt. skaits atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa.

CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Blastematozs	40,70	38,47	0,00	104,00	13,17	68,22
Stromāls	65,00	66,46	18,00	112,00	0,00	662,19
Epiteliāls	149,80	0,00	0,00	480,00	0,00	398,91
Regresīvs	233,00	177,57	76,00	476,00	0,00	515,55
Jaukts	52,25	50,33	0,00	114,00	0,00	132,34
Cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	37,00	—	—	—	—	—

Salīdzinot CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaitu starp kopējo audzēju grupu un dažādiem histoloģisko tipiem, konstatē, ka reakcijas intensitāte blastematozu, epiteliālu, stromālu un jauktu audzēju gadījumā nav būtiski atšķirīga no reakcijas kopējā grupā ($p=0,09$; $p=0,69$; $p=0,92$; $p=0,74$), bet ir būtiski paaugstināta regresīva tipa audzēju gadījumā ($p=0,015$).

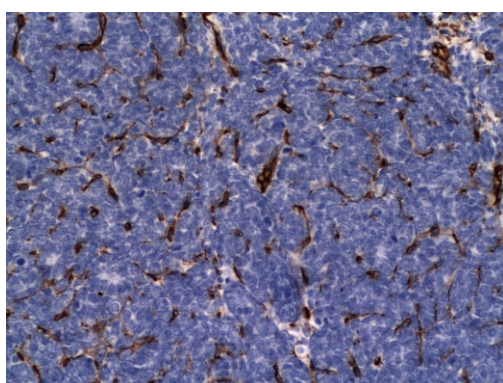
Audzējiem, kuriem pirms operācijas veikta ķīmijterapija vidējais CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits $M=121,73$ (diapazons 0-480 ; SD 158,97 , CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 33,69 , augšējo 209,77), bet ķīmijterapijas neietekmētā materiālā $M=58$ (diapazons 0-199, SD 58,27, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 18,84, augšējo 97,15), bet aprakstītā atšķirība nebija statistiski būtiska ($p=0,49$). Ja audzēja atbilde uz ķīmijterapiju klīniski traktēta kā laba $M=159,9$ (diapazons 0-480, SD 182,66, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 29,22 , augšējo 290,57). Nepietiekošas audzēja regresijas gadījumā $M=45,4$ (diapazons 0-114; SD 49,58 ; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00 , augšējo 106,96). Atšķirība starp abām aprakstītajām grupām nebija statistiski būtiska ($p=0,21$).

Mirušo pacientu grupā vidējais CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits $M=24$ (diapazons 0-48, SD 33,94, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00 augšējo 328,94). Izdzīvojušo pacientu grupā $M=100,66$ (diapazons 0-480, SD 132,13, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 44,87, augšējo 156,46). Statistiski būtiska atšķirība starp mirušo un izdzīvojušo pacientu grupām netika konstatēta ($p=0,31$). Gadījumos, ja konstatēta audzēja progresija, primārajos veidojumos noteiktais vidējais CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits $M=160$ (diapazons 0-480 SD 277,12; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00 , augšējo 848,42). Ja audzēja progresiju neatrod, tad $M=86,26$ (diapazons 0-476, SD 105,64; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 40,57, augšējo 131,94). Statistiski būtiska atšķirība starp reakcijas intensitāti abās grupās netika atrasta ($p=0,44$).

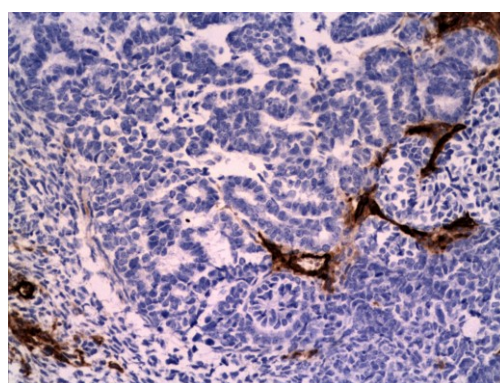
3.2.8. CD34 pozitīvo asinsvadu proliferācija

Primāro audzēju grupā vidējais CD34 pozitīvo mikroasinsvadu skaits redzes laukā (palielinājums $\times 100$) bija 123,46 (diapazons 25-374; SD 87,84). Metastātisko audzēju/recidīva grupā $M=116,44$ (diapazons 24-266; SD 98,3). Vidējais lielums metastāžu/recidīva grupā aprēķināts izmantojot visus šajā grupā ietilpstošos gadījumus,

vienīgajā recidīva un audzēja anaplāzijas materiālā atrasti 266 CD34 pozitīvi sīkie asinsvadi. Salīdzinot reakciju trijos pieejamos primārā audzēja un tā metastāzes vai recidīva audos redzams, ka vienā gadījumā primārajā audzējā bija 25, bet metastāzē atrastas 187 pozitīvas sīko asinsvadu struktūras. Otrajā gadījumā primārajā audzējā atrastas 220, pirmās metastāzes audos 37, bet otrās metastāzes audos 31 CD34 pozitīvas sīko asinsvadu struktūras. Trešajā gadījumā primārā audzēja audos atrod 56, bet recidīva 266 CD34 pozitīvas asinsvadu struktūras. Izmantojot Manna-Vitneja testu statistiski būtisku atšķirību starp mikroasinsvadu skaitu atkārtotā un primārā procesa gadījumā neatrod ($p=0,439$). Lielākais CD34 pozitīvo mikroasinsvadu skaits konstatēts blastematoza tipa vidējas malignitātes pakāpes nefroblastomas gadījumā (sk. 3.73.att.). Visos gadījumos atrod gan jau izveidotās asinsvadu struktūras ar lūmenu, gan CD34 pozitīvo šūnu struktūras bez lūmena veidošanās (sk. 3.74.att.).



3.73.att. CD34 pozitīvās asinsvadu struktūras blastematoza tipa vidējas malignitātes nefroblastomas gadījumā, palielin. x200.



3.74.att. CD34 pozitīvas struktūras ar un bez lūmena veidošanās epiteliāla tipa vidējas malignitātes pakāpes nefroblastomas gadījumā, palielin. x200.

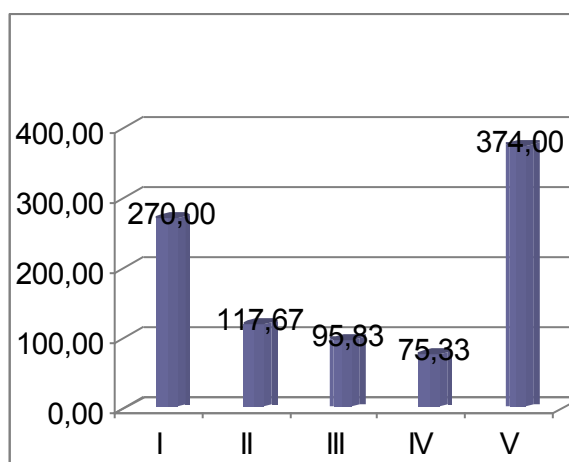
Analizējot CD34 pozitīvo mikroasinsvadu skaitu attiecībā uz audzēju stadijām, redzams, ka vienīgajā I stadijas audzējā konstatētas 270, bet vienīgajā V stadijas audzēja materiālā 374 pozitīvas struktūras. Kopumā CD34 pozitīvo mikroasinsvadu skaits atkarībā no audzēja stadijas redzams tabulā 3.59 un 3.75.att.

3.59. tabula

CD34 pozitīvo mikroasinsvadu skaits atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	270,00	—	—	—	—	—
II	117,66	70,88	25,00	270,00	78,41	156,91
III	95,83	69,90	32,00	220,00	22,46	169,19
IV	75,33	30,61	40,00	94,00	0,00	151,38
V	374,00	—	—	—	—	—

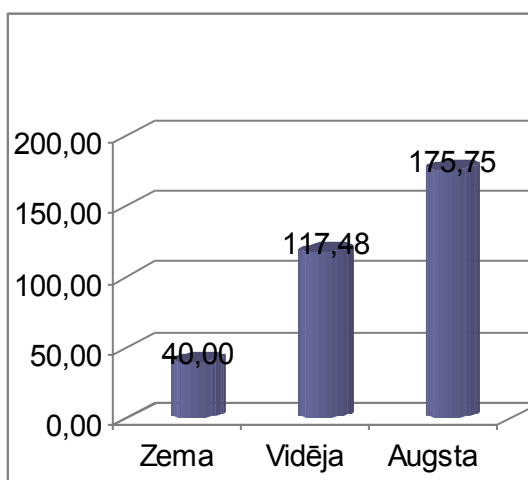
„—” lielums nav noteikts



3.75. Vidējais CD34 pozitīvo asinsvadu skaits atkarībā no audzēja stadijas.

Salīdzinot reakcijas intensitāti zemas un augstas stadijas audzēju grupā statistiski būtisku atšķirību starp abām grupām neatrod ($p=0,51$).

CD34 pozitīvo mikroasinsvadu skaits atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes redzams tabulā 3.60 un 3.76.att. Statistiski būtisku atšķirību starp reakcijas intensitāti zemas un vidējas malignitātes pakāpes audzēju grupā, salīdzinot ar augstas malignitātes audzēju grupu, neatrod ($p=0,16$).



3.76.att. Vidējais CD34 pozitīvo asinsvadu skaits atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes.

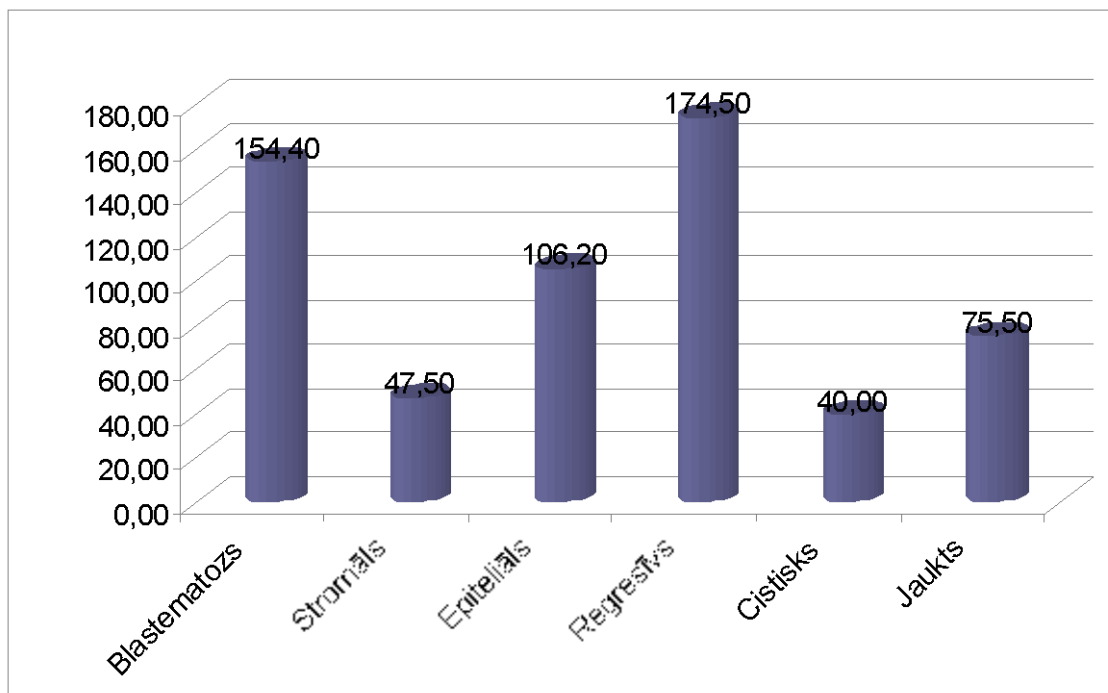
3.60. tabula

CD34 pozitīvo mikroasinsvadu skaits atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes

Malignitātes pakāpe	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
zema	40,00	—	—	—	—	—
vidēja	117,47	86,73	25,00	374,00	77,99	156,95
augsta	175,75	89,09	56,00	270,00	33,98	317,51

„—” lielums nav noteikts

CD34 pozitīvo mikroasinsvadu skaits atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa redzams tabulā 3.61 un 3.77.att. Salīdzinot reakcijas intensitāti starp kopējo audzēju grupu un dažādiem histoloģisko tiem, konstatē, ka CD34 pozitīvo asinsvadu skaits nevienā no audzēju histoloģiskajiem variantiem (blastematozs, stromāls, epiteliāls, regresīvs un jaukts) un nav būtiski atšķirīgs no skaita kopējā grupā ($p=0,19$; $p=0,12$; $p=0,58$; $p=0,095$, $p=0,3$).



3.77.att. Vidējais CD34 pozitīvo asinsvadu skaits atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa.

3.61. tabula

CD34 pozitīvo mikroasinsvadu skaits atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					Apakšējā robeža	Augšējā robeža
Blastematozs	154,40	103,83	55,00	374,00	80,12	228,67
Stromāls	47,50	21,92	32,00	63,00	0,00	244,44
Epiteliāls	106,20	81,59	25,00	220,00	4,89	207,50
Regresīvs	174,50	74,46	103,00	270,00	56,01	292,98
Jaukts	75,50	31,42	40,00	110,00	25,49	125,50
Cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	40,00	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

Audzējiem, kuriem pirms operācijas veikta ķīmijterapija vidējais CD34 pozitīvo mikroasinsvadu skaits $M=125,26$ (diapazons 25-270; SD 89,07; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 75,93, augšējo 174,59), bet ķīmijterapijas neietekmētā materiālā $M=121$ (diapazons 40-374, SD 90,4, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 60,26, augšējo

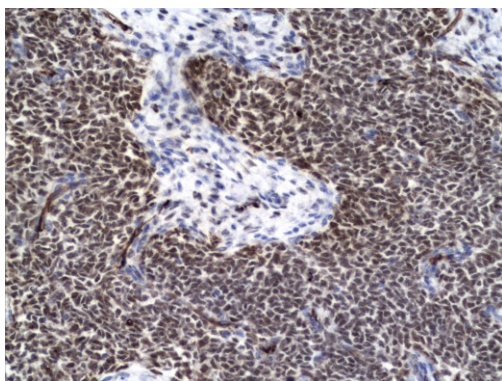
181,7). Statistiski būtisku atšķirību starp abām audzēju grupām nekonstatē ($p=0,9$). Ja audzēja atbilde uz ķīmijterapiju klīniski traktēta kā laba $M=135$ (diapazons 25-270, SD 89,66, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 70,85 , augšējo 199,14). Nepietiekošas audzēja regresijas gadījumā $M=105,8$ (diapazons 40-270; SD 94,7 ; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00 , augšējo 223,39). Statistiski būtisku atšķirību starp audzējiem ar labu un nepietiekošu reakciju uz ķīmijterapiju nekonstatē ($p=0,75$).

Mirušo pacientu grupā vidējais CD34 pozitīvo asinsvadu skaits $M=92,5$ (diapazons 56-129, SD 51,61, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 556,27). Izdzīvojušo pacientu grupā $M=126,04$ (diapazons 25-374, SD 90,45, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 87,84 augšējo 164,23). Gadījumos, ja konstatēta audzēja progresija, primārajos veidojumos noteiktais vidējais CD34 pozitīvo asinsvadu skaits $M=100,33$ (diapazons 25-220 SD 104,7; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 360,63). Statistiski būtisku atšķirību starp reakcijas intensitāti mirušajiem un izdzīvojušajiem pacientiem nekonstatē ($p=0,73$) Ja audzēja progresiju neatrod, tad $M=126,47$ (diapazons 32-374, SD 87,68; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 88,56, augšējo 164,39). Statistiski būtisku atšķirību starp abām minētajām grupām neatrod ($p=0,44$).

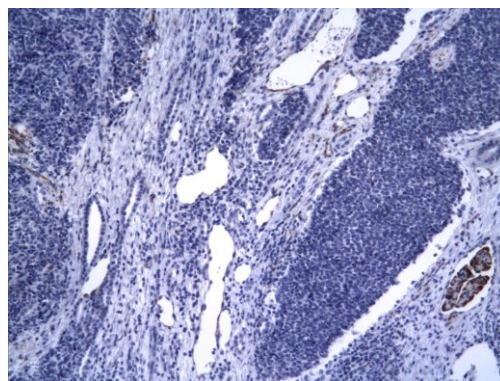
3.2.9. Vilmsa audzēja nomācēja gēna (WT1) proteīna ekspresija

Primāro audzēju grupā vidējais WT1 proteīna pozitīvo šūnu daudzums $M=44,13\%$ (diapazons 0%-99,47; SD 44). Metastātisko audzēju/recidīva grupā $M=63,23\%$ (diapazons 0%-99,23%; SD 47,55). Vidējais lielums metastāžu/recidīva grupā aprēķināts izmantojot visus šajā grupā ietilpstošos gadījumus, vienīgajā recidīva un audzēja anaplāzijas materiālā WT1 pozitīvas šūnas netika konstatētas. Salīdzinot reakciju trijos pieejamos primārā audzēja un tā metastāzes vai recidīva audos redzams, ka vienā gadījumā primārajā audzējā WT1 pozitīvo šūnu daudzums bija 42,3%, bet metastāzē 99,23%. Otrajā gadījumā primārajā audzējā atrastas 63,33%, pirmās metastāzes audos 0%, bet otrās metastāzes audos 96,66% WT1 pozitīvu šūnu. Trešajā gadījumā ne primārā audzēja audos ne recidīva gadījumos pozitīvu reakciju neatrod. Izmantojot Manna-Vitneja testu statistiski būtisku atšķirību starp WT1 ekspresiju metastātiskā un primārā procesa gadījumā neatrod ($p=0,525$).

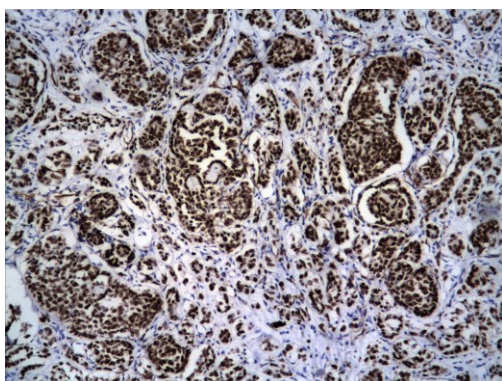
Kopumā WT1 kodolu pozitivitāti atrod 61,54% no analizētajiem primārajiem audzējiem (par negatīvu rezultātu uzskatīts pozitīvo šūnu skaits 0% un 0,87%) un 66,66% no analizētajiem metastāžu un recidīva gadījumiem. Pozitīva reakcija konstatēta gan blastematozā, gan primitīvā epiteliālā komponenta šūnu kodolos (sk. 3.78.att., 3.80.att.), tajā pašā laikā histoloģiski klasisku nefroblastomu gadījumā atrasta gan negatīva imūnhistoķīmiska reakcija blastematozā komponentā šūnu kodolos, gan pozitīva citoplazmatiska reakcija bez nukleāras pozitivitātes (sk 3.79.att., 3.81.att.).



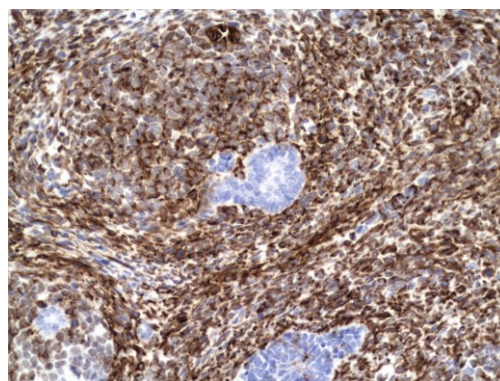
3.78.att. Pozitīva WT1 proteīna ekspresija blastematozā komponenta šūnu kodolos blastematoza tipa nefroblastomas gadījumā, palielinājums x200.



3.79.att. Negatīva WT1 proteīna ekspresija blastematozā komponenta šūnu kodolos blastematoza tipa nefroblastomas gadījumā, reakcija pozitīva nierēs kamoliņa šūnās, palielinājums x100.



3.80.att. WT1 proteīna ekspresija primitīvo tubulāro un glomerulāro struktūru šūnu kodolos epiteliāla tipa nefroblastomas gadījumā, palielinājums x100.



3.81.att. WT1 proteīna ekspresija blastematozā komponenta šūnu citoplazmā bez kodolu pozitivitātes jaukta tipa nefroblastomas gadījumā, palielinājums x200.

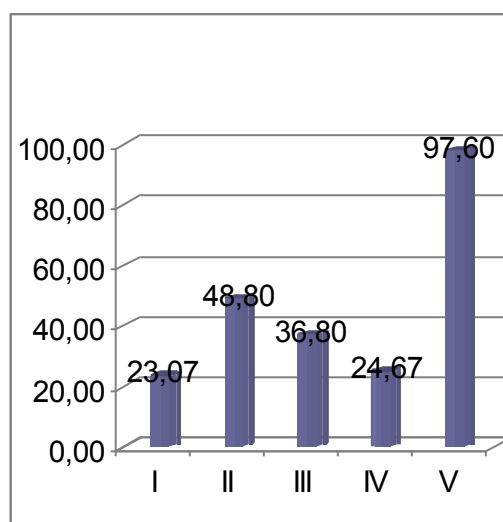
Analizējot WT1 pozitīvo šūnu daudzumu attiecībā uz audzēju stadijām, redzams, ka vienīgajā I stadijas audzējā $M=23,07\%$, bet vienīgajā V stadijas audzēja materiālā $M=97,6\%$. Kopumā reakcijas intensitāte blastematozajā komponentā atkarībā no audzēja stadijas atspoguļota tabulā 3.62 un 3.82.att. Salīdzinot reakcijas intensitāti zemas un augstas stadijas audzēju grupā statistiski būtisku atšķirību starp abām grupām nekonstatē ($p=0,62$).

3.62. tabula

WT1 proteīna pozitīvo šūnu daudzums (%) atkarībā no audzēja stadijas

Stadija	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
I	23,07	—	—	—	—	—
II	48,80	47,23	0,00	99,00	22,64	74,96
III	36,70	41,08	0,00	99,47	0,00	79,91
IV	24,66	42,72	0,00	74,00	0,00	130,79
V	97,60	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts

**3. 82.att. WT1 proteīna pozitīvo šūnu daudzums (%) atkarībā no audzēja stadijas.**

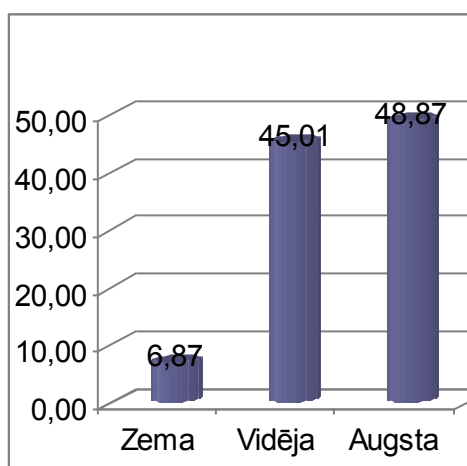
WT1 pozitīvo šūnu skaits atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes redzams tabulā 3.63 un 3.83.att.

3.63. tabula

WT1 pozitīvo šūnu daudzums (%) atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes

Malignitātes pakāpe	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Zema	6,87	—	—	—	—	—
Vidēja	45,00	43,22	0,00	99,47	25,33	64,68
Augsta	48,86	56,42	0,00	98,66	0,00	138,65

„—” lielums nav noteikts



3.83.att. WT1 proteīna pozitīvo šūnu daudzums (%) atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes.

Statistiski būtisku atšķirību starp reakcijas intensitāti zemas un vidējas malignitātes audzēju grupā, salīdzinot ar augstas malignitātes grupu, neatrod ($p=0,94$).

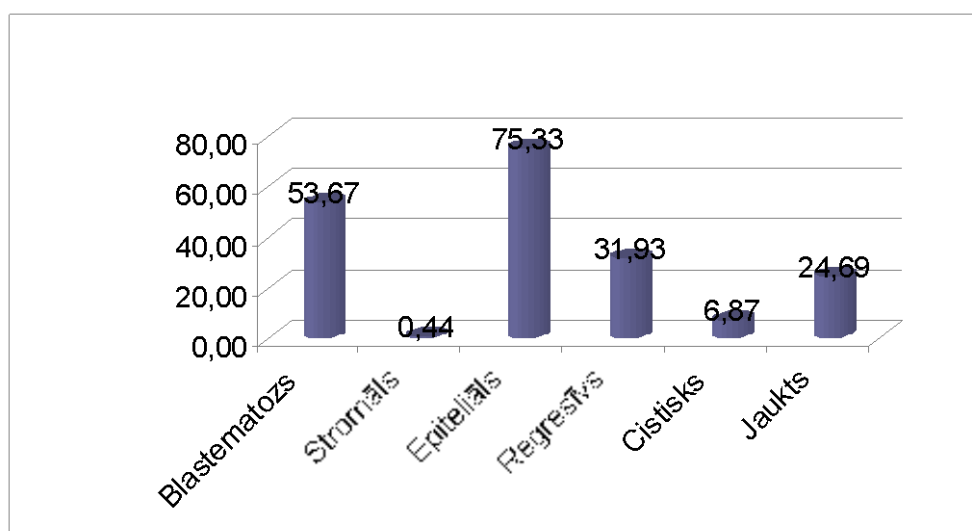
WT1 pozitīvo šūnu skaits atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa redzams tabulā 3.64 un 3.84.att.

3.64. tabula

WT1 pozitīvo šūnu daudzums (%) atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa

Histoloģiskais tips	M	SD	Min	Max	CI 95% vidējam	
					apakšējā robeža	augšējā robeža
Blastematozs	53,60	48,29	0,00	99,47	19,12	88,21
Stromāls	0,430	0,61	0,00	0,87	0,00	5,96
Epiteliāls	75,32	24,03	42,30	99,00	45,48	105,17
Regresīvs	31,93	39,60	0,00	89,58	0,00	94,95
Jaukts	24,68	49,37	0,00	98,75	0,00	103,2
Cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma	6,87	—	—	—	—	—

„—” lielums nav noteikts



3.84.att. WT1 proteīna pozitīvo šūnu skaits (%) atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa.

Salīdzinot reakcijas intensitāti starp kopējo audzēju grupu un dažādiem histoloģisko tipiem, konstatē, ka WT1 proteīna pozitīvo šūnu skaits nevienā no audzēju histoloģiskajiem variantiem (blastematozs, stromāls, epiteliāls, regresīvs un jaukts) un nav būtiski atšķirīgs no skaita kopējā grupā ($p=0,62$; $p=0,23$; $p=0,078$; $p=0,66$; $p=0,27$).

Audzējiem, kuriem pirms operācijas veikta ķīmijterapija vidējais WT1 pozitīvo šūnu daudzums bija 35,7% (diapazons 0,00%-99,00% ; SD 41,76; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 12,57, augšējo 58,82), bet ķīmijterapijas neietekmētā materiālā $M=55,63\%$ (diapazons 0,00%-99,47%, SD 46,3, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 24,5, augšējo 86,76). Statistiski būtisku atšķirību starp reakcijas intensitāti ķīmijterapijas ietekmētā un neietekmētā materiālā, nekonstatē ($p=0,41$). Ja audzēja atbilde uz ķīmijterapiju klīniski traktēta kā laba $M=52,86\%$ (diapazons 0,00%-99,00%, SD 41,55, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 23,14, augšējo 82,59). Nepietiekošas audzēja regresijas gadījumā $M=1,37$ (diapazons 0,00%-6,87%; SD 3,07; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 5,18).Minētā atšķirība ir statistiski būtiska ($p=0,009$).

Mirušo pacientu grupā vidējais WT pozitīvo šūnu daudzums $M=46,52\%$ (diapazons 0,00%-93,04%, SD 65,78, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 637,61). Izdzīvojušo pacientu grupā $M=43,93\%$ (diapazons 0,00%-99,47%, SD 43,77, CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 25,45 augšējo 62,42). Statistiski būtisku atšķirību starp reakcijas intensitāti mirušo un izdzīvojušo pacientu grupā neatrod ($p=0,76$).Gadījumos, ja konstatēta audzēja progresija, primārajos veidojumos noteiktais vidējais WT1 pozitīvo šūnu daudzums $M=35,21\%$ (diapazons 0,00%-63,33% SD 32,25; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 0,00, augšējo 115,33). Ja audzēja progresiju neatrod, tad $M=45,29\%$ (diapazons 0,00%-99,47%, SD 45,75; CI 95% vidējam ar apakšējo robežu 25,51, augšējo 65). Imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitāte starp abām grupām nav statistiski būtiski atšķirīga ($p=0,65$).

3.2.10. Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresivitātes savstarpējā saistība

Izmantojot Spīrmena neparametrisko korelāciju analīzi imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas savstarpējās saistības noteikšanai primāro audzēju grupā konstatēta statistiski būtiska pozitīva saistība starp imūnhistoķīmiski ar CD34 vizualizēto asinsvadu skaitu un CKAE1/AE3 pozitīvo epiteliālo struktūru skaitu nefroblastomu audos ($r=0,551$; $p=0,004$). Statistiski būtiska pozitīva korelācija konstatēta starp p53 un CD44s ekspresiju blastematozajā komponentā ($r=0,596$, $p=0,007$). Savukārt CD44s ekspresija stromālajā komponentā pozitīvi saistās p16^{INK4a} pozitivitāti blastematozajā un stromālajā komponentā ($r=0,595$; $p=0,15$; $r=0,45$; $p=0,031$). Statistiski būtiska saistība atrasta starp CD44s ekspresiju epiteliālajā komponentā un CKAE1/AE3 ($r=0,514$; $p=0,02$) pozitīvo struktūru skaitu. Analizējot p16^{INK4a} proteīna ekspresiju atrasta pozitīva saistība starp to un reakcijas intensitāti p53 antigēna noteikšanai blastematozajā komponentā ($r=0,513$; $p=0,029$) P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzumam epiteliālajā komponentā bija negatīva saistība ar WT1 ekspresiju ($r=-0,514$; $p=0,02$) Konstatēta statistiski būtiska saistība starp CKAE1/AE3 un e-kadherīna pozitīvo struktūru skaitu ($r=0,768$; $p=0$). Statistiski būtisku saistību novēro starp p53 un Ki67 pozitīvo šūnu daudzumu stromālajā komponentā ($r=0,654$, $p=0,001$) un e-kadherīna pozitīvo struktūru skaitu un proliferācijas indeksu stromālajā komponentā ($r=0,404$, $p=0,024$).

3.3. Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16^{INK4a} ģenētiskās izmaiņas nefroblastomas gadījumā

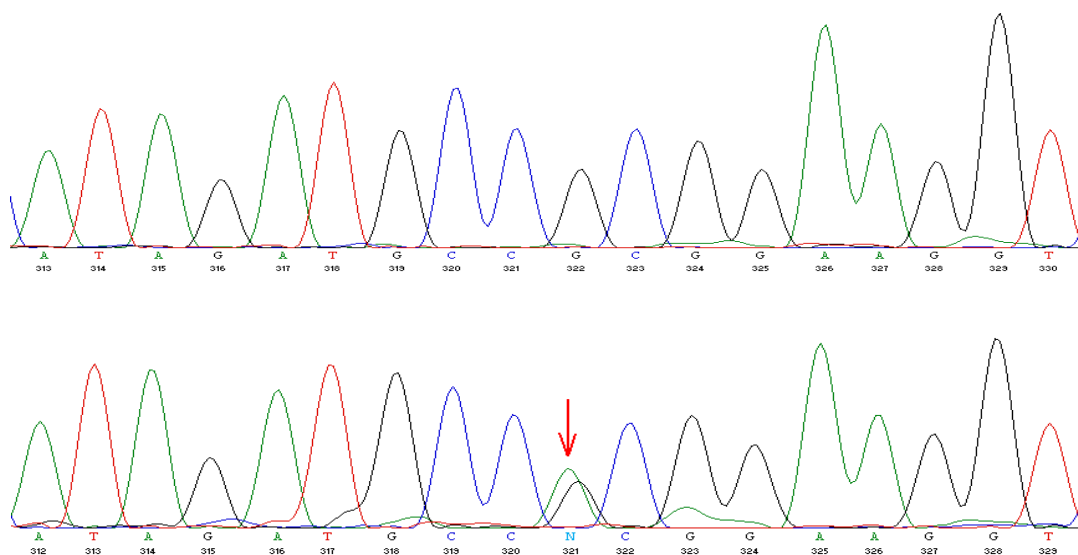
3.3.1. Pētītās audzēju grupas raksturojums

DNS izolēšana no parafinā ieguldītajiem audu paraugiem, sekojoša pavairošana un sekvenēšana 1α un 2 eksona izmaiņu pētniecībai pavisam izdarīta 14 audu paraugiem. 11 gadījumos (78,57%) izmantots primārā audzēja materiāls, 2 gadījumos (14,29%) plaušu metastāzes, bet vienā (7,14%) recidīva audi. Primāro audzēju grupā 5 (45,45%) bija II stadijas, 4 gadījumos (36,36%) izmeklēts III stadijas, bet 2 gadījumos (18,18%) IV stadijas audzēja materiāls. Lielākā daļa (9 paraugi jeb 81,82%) izmeklēto primāro nefroblastomu piederēja pie vidējas malignitātes grupas, bet izmeklēts arī viens augstas (9,09%) un viens zemas (9,09%) malignitātes audzēja gadījums. 4 gadījumos (36,36%) izmeklētais jaunveidojums piederēja pie epiteliālā tipa, 3 (27,27%) pie blastematozā tipa, 1 (9,09%) pie jaukta, 1 (9,09%) pie regresīva, 1 (9,09%) pie stromāla audzēja tipa, bet 1 gadījumā (9,09%) atrasta cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma. Mikrosatelītu marķieri analizēti 14 primārā audzēja audu paraugos. 1 gadījumā (7,14%) izmeklēts I stadijas, 7 gadījumos (50%) II stadijas, 3 gadījumos (21,43%) III stadijas, bet 3 (17,65%) IV stadijas audzēju materiāls. Visvairāk (10 audu paraugi jeb 71,43%) bija vidējas malignitātes nefroblastomu, 3 gadījumos (21,43%) tika izmeklēts augstas malignitātes audzēju audu materiāls, bet 1 (7,14%) zemas malignitātes audzēja

materiāls. 3 gadījumos (21,43%) izmeklētas epiteliāla tipa nefroblastomas, 4 (28,57%) blastematoza tipa, 2 (14,29%) jaukta tipa, 1 (7,14%) stromāla tipa, 3 (21,49%) regresīva tipa nefroblastomas. 1 gadījumā (7,14%) pētīts cistiskas, daļēji diferencētas nefroblastomas audu materiāls.

3.3.2. CDKN2A lokusa DNS sekvenēšanā iegūto ģenētisko izmaiņu analīze

Apkopojot DNS sekvenēšanā iegūtos rezultātus 12 gadījumos jeb 85,71% no analizētajiem audu paraugiem atrasta gēna CDKN2A/p16^{INK4a} 1. eksona savvaļas forma, kas atbilst normai, 2 gadījumos jeb 14,29% DNS sintēzi neizdevās veikt. Attiecībā uz 2. eksonu savvaļas tips konstatēts 4 (28,57%) gadījumos. 3 gadījumos (21,43%) DNS sintēzi neizdevās veikt, bet 7 jeb 50% no analizētajiem audu paraugiem atrasts, ka 442. nukleotīds G nomainīts uz A (turpmāk tekstā c.442G>A, sk. 3.85.att.).



3.85.att. Sekvence ar polimorfismu c.442G>A (p. A148T) gēna CDKN2A 2. eksonā c.442G>A (p. A148T) un paraugs bez izmaiņas tajā pašā pozīcijā.

Sarkanā bultiņa norāda polimorfisma vietu.

Attiecīgi aminoskābju līmenī p16^{INK4a} proteīna 148. aminoskābe alanīns nomainīta ar treonīnu (turpmāk tekstā A148T) (sk. tabulu 3.66). Lai noskaidrotu atrastās izmaiņas lomu nefroblastomas attīstībā, A148T sastopamības biežums nefroblastomas pacientu grupā tika salīdzināts tās sastopamības biežumu kontroles grupā. Kā kontroles grupa tika izmantoti 203 praktiski veseli cilvēki, kuriem gēna CDKN2A 2. eksons bija analizēts iepriekš (Pjanova et al., 2007). Šajā grupā no analizētajiem 203 gadījumiem 200 paraugos (98,52%) atrasts savvaļas tipa 2. eksons, savukārt aprakstītā izmaiņa A148T (c.442G>A) konstatēta tikai 3 jeb 1,48% gadījumu. Izmantojot Fišera testu konstatēts, ka nefroblastomu grupā 148. aminoskābes alanīna nomaiņa ar treonīnu

(A148T) ir statistiski būtiski biežāk sastopama nekā kontroles grupā ($p < 10^{-7}$), kas norāda uz atrastās izmaiņas lomu nefroblastomas attīstībā.

CDKN2A lokusa mikrosatelītu marķieru analīzē heterozigotitātes zudums kopumā konstatēts trijos gadījumos (21,43% no kopējās analizētās grupas) četriem dažādiem mikrosatelītiem (sk. tabulu 3.65). Par heterozigotitātes zudumu tika uzskatīts vienas alēles pilnīgs zudums vai tās redukcija vismaz par 50% salīdzinot ar normālajiem audiem (sk. 3.86.att. un 3.87.att.). Vienā gadījumā jeb 7,14% no analizētajiem paraugiem atrasts heterozigotātes zudums analizējot marķieri D9S736, kas atrodas aiz CDKN2A gēna pēdējā trešā eksona norādot (sk. nodaļas 2.3.4 2.5.att.), ka potenciāli ar nefroblastomas attīstību saistītas ģenētiskās izmaiņas šajā lokusā būtu meklējamas aiz CDKN2A gēna. Minētais audzējs piederēja vidējas malignitātes III stadijas epiteliālajam tipam, taču pacientei ar konstatēto izmaiņu novēroja progresējošu ļaundabīga procesa gaitu ar atkārtotu plaušu metastāžu attīstību. Slimniece atrodas paliatīvajā aprūpē. Kopumā norma D9S736 marķiera gadījumā konstatēta 6 jeb 42,86% no paraugiem, bet marķieris dažādu iemeslu dēļ (vāja, slikti interpretējama reakcija, materiālā nav pietiekoši normālo audu reakcijas salīdzināšanai ar audzēja paraugiem, vai marķieris nav informatīvs homozigotitāte dēļ) nav noteikts 7 jeb 50% no gadījumiem.

Vēl vienā gadījumā jeb 7,14% no analizētajiem paraugiem atrasts heterozigotātes zudums analizējot marķieri D9S1604, kas atrodas intronā pirms CDKN2A/p16^{INK4A} gēna (skat. nodaļas 2.3.4 2.5.att.), norādot uz iespējamu šī gēna saistību ar nefroblastomas attīstību. Diemžēl precīzu delēcijas lielumu noteikt neizdevās, jo pārējie analizētie mikrosatelītu marķieri bija neinformatīvi (3.65. tabula). Taču zīmīgi, ka šajā audzējā tika atrasta arī CDKN2A gēna A148T izmaiņa. Minētie audi piederēja 4. stadijas, vidējas malignitātes jaukta tipa audzējam. Pacientam pašlaik, 4 gadus pēc diagnozes noteikšanas, novērota ļaundabīgā procesa remisija. Kopumā norma D9S1604 marķiera gadījumā konstatēta 4 jeb 28,57% no paraugiem, bet materiāls bija neinformatīvs 9 (64,29%) analizēto gadījumu.

Vienā gadījumā heterozigotitātes zudums atrasts gan marķierī D9S942, gan arī marķierī D9S171 vienlaicīgi. Minētie marķieri attiecīgi atrodas intronā starp 1β un 1α eksoniem un pirms CDKN2A gēna 1β eksona (skat. nodaļas 2.3.4 2.5.att.) norādot uz lielāka reģiona delēciju. Diemžēl līdzīgi kā iepriekš precīzu delēcijas lielumu noteikt nav iespējams, jo pārējie analizētie marķieri bija neinformatīvi (3.65. tabula). Taču līdzīgi kā iepriekš arī šajos audos papildus delēcijai tika atrasta arī CDKN2A gēna A148T izmaiņa. Minētais audzējs piederēja 2. stadijas augstas malignitātes blastematoza tipa veidojumiem. Klīniski tika novērota slikta reakcija uz pirmsoperācijas periodā izdarīto ķīmijterapiju. Pašlaik, 3 gadus pēc diagnozes noteikšanas, novērota ļaundabīgā procesa remisija. Kopumā norma D9S942 marķiera gadījumā tika atrasta 10 (71,43%) no gadījumiem, 3 (21,43%) analizētie paraugi nebija informatīvi. Savukārt D9S171 marķiera gadījumā norma konstatēta 8 (57,14%), bet neinformatīvs materiāls 5 (35,71%) analizēto paraugu.

CDKN2A lokusa mikrosatelītu marķieru analīzes rezultāti

Nr.p.k	Marķieris D9S736	Marķieris D9S1604	Marķieris D9S974	Marķieris D9S942	Marķieris D9S1748	Marķieris D9S1870	Marķieris D9S171
1.	NI	LOH	—	—	NI	—	—
2.	—	—	norma	norma	—	norma	NI
3.	NI	norma	norma	norma	norma	norma	norma
4.	LOH	norma	norma	norma	NI	NI	norma
5.	NI	NI	norma	norma	norma	norma	norma
6.	NI	NI	—	LOH	NI	NI	LOH
7.	NI	NI	NI	norma	norma	—	NI
8.	norma	NI	NI	norma	norma	—	norma
9.	norma	norma	norma	norma	norma	norma	norma
10.	norma	NI	NI	norma	norma	norma	norma
11.	norma	NI	NI	norma	norma	norma	norma
12.	—	NI	NI	—	—	NI	—
13.	norma	—	norma	norma	norma	norma	norma
14.	norma	norma	NI	—	—	—	—

„—” neinformatīvs rezultāts, jo materiālā nav normālo audu vai arī reakcijas produkts ļoti vājš, nav interpretējams.

NI- neinformatīvs marķieris (homozigotas)

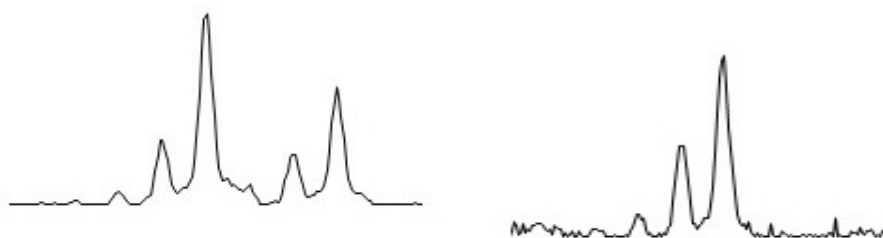
LOH- hetrozigotitātes zudums (angļu val. loss of heterozygosity).

Marķieris

Normālie audi

Audzēja audi

D9S171



3.86.att. Heterozigotitātes zudums *CDKN2A* lokusā mikrosatelīta marķierī D9S171 nefroblastomas gadījumā salīdzinot ar tā paša pacienta normālajiem audiem.

Marķieris

Normālie audi

Audzēja audi

D9S1604

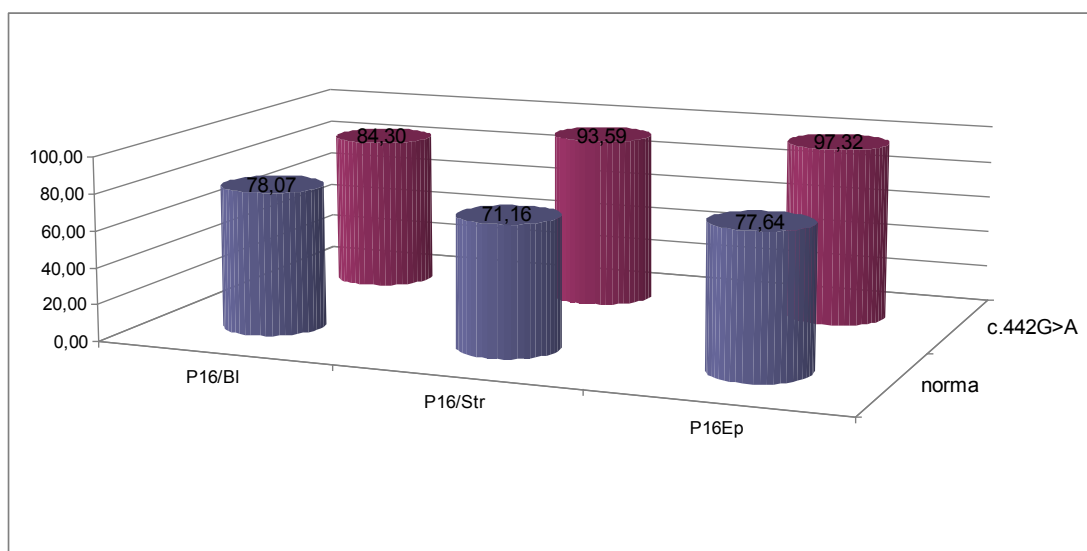


3.87.att. Heterozigozitātes zudums *CDKN2A* lokusā mikrosatelīta marķierī D9S1604 nefroblastomas gadījumā salīdzinot ar tā paša pacienta normālajiem audiem.

3.3.3. *CDKN2A* lokusa DNS sekvencēšanā iegūtā rezultāta un p16^{INK4A} proteīna imūnhistoķīmiskās ekspresijas salīdzinājums

Pacientiem ar atrasto 148. aminoskābes alanīna nomaiņu ar treonīnu (A148T) 2. gēna eksonā vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā ir 84,3% (diapazons 70,00%-98,57%, SD 11,69), stromālajā komponentā 93,58,2% (diapazons 88,88%-100,00%, SD 5,19) un epiteliālajā komponentā 97,1% (diapazons 92,63%-100,00%, SD 3,05). Pacientiem bez minētās izmaiņas blastematozajā komponentā vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums bija 78,06% (diapazons 51,85%-92,77, SD 22,7), stromālajā komponentā M=71,15% (diapazons 41,66%-92,47%, SD 22,58), bet epiteliālajā komponentā 77,63% (diapazons 42,66%-96,50%, SD 30,3) (sk. 3.88.att. un tabulu 3.66).

Lai gan vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums visos audzēja histoloģiskajos komponentos ir zemāks pacientiem ar konstatēto 2. eksona savvaļas tipu, izmantojot Manna-Vitneja testu, statistiski būtisku atšķirību starp minētās imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitāti blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā pacientiem ar 2. eksona savvaļas tipu un pacientiem ar atrasto A148T izmaiņu 2. gēna eksonā, nekonstatē (attiecīgi $p=1$; $p=0,086$; $p=0,177$).



3.88.att. Vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums analizēto audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā pacientiem bez CDKN2A lokusa 2.eksona izmaiņām un pacientiem ar konstatēto A148T izmaiņu.

3.66. tabula

CDKN2A lokusa 1α un 2 eksona ģenētisko izmaiņas saistībā ar p16^{INK4a} proteīna imūnhistoķīmisko ekspresiju

Nr. p.k.	1α eksona DNS sekvencēšanā iegūtais rezultāts	2. eksons DNS sekvencēšanā iegūtais rezultāts	P16 ^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) blastematozajā komponentā	P16 ^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) epiteliālajā komponentā	P16 ^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums (%) stromālajā komponentā
1.	savvaļas tips	A148T	98,57	100,00	98,14
2.	savvaļas tips	A148T	83,33	96,36	—
3.	savvaļas tips	nesintezējas	—	98,75	99,20
4.	savvaļas tips	A148T	—	100,00	88,88
5.	savvaļas tips	A148T	85,30	97,60	88,99
6.	savvaļas tips	nesintezējas	86,50	86,53	—
7.	savvaļas tips	savvaļas tips	89,58	96,50	65,97
8.	savvaļas tips	A148T	—	92,63	91,93
9.	savvaļas tips	A148T	70,00	—	—
10.	nesintezējas	A148T	—	—	100,00
11.	savvaļas tips	nesintezējās	89,00	—	77,46
12.	savvaļas tips	savvaļas tips	92,77	—	92,47
13.	savvaļas tips	savvaļas tips	51,85	42,66	41,66
14.	nesintezējas	savvaļas tips	—	93,75	84,52

„—” lielums netika noteikts, jo audzēja audos attiecīgais histoloģiskais komponents veidoja mazāk par 5%.

Turpmākajā darbā salīdzināta p16^{INK4a} proteīna ekspresija pacientiem, kuriem mikrosatelītu marķieru analizē konstatēts gēna heterozigotitātes zudums un tiem, kuriem atrastas abas alēles. Gadījumos, kad konstatētas abas alēles vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā bija 80,55% (diapazons 51,85%-

100%, SD 17,02), stromālajā komponentā 79,87% (diapazons 37,97%-100,00%, SD 24,46), epiteliālajā komponentā 87,25% (diapazons 42,66%-100,00%, SD 18,97). Ja mikrosatelītu marķieru analīzē atrasts heterozigotitātes zudums, vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā bija 84,28% (diapazons 70,00%-98,57%, SD 20,2), stromālajā komponentā 93,51% (diapazons 88,88%-98,14%, SD 6,54), epiteliālajā komponentā visos gadījumos p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums bija 100%. Izmantojot Manna-Vitneja testu statistiski būtisku atšķirību starp minētā proteīna ekspresiju kādā no histoloģiskajiem komponentiem nekonstatē (attiecīgi $p=0,88$; $p=0,75$, $p=0,091$).

4. DISKUSIJA

4.1. Latvijas pediatriko nieru audzēju morfoloģiskā spektra analīze

Analizējot veiktā pētījumu rezultātus jāņem vērā fakts, visi izmeklētie pediatrikie nieru audzēji ir samērā reti sastopami gan pasaulē, gan Latvijā. Primāri nieru audzēji veido aptuveni 7% no visiem pediatrikajiem ļaundabīgajiem jaunveidojumiem vecuma grupā līdz 15 gadiem. To kopējā sastopamība ASV minētajā vecumā grupā ir 7,9 gadījumi uz miljons iedzīvotāju [Ries et al., 1999]. Nefroblastoma sastopama vienā gadījumā uz 8 000 bērniem vecumā līdz 15 gadiem [Breslow et al., 1993], bet tāda jaunveidojuma kā nieres rabdoīds audzējs sastopamība bērniem līdz 2 gadu vecumam ASV ir tikai 1 gadījums uz miljons iedzīvotājiem [Argani, 2004]. Tomēr bērnu vecuma nieru audzēji ir patoloģija, ar ko sastopas katrs pediatrijā strādājošais ķirurgs, patologs vai onkologs un šo veidojumu pētniecībai pasaulē vēl joprojām tiek pievērsta liela uzmanība. Zinātniskajā darbā svarīgs jautājums ir materiāla apkopošanai, bez kuras nav iespējama pilnvērtīga bērnu vecuma nieru audzēju izpēte. Tāpēc arī literatūrā ir uzsvērts, ka šajā procesā viens no svarīgākajiem posmiem ir apzināt konstatēto jaunveidojumu, sevišķi nefroblastomas gadījumus un nodot tos starpinstitucionālo zinātnisko grupu kā NWTSG vai SIOP audzēju izpētes grupa rīcībā. Tas tiek rekomendēts pirmkārt tādēļ, ka lielākā daļa atsevišķo institūciju, kuras nodarbojas ar to diagnostiku nespēj savākt pietiekoši daudz materiāla, lai sniegtu atbildes uz kompleksām jautājumu grupām. Otrkārt, minēto pētniecības grupu ietvaros tiek ieteikts veikt centralizētu histoloģisko preparātu pārskatu, jo šādu samērā retu audzēju gadījumā ne vienmēr praktiski strādājošie patologi ir pietiekoši kompetenti lai diferencētu nefroblastomu no citiem, reti sastopamiem bērnu vecuma nieru jaunveidojumiem [Vujanic et al., 2010]. Šobrīd prezentētajā darbā izmantots tikai Latvijā, BKUS diagnosticēto audzēju materiāls, līdz ar to pētīto gadījumu skaits ir neliels. Kopējā primāro audzēju grupā analizēti 49 audzēji. Pētījumā izmantotais materiāls iegūts apkopojot datus un histoloģisko materiālu no gandrīz 15 gadu ilgā laika posmā (1997. gada janvāris- 2012. gada jūlijs) konstatētajiem jaunveidojumiem. Tāpēc dažkārt izveidojās situācija, kad ne visu audzēju histoloģiskā materiāla kvalitāte bija pietiekoša pilnīgas imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas veikšanai. Imūnhistoķīmiska diagnozes verifikācija veikta 63,26% no visiem primāro nieru audzēju gadījumiem. Tajā pašā laikā H&E materiāla atkārtotā izmeklēšana nedeva pietiekošu pamatojumu esošās histoloģiskās diagnozes nomaiņai un audzēja izslēgšanai no primāro nieru audzēju grupas. Tādejādi atsevišķi mezoblastiskās nefromas gadījumi, kā arī angiosarkoma tika iekļauti kopējā nieru audzēju spektrā bez papildus imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas. Tāpat, pieejamās medicīniskās dokumentācijas nepilnību dēļ, ne visos analizētajā primāro nieru audzēju grupā esošajos gadījumos izdevās iegūt precīzu informāciju par veidojuma stadiju vai pārliecināties par slimnieka dzīvildzi pacientiem, kuriem ļaundabīgais process konstatēts vairāk nekā 10 gadus ilgā pagātnē. Latvijas apstākļos, kad gadā BKUS tiek veikta ne vairāk par 9 pediatriko nieru jaunveidojumu diagnostika, arī nevar runāt par pietiekoši kompetenta, centralizēta histoloģisko preparātu pārskata izdarīšanu. Šāda diagnozes verifikācija būtu izdarāma piedaloties

NWTSG vai SIOP audzēju izpētes grupu ietvaros strādājošajiem patologi. Tomēr, lai gan ir veikts individuāls pētījums promocijas darba ietvaros, izdarītajā histoloģisko preparātu pārskata gaitā nepieciešamības gadījumā pieaicināts Latvijā strādājošo patologu konsīlijs, bet rabdoīda audzēja diagnozes imūnhistoķīmiskā un morfoloģiskā apstiprināšana veikta ar bērnu patologa, profesores Maurīnas O' Sullivanas (Maureen J. O'Sullivan, Our Lady's Children's Hospital, Dublin, Ireland) palīdzību. Tādēļ domājams, ka kopumā izdarīts pietiekoši kompetents histoloģisko preparātu pārskats un bērnu vecuma primāro nieru audzēju spektra revīzija. BKUS iegūtais materiāls netika salīdzināts ar Latvijas vēža slimnieku reģistra datiem, jo pētījuma struktūra paredzēja atkārtotu preparātu pārskatu un imūnhistoķīmisko diagnožu verifikāciju, ko nav iespējams izdarīt analizējot reģistrā iegūtos datus. Lai gan darbā izmantots tikai BKUS diagnosticēto audzēju materiāls, tomēr jāatzīmē, ka šajā slimnīcā atrodas Latvijā vienīgā bērnu onkoloģijas nodaļa. Tāpēc pētījuma rezultāti visumā arī atspoguļo situāciju bērnu vecuma nieru audzēju diagnostikā visā valstī.

Runājot par darbā analizēto primāro nieru audzēju morfoloģisko spektru, pētījums parāda, ka BKUS biežākais diagnosticētais bērnu vecuma nieru jaunveidojums ir nefroblastoma. Pēc BKUS Bērnu Patoloģijas birojā veiktās morfoloģiskās izmeklēšanas datiem tā veido 77,55% no visiem nieru jaunveidojumiem bērniem vecumā līdz 18 gadiem, bet atkārtotās imūnhistoķīmiskās izmeklēšana šo diagnozi pierādīja 75,51% no visiem gadījumiem. Rezultāts kopumā atbilst pasaules datiem. Atkarībā no izmantotā literatūras avota dažādās vecuma grupās nefroblastoma veido 80% līdz 85% no visiem pediatrikajiem nieru audzējiem [Eble et al., 2007; Sebire et al., 2010] un ir biežākais sastopamais nieru jaunveidojums bērniem. Pētījuma rezultātos redzams, ka Latvijā nefroblastomas veido mazāk par 80% gadījumu, bet iespējams, ka šī novirze no literatūrā atspoguļotā audzēju spektra ir saistīta ar nelielo kopējo izmeklēto gadījumu skaitu. Attiecībā uz pārējiem BKUS diagnosticēto pediatriko nieru audzēju morfoloģiskajiem tipiem, interesanti ir tas, ka konstatēti tādi reti sastopami audzēji kā nieru gaišo šūnu sarkoma un rabdoīds nieru audzējs, kā arī bērnu vecumā reti sastopamā angiomiolipoma, bet ne BKUS Bērnu patoloģijas biroja veiktajā morfoloģiskajā izmeklēšanā, ne atkārtotā imūnhistoķīmiskajā preparātu pārskatā nav atrasts neviens nieru šūnu vēža gadījums. Klīniski un radioloģiski aizdomas par NŠV tika izteiktas 3 gadījumos jeb 5,66% no visa morfoloģiski izmeklētā nefrektomiju un daļējo nieru rezekciju materiāla, bet histoloģiski tika konstatēts ksantogranulomatozs pielonefrīts. Diagnoze apstiprināta Bērnu patoloģijas biroja veiktajā imūnhistoķīmiskajā izmeklēšanā, kurā atrod negatīvu reakciju CKAE1/AE3 antigēna noteikšanai, savukārt reakcija CD68 un vimentīna antigēnu noteikšanai bija pozitīva. Salīdzinoši Lietuvas kolēģi Viļņas Universitātes Bērnu slimnīcā laika periodā no 1997. gada līdz 2008. gadam diagnosticējuši 30 primārus nieru audzējus. 93,7% no tiem bija nefroblastoma, bet 6,3% nieru šūnu vēzis [Jankauskiene et al., 2009]. Saskaņā ar ASV Nacionālā vēža institūta veiktajiem pētījumiem, bērniem līdz 15 gadiem nieru šūnu vēzis atrasts 2,6%, pacientiem līdz 20 gadiem 5,4% no visiem nieru audzējiem, bet vecuma grupā no 15 līdz 19 gadiem nieru NŠV konstatēts jau 63% gadījumu [Bernstein et al., 1999]. Balstoties uz Kalifornijas vēža reģistra datiem pacientiem līdz 21 gada vecumam nieru šūnu vēzis konstatēts 4,3% no visiem nieru jaunveidojumiem un

pacientu vidējais vecums bija 15 gadi [Silberstein et al., 2009]. ASV Nacionālā vēža institūta veiktajās publikācijās arī uzsvērts fakts, ka, lai gan nieru šūnu vēzis nav iekļauts bērnu vecuma nieru audzēju darba klasifikācijā, tas pēc būtības ir pat biežāk sastopams nekā tāds tradicionāli par pediatriisku patoloģiju uzskatīts veidojums kā nieres rabdoīds audzējs, kurš veido 1,6% līdz 2% no bērnu vecuma nieru audzējiem [Argani et al., 2004]. Šobrīd prezentētajā darbā konstatētā negatīvā atradne nevarētu būt saistīta ar to, ka vairums nieru šūnu vēža pacientu tiktu stacionāri nevis BKUS, bet citā medicīnas iestādē jo minētajā slimnīcā atrodas pacienti līdz 18 gadu vecumam un pēc analizētajiem visu nieres operāciju materiāla datiem redzams, ka pacienti ar aizdomām par nieres šūnu vēzi arī tiek ārstēti šajā stacionārā. Tomēr nevar pilnībā izslēgt varbūtību, ka atsevišķi gadījumi varētu būt diagnosticēti citās medicīnas iestādēs, jo atšķirībā no nefroblastomas, nieru rabdoīda audzēja un nieru gaišo šūnu sarkomas, kuri tradicionāli tiek ārstēti bērnu onkoloģijas nodaļās, nieru šūnu vēža terapijas shēmas ir labi aprobētas pieaugušo onkoloģijā. Pētījums arī neatspoguļo nieru audzēju sastopamību slimniekiem no 18 līdz 20 gadiem, kas varētu radīt zināmu neatbilstību starp esošajiem rezultātiem un pasaules literatūras datiem vecuma grupā līdz 20 gadiem. Kopumā jāsaņem, ka pētījuma dati attiecībā uz nieru šūnu vēža vietu kopējā audzēju spektrā bērniem Latvijā atšķiras no pasaules literatūras datiem, taču nebūtu vieta runāt par Latviju kā par valsti, kur nieru šūnu vēzis bērniem sastopams retāk nekā citviet pasaulē. Lai apstiprinātu šo domu, vajadzētu turpināt pētījumu analizējot BKUS diagnosticētos nieru audzējus arī nākotnē un izdarīt statistisku datu analīzi salīdzinot iegūto atradni ar Valsts ekonomikas centra datu bāzē atrodamo informāciju.

Apskatot pārējos diagnosticētos bērnu vecuma audzējus redzams, ka BKUS Bērnu patoloģijas birojā veiktajā morfoloģiskajā izmeklēšanā atrasti reti sastopami nieru jaunveidojumi kā nieres gaišo šūnu sarkoma un nieres rabdoīds audzējs, kā arī angiomiolipoma. Lai gan visas minētās diagnozes tika apstiprinātas arī atkārtotās imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas gaitā, jāatzīmē konstatētās problēmas rabdoīda audzēja diagnostikā, jo vienā no gadījumiem Bērnu patoloģijas birojā morfoloģiski izmeklējot primāro audzēju tika noteikta blastematoza tipa nefroblastomas diagnoze, kura neapstiprinājās plaušu metastāzes materiālā. Korekta šīs entitātes diagnostika ir problēma bērnu patologa praksē. Lai gan lielākajā daļā gadījumu ir iespējams histoloģisko diagnozi noteikt pamatojoties uz rūpīgu gaismas mikroskopijas atradnes interpretāciju, šeit pastāv liela iespēja kļūdīties. Jāatzīmē, ka NRA gadījumos ir iespējamās plašas histoloģiskās ainas variācijas, kas apgrūtina histoloģisko diagnostiku, jo pastāv sekojoši morfoloģiskie apakštipi: klasiskais, sklerotiskais (fibrotiskais, osteosarkomatozais, hondroīdais), epiteloīdais (trabekulārais mukoīdais, alveolārais, pseudoglandulārais), vārpstveida šūnu (kūlīšveida, miksoīdais, hemipericitomatozais, virpuļveida, palisādveida), limfomatoīdais (solīdais, histiocīdais), vaskulārais (līdzīgs nieru gaišo šūnu sarkomai, organoīdais), pseudopapilārais un cistiskais [Weeks et al., 1989]. Nereti ir konstatēts, ka audzēji, kuri sakotnēji diagnosticēti kā nieres rabdoīds tumors, patiesībā ir bijuši citi nieru audzēji [Weeks et al., 1991; Vujančić et al., 1996]. Ir aprakstīti daudzi nieru jaunveidojumi, kas var būt līdzīgi NRA. Šī audzēju grupa sastāv no klīniski un histoģenētiski atšķirīgām entitātēm, kas iekļauj anaplastisku nefroblastomu, iedzimtu mezoblastisku nefromu, nieru šūnu vēzi, pārejas šūnu vēzi, Bellini

savācējvadu vēzi, onkocitomu, rabdomiosarkomu, PNET un limfomu. Literatūrā ir aprakstīta arī pretēja kļūda, kad audzēji, kuri ir diagnosticēti kā NRA ir izrādījušies citi nieru audzēji. Gordans Vujaničs un autori ir ziņojuši par 22 NRA gadījumiem, kuri ir diagnosticēti starp SIOP laika posmā no 1971. gada līdz 1993. gadam reģistrētajiem 2392 bērnu nieru audzējiem. Šajā pētījumā tikai 12 no 22 gadījumiem jau sākotnēji bija atklājuši ārstniecības iestāžu patologi, līdz ar to 10 gadījumos patologu komisija izmainīja iepriekšējās diagnozes. Četri gadījumi sākotnēji diagnosticēti kā nieru gaišo šūnu sarkoma, trīs gadījumi kā rabdomiosarkoma, viens gadījums kā nediferencēts nieru vēzis un divi kā blastematoza tipa nefroblastoma [Vujanič et al., 1996]. Visbiežāk minētais pseidorabdoīdais audzējs tomēr ir nefroblastoma ar labvēlīgu histoloģisko atradi un daļēju rabdoīdu citoloģiju. Diagnostisko grūtību cēlonis parasti ir pamanāmi filamentozi citoplazmas ieslēgumi vai lieli kodoliņi, kas ir tipiska NRA atradne [Weeks et al., 1991]. Tā kā NRA gadījumā audzēja šūnas ir polifenotipiskas, imūnhistoķīmiskā izmeklēšana pierāda to epiteliālu, mezenhimālu un neironālu diferenciāciju, līdz ar to diferenciālā diagnostika ir apgrūtināta. Pie tam, imūnhistoķīmiskā diferenciālā diagnoze starp nefroblastomu un nieres rabdoīdu audzēju ir sarežģīta tāpēc, ka arī nefroblastomai nav specifiska imunofenotipa. Kā jau iepriekš minēts, blastemālais komponentā parasti novērojama pozitīva reakcija vimentīna antigēna noteikšanai un līdz pat 90% gadījumu var parādīties arī desmīna pozitivitāte [Bahrami et al., 2008]. Tāpat blastēmas šūnās var konstatēt fokālu NSE and citokeratīna pozitivitāti, WT1 proteīna nukleāra pozitivitāte ir novērojama blastemālajā komponentā un agrīnas epiteliālas diferenciācijas rajonos [Coffin et al., 2006]. Salīdzinājumā NRA parasti ir raksturīga difūza vimentīna pozitivitāte, fokāla vismaz viena (citokeratīna vai EMA) epiteliālā marķiera reaktivitāte un variabla mezenhimālo un neuroektodermālo marķieru pozitivitāte [Argani et al., 2004]. Atsevišķās publikācijās ir aprakstīta arī fokāla WT1 proteīna ekspresija retos NRA gadījumos. Tā piemēram, fokālu pozitīvu reakciju audzēja šūnu kodolos vienā no diviem nieres rabdoīda audzēja gadījumiem ir aprakstījis Charles un autori [Charles et al., 1997], bet Ramani un autori ir ziņojuši par nukleāru WT1 imunoreaktivitāti trīs NRA gadījumā [Ramani et al., 1996]. Tāpat WT1 gēna ekspresija dažos NRA gadījumos ir noteikta izmantojot reversās PCR un paralēlu WT1 proteīna imūnhistoķīmisku noteikšanu [Thorner et al., 1999], lai gan citi zinātnieki ir ziņojuši par NRA gadījumiem, kuri neekspresē WT1 izmantojot reversās transkriptāzes PCR [Baudry et al., 2000]. Variablā WT1 proteīna ekspresija tiek izskaidrota ar iespējamo audzēja var attīstību no nediferencētas nefrogēnas mezenhīmas. [Charles et al., 1997]. Molekulārā līmenī rabdoīdam audzējam raksturīga 22 hromosomas inaktivācija ar sekojošu hSNF5/INI1 gēna iztrūkumu. Tas imūnhistoķīmiski izpaužas kā INI1 proteīna ekspresijas iztrūkums, kas var kalpot kā svarīga diferenciāldiagnostiska pazīme [Perry et al., 2005].

Tā kā vienā no pētījumā iekļautajiem NRA gadījumiem histoloģiskā aina nebija klasiska un bija konstatētas grūtības diferenciālajā diagnostikā, lai verificētu diagnozes, abos gadījumos tika veikta INI1 proteīna imūnhistoķīmiskas ekspresijas noteikšana (Our Lady's Children's Hospital, Dublin, Ireland). Pašlaik minētā anti viela nav pieejama Latvijā, taču jāsaņem, ka nav arī ekonomiski pamatota šī reaktīva lietošana Latvijas apstākļos, jo NRA ir reti audzēji. Pētītajos gadījumos starp abiem Latvijā

diagnosticētajiem rabdoīdā nieru audzēja gadījumiem bija piecus gadus ilgs laika periods. Tāpēc vairāk būtu rekomendējama sadarbība starp vairākām dažādu valstu laboratorijām INI1 proteīna noteikšanā, iespējams, iesaistoties starptautisko starp-institucionālo bērnu vecuma nieru audzēju izpētes grupu darbā. Analizējot šajā gadījumā sastopamās diagnostikas grūtības arī konstatēts, ka pirmreizējās, Bērnu patoloģijas birojā veiktās morfoloģiskās izmeklēšanas laikā nebija pieejama antivielu WT1 proteīna antigēna noteikšanai un minētā imūnhistoķīmiskā reakcija netika veikta. Savukārt pētījuma gaitā veiktajā atkārtotajā izmeklēšanā konstatēta pilnībā negatīva imūnhistoķīmiskā reakcija WT1 proteīna noteikšanai, kas varētu būt palīdzējusi izšķirties par labu rabdoīda audzēja diagnozei pirmreizējās diagnostikas laikā. Tāpēc, lai arī ne visos nefroblastomas gadījumos konstatējama imūnhistoķīmiskā WT1 proteīna pozitivitāte (darbā imūnhistoķīmiski analizētajā nefroblastomu grupā pozitīva reakcija atrasta 61,54% gadījumu), tomēr šīs reakcijas lietošana būtu rekomendējama bērnu vecuma nieru audzēju diagnostikas shēmās. Domājot par nieres rabdoīda audzēja un nefroblastomas diferenciālās diagnozes klīnisko nozīmi, atzīmējams, ka neskatoties uz ķīmijterapiju NRA prognoze nemainīgi saglabājas slikta. Piecu gadu dzīvildze nieres rabdoīda audzēja gadījumā ir tikai 20-25% [Weeks et al., 1989] un pacienti mirst vidēji 12 mēnešus pēc diagnozes noteikšanas. [Weeks et al., 1989; van den Heuvel-Eubrink et al., 2011]. Tādēļ precīza nefroblastomas un NRA diferenciācija ir svarīga tādēļ lai nefroblastomas pacienti diagnostiskās kļūdas dēļ nesaņemtu nepamatoti agresīvu ķīmijterapiju.

Lai gan pārskata gaitā diagnoze netika izmainīta, diagnostiskās grūtības tika konstatētas vienā no nefroblastomas gadījumiem. Histoloģiskā diagnoze BKUS Bērnu Patoloģijas birojā veiktajā morfoloģiskajā izmeklēšanā bija jaukta tipa (epiteliāli blastematoza) nefroblastoma, bet histoloģiskā atradne un imūnohistoķīmiski konstatētā pozitīvā reakcija CKAE1/AE3 un WT1 antigēna, kā arī negatīvā reakcija EMA un vimentīna antigēna noteikšanai vairāk atbilda metanefrītiskā adenomas imūnfenotipam [Pins et al., 1999; Paner et al., 2005; Muir et al., 2001]. Mūsu gadījumā diferenciālajā diagnostikā galvenā nozīme bija Ki67 proliferācijas indeksa noteikšanai, jo vairumā aprakstīto metanefrītisko adenomu PI ir zems. Daļā gadījumu tas ir zemāks par 1%, dažreiz var sasniegt 5% līmeni [Paner et al., 2005; Kokashi et al., 2009]. Pētītajā veidojumā Ki67 proliferācijas indeksa lielums bija 18, 44%, līdz ar to apstiprināta iepriekš esošā nefroblastomas diagnoze. Tomēr arī minētais gadījums atklāj problēmas WT1 proteīna imūnhistoķīmiskās noteikšanas praktiskā pielietojuma shēmās, jo redzams, ka nepieciešama WT1 proteīna kombinācija ar citiem imūnhistoķīmiskajiem marķieriem, šajā gadījumā Ki67.

Analizējot gadījumus, kad atkārtotās imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas gaitā tika izmainīta esošā histoloģiskā diagnoze, redzams, ka kopumā diagnostiskās neprecizitātes atrastas 2 gadījumos jeb 4,08% no visiem izmeklētajiem audzējiem. Lai arī skaits ir neliels, šie rezultāti arī izgaismo dažas problēmas, kuras būtu jārisina praktiski strādājošiem bērnu patologi. Kā jau iepriekš teikts, parasti nefroblastoma ir audzējs ar raksturīgu histoloģisko uzbūvi, kas sastāv no variablās proporcijās izvietotas blastematozā, epiteliālā un stromālā komponenta, bet ir iespējami gadījumi kad to veido tikai viens vai divi histoloģiskie komponenti. Diagnostiskās problēmas parasti rada

diferenciālā diagnoze starp blastemāla tipa nefroblastomu un citiem bērnu vecuma „sīko, zilo, apaļo šūnu” audzējiem kā neuroblastoma, PNET, renāla limfoma, kā arī jau šajā nodaļā iepriekš aprakstītās grūtības savstarpēji diferencējot nefroblastomu, nieru gaišo šūnu sarkomu un nieru rabdoīdu audzēju. [Sebire, 2010]. Esošajā pētījumā imūnhistoķīmiskajā izmeklēšanā tika konstatēts neuroblastomai atbilstošs imunofenotips vienā no sākotnēji diagnosticētās blastemāla tipa nefroblastomas gadījumiem. Lai gan šis materiāls tika analizēts retrospektīvi, papildus tam pētījuma gaitā tika saņemts arī materiāls no šī audzēja recidīva audiem, kurā arī atrasta neuroblastomai atbilstoša morfoloģiskā un imūnhistoķīmiskā aina. Saskaņā ar literatūras datiem precīzas diagnozes noteikšanai būtu pielietojamas plašas imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas shēmas, kuras iekļauj WT1 proteīna, neuroendokrīno un epiteliālo marķieru, kā arī LCA un CD99 antigēnu noteikšanu. Renālas neuroblastomas gadījumā galvenā nozīme ir WT1 proteīna negativitātei, kombinācijā ar variablu neuroendokrīno marķieru kā NSE, sinaptofizīns un hromogranīns pozitivitāti [Coffin et al., 2006; Sebire, 2010]. Sarežģīts ir jautājums par intrarenālas primāras neuroblastomas sastopamību kopumā. Veiktā pētījumā sākotnējā etapā no apkopotā materiāla tika apzināti izslēgti visi diagnosticēto neuroblastomu gadījumi (sk. nodaļu 2.1), jo tika konstatēts, ka šāda tipa retrospektīvā pētījumā praktiski nav iespējams precīzi noskaidrot vai pētītais veidojums ir primāri radies nierēs vai ieaudzis tajās no retroperitoneālās telpas. Arī šajā atkārtotas imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas gaitā atklātā neuroblastomas gadījumā, jautājums par veidojuma ģenēzi ir diskutabls. Lai gan pašlaik klīniski veidojums tiek traktēts kā primārs nierēs audzējs, pirmreizēji izdarītajā CT izmeklēšanā pastāv aizdomas par retroperitoneālu audzēju ar ieaugšanu nierē. Pamatojoties uz operējošā ķirurga un materiāla izgriešanu izdarījušā patologa viedokli audzējs nav izslēgts no kopējo primāro nieru audzēja spektra, lai gan nav pilnīgas pārliecības par tā izcelsmi. Galīgajos rezultātos arī redzams, ka pēc atkārtotās imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas izveidotajā primāro nieru audzēju spektrā neuroblastoma veido 2,04%, bet literatūrā aprakstīti tikai atsevišķi primāras intrarenālas neuroblastomas gadījumi [Sellaturay et al., 2006]. Iespējams gan, ka minētā atšķirība saistās ar nelielo kopējo gadījumu skaitu, kas var radīt statistiskas nobīdes.

Otrs gadījums, kurā tika precizēts BKUS Bērnu Patoloģijas birojā izdarītās morfoloģiskās izmeklēšanas slēdziens attiecas uz embrionālu rabdomiosarkomu. Pēc literatūras datiem, primāras nieru rabdomiosarkomas gadījumi ir ļoti reti. Atsevišķos apskatos ir atrasti tikai astoņi publicēti gadījumi [Grignon et al., 1998]. Lielākā daļa no nieru audzējiem, kuri gaismas mikroskopijā rada iespaidu par rabdomiomatozu ģenēzi, parasti ir citas izcelsmes jaunveidojumi [Eble et al., 2007]. Mūsu gadījumā detalizēta imūnhistoķīmiskā izmeklēšana parādīja vimentīna pozitivitāti, kamēr reakcijas muskulāro marķieru MyoD1, muskuļu specifiskā aktīna, desmīna, miogenīna un mioglobīna, WT1 proteīna and bcl-2 noteikšanai bija negatīvas. Minētais imunofenotips un klīniskā iedzimta audzēja anamnēze 25 dienas vecai pacientei ir vairāk atbilstošs cellulārai mezoblastiskai nefromai jeb infantilai intrarenālai fibrosarkomai [Argani et al., 2004]. Pētījuma galīgajos rezultātos veidojums ierindots mezoblastisko nefromu grupā, taču diskusiju avots varētu būt konstatētā augstā proliferatīvā aktivitāte. Proliferācijas indekss bija 44,44% salīdzinoši ar literatūrā

apraņstīto 20% -15% atradni. [Whittle et al., 2010], kura arī izskaidro patologa izvēli noteikt augstas malignitātes pakāpes audzēja diagnozi primārās morfoloģiskās izmeklēšanas laikā. Pēc būtības precīzākai veidojuma ģenēzes noteikšanai būtu nepieciešama citoģenētiska izmeklēšana CMN raksturīgās translokācijas (12;15) (p13;q25) un ETV6-NTRK3 gēna saplūšanas diagnostikai, kas pašlaik netiek veikta Latvijā. Precīza diagnoze šajā gadījumā ir būtiska adekvātas terapijas izvēlē, jo CMN gadījumā ķīmijterapija tiek rekomendēta tikai tad, ja pacients ir vecāks par 3 mēnešiem vai arī ir konstatēta audzēja invāzija rezekcijas līnijās, plīsums operācijas laikā vai invāzija sīkajos asinsvados [Ahmed et al., 2007]. Tādēļ šādos gadījumos konsultācijai būtu jāmeklē sadarbības iespējas ar kolēģiem bērnu vecuma nieru audzēju izpētes grupās. Konkrētajā gadījumā paciente ir saņēmusi ķīmijterapijas kursu atbilstoši mezenhimāla ļaundabīga audzēja diagnozei. No praktiskā viedokļa apskatītais gadījums rāda, ka turpmāk nepieciešams kritiski izvērtēt mezenhimālas ģenēzes primāru nieru audzēju diagnozes bērnu vecumā un pielietot izmeklēšanā plašas muskulāro marķieru imūnohistoķīmiskās izmeklēšanas shēmas ņemot vērā arī celullāras mezoblastiskās nefromas eksistenci.

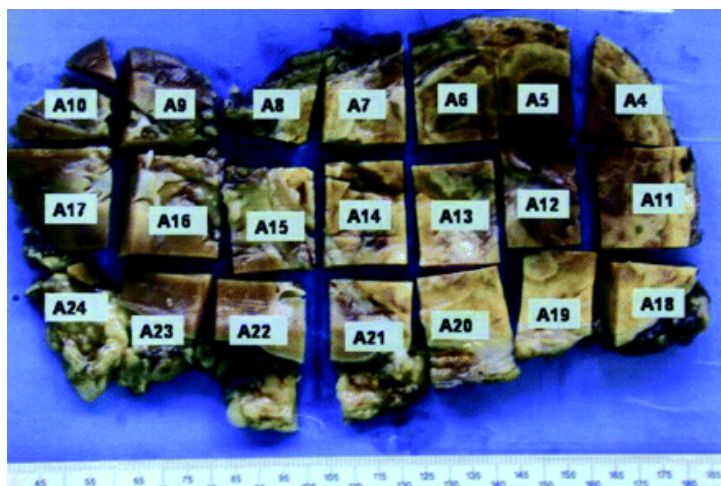
4.2. Imūnohistoķīmiskās un molekulāri ģenētiskās atradnes saistība ar klīniski morfoloģiskajiem datiem nefroblastomas gadījumā

4.2.1. Analizētā materiāla un pielietotās metodikas izvērtējums

Pārskatot pētījuma rezultātus potenciāli prognostisko nozīmīgo imūnohistoķīmisko marķieru ekspresijas un CDKN2A/p16^{INK4a} gēna izmaiņu gadījumā pētīto nefroblastomu grupā, pārdomas rada vairāki diskusijas rosinoši fakti. Pirmkārt, jāatzīst, ka pētītais materiāls pēc savas struktūras ir ļoti heterogēns un pastāv jautājums par adekvātas iegūto datu statistiskās analīzes metodēm, jo veidojumu histoloģiskā uzbūve ir variabla. Kā jau iepriekš minēts, histoloģiski nefroblastomai ir raksturīga trifāziska uzbūve, kad veidojums sastāv no trim komponentiem- blastēmas šūnām, epitēlija un stromas, kas pārstāvētas dažādās proporcijās, bet ir iespējama arī bifāziska vai monofāziska uzbūve. Šajā gadījumā audzēju veido tikai no divi vai viens no histoloģiskajiem komponentiem [Perlman et al., 2004]. Atbilstoši SIOP 2001. gada kritērijiem, par stromāla vai epitēliāla tipa nefroblastomu tiek saukti audzēji, kuros epitēliālais vai stromālais komponents veido vairāk par 66% procentiem no to struktūras, taču ir iespējama līdz pat 10% liela blastematozā komponenta klātbūtne [Vujanic et al., 2010]. Līdz ar to arī pētījumā analizētajos gadījumos bija iespējama blastematozā komponenta klātbūtne epitēliāla tipa nefroblastomu audos. Tajā pašā laikā ir iespējama arī monofāziska vai bifāziska audzēja uzbūve, kad veidojums sastāv tikai no diviem vai viena histoloģiskajiem komponentiem, kā to var redzēt arī pētīto audzēju gadījumā. Piemēram, bija sastopamas epitēliāla tipa nefroblastomas, kurās praktiski nav blastematozā komponenta. Daļā no mūsu analizētajiem gadījumiem, kāds no histoloģiskajiem komponentiem nebija atrodams arī ķīmijterapijas inducētu izmaiņu dēļ. Iespējams, ka minētā atradne būtu bijusi labāk izvērtējama, ja pētījumā būtu

iespējams izmantot audu mikročipus (angļu val. tissue microarray) kā to dara daļa zinātnieku [Natrajan et al., 2008]. Tādā gadījumā ir iespēja apkopot vienā audu blokā un analizēt arī ļoti sīku histoloģisko komponentu fragmentus. Statistiskajā analizē vidējo mainīgo aprēķināšanai izmantoti tikai dati, kas iegūti izmeklējot tos audzējus, kuros attiecīgais histoloģiskais komponents bija pietiekošā daudzumā. Lai datu salīdzināšanu padarītu maksimāli objektīvāku un, sekojot arī pēdējā laika nefroblastomas pētniecībā konstatētajām zinātnisko pētījumu tendencēm, iespēju robežās daļa imūnhistoķīmisko marķieru (CD44s, Ki67, p16^{INK4a}, p53) analizēti un savstarpēji salīdzināti katrā histoloģiskajā komponentā atsevišķi. Ņemot vērā izmeklētā materiāla heterogēno raksturu pielietotas tikai neparametriskās datu statistiskās apstrādes metodes. Runājot par materiāla heterogenitāti gan jāatzīmē fakts, ka nevienā no primārā audzēja gadījumiem netika konstatēta anaplāzija. Līdz ar to visi iegūtie rezultāti attiecas tikai uz labvēlīgas histoloģiskās ainas nefroblastomu grupu. Jāsaka, ka arī grūti salīdzināt iegūto rezultātu ar literatūras datiem, jo lielākā daļa pētnieku arī izmanto salīdzinoši nelielas, bet pēc struktūras heterogēnas grupas un izmanto dažādas imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitātes izmeklēšanas metodikas. Tādēļ domājams, ka objektīvu rezultātu varētu iegūt tad, ja tiktu vairāk standartizēta esošās izmeklēšanas kārtība. Pētījumā analizēta arī imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija mirušo pacientu grupā, bet nav noteikta reakcijas saistība ar pacientu dzīvildzi, jo pacientu skaits bija neliels un dzīvildze pēc diagnozes noteikšanas bija mazāka par diviem gadiem. Arī citu pētnieku pēdējos gados veiktajās publikācijās atzīmēts mazs mirušo skaits, kas saistīts ar veiksmīgi pielietoto ķīmijterapiju nefroblastomas ārstēšanā, bet padara neiespējamu dzīvildzes analīzi [Verschuur et al., 2010]. Iespējams arī, ka analizējot pacienta dzīvildzi būtu sīkāk jāiedziļinās pacientu slimības vēsturēs un jāizslēdz ar audzēja agresivitāti nesaistīti nāves iemesli. Šajā darbā analizējot klīniskos datus noskaidrojās, ka no primāro nierēs audzēju spektrā iekļautajiem četriem letālajiem gadījumiem vienā gadījumā audzēja diagnoze noteikta novēloti, operācijas laikā atrasta audzēja ruptūra ar sekojošu disemināciju, otrā gadījumā konstatētas letāla asiņošana operācijas laikā asinsvadu bojājuma dēļ, bet trešajā audzējs diagnosticēts novēloti un attīstījušās kardiālas komplikācijas. Līdz ar to arī imūnhistoķīmiski analizējot prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresiju nefroblastomu gadījumā, tikai vienam no pacientiem nāve varētu būt saistīta ar paša audzēja malignitātes potenciāla pieaugumu.

Nākošais jautājums saistīts ar adekvātu nefroblastomas histoloģisko tipu noteikšanu. Tā kā materiāls savākts izmantojot ilgstošā laika posmā diagnosticētus audzējus, šajā laikā ir notikušas arī izmaiņas to klasifikācijā. Tajā parādījies arī tāds tips kā regresīva tipa nefroblastoma. Daļa pētītā materiāla iegūta retrospektīvas analīzes ceļā izmantojot arhīvā saglabāto materiālu, bet daļa pētījuma laikā veicot arī nierēs audzēja, makroskopisko apskati un izgriešanu. Kā redzams pēc pēdējiem SIOP izstrādātajiem kritērijiem nefroblastomas histoloģisko tipu noteikšanai [Vujanic et al., 2002] apstākļos, kad vairums pacientu pirms operācijas periodā saņem ķīmijterapiju, pirmais uzdevums ir novērtēt tās izraisīto izmaiņu plašumu un atdalīt regresīva tipa un pilnībā nekrotizētu nefroblastomu no pārējiem histoloģiskajiem tipiem. Tas būtībā prasa pilnīgu visa audzēja materiāla izgriešanu un sekojošu histoloģisku izmeklēšanu (sk. 4.1.att.), kas arī pašlaik tiek rekomendēts literatūrā [Vujanic et al., 2010].



4.1.att. Rekomendējamā nefroblastomas izgriešanas shēma (Vujanic et al., 2010).

Retrospektīvi analizētajā materiālā nebija iespējams adekvāts makroskopiskā materiāla pārskats, jo tas pārsvarā nebija saglabāts. Tāpēc daļā gadījumu tips noteikts vadoties tikai no parafīna blokos saglabāto audu histoloģiskās uzbūves. Šis apstāklis pētījumā visvairāk varētu ietekmēt regresīva tipa nefroblastomas diagnostiku. Pēc veiktā preparātu pārskata regresīva tipa nefroblastomas daudzums pieauga no 3 līdz 5 jeb no 7,89% līdz 13,51% no kopējā skaita. Minētās izmaiņas analizētajā spektrā formāli nav pamatotas, jo nebija pieejams viss audzēja materiāls ķīmijterapijas izraisīto izmaiņu novērtēšanai. Tajā pašā laikā nebija pamatoti klasificēt šos audžus savādāk, jo materiālā prevalēja tādas ķīmijterapijas izraisītas izmaiņas kā fibroze, makrofāgu un hemosiderofāgu infiltrācija. Tomēr šis apstāklis jāņem vērā traktējot prognostiski nozīmīgo imūnhistoķīmisko marķieru reaktivitāti regresīva tipa nefroblastomas audos.

Pēdējais diskusijas temats šajā sadaļā varētu būt imūnhistoķīmisko marķieru reaktivitātes noteikšanas metodika. Daļā gadījumu imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija noteikta atsevišķi katrā histoloģiskajā komponentā, jo šādi bija iespējams nodrošināt adekvātāku imūnhistoķīmisko marķieru reaktivitātes salīdzinājumu un arī salīdzināt iegūtos atradni ar literatūras datiem. Pie tam atsevišķos gadījumos, reakcijas izvērtējums neatkarīgi no histoloģiskā komponenta redzes laukos ar vislielāko reakcijas intensitāti, var radīt neinterpretējamu rezultātu. Piemēram, CD44s ekspresija gan primāru, gan metastātisku nefroblastomu gadījumā visaugstākā bija stromālajā komponentā, kas ir saprotams, jo CD44s tiek ekspresēts fibroblastos [Dalchau et al, 1989]. Līdz ar to reakcijas intensitātes izvērtējums redzes laukos ar visaugstāko intensitāti automātiski nozīmētu stromālā komponenta izmeklēšanu atstājot bez ievērības malignitātes pakāpes noteikšanā nozīmīgā blastematozā komponenta izmeklēšanu. Runājot par CD44s ekspresijas analīzi jāsaprot, ka pretēji pētījumos pieņemtajai praksei arī epiteliālajā komponentā noteikt CD44s pozitīvo šūnu skaitu [Ghanem et al., 2002; Ghanem et al., 2011; Taran et al., 2008] šajā darbā noteicām pozitīvo epiteliālo struktūru skaitu. Minētā izvēle saistīta ar pētījuma starpzinātniskiem, jo tika konstatēts pozitīvas imūnhistoķīmiskās reakcijas fokālais raksturs, kas visvairāk izteikts nefroblastomu epiteliālajā komponentā. Izvērtējot audzēju epiteliālo daļu nereti izveidojās situācija, kad vienā redzes laukā bija vairākas CD44s pozitīvas struktūras.

Tas radīja augstu ekspresijas procentu, kamēr citos redzes laukos reakcija bija pilnībā negatīva. Līdz ar to tika novērotas ļoti lielas CD44s ekspresijas intensitātes svārstības epiteliālajās struktūrās. Piemēram, primāro audzēju grupā CD44s pozitīvo šūnu daudzums epiteliālajā komponentā atradās robežās no 0,00% līdz 96,6% ar vidējo lielumu 17,04%, standartnovirzi 24,71% [Frankeviča u.c., 2012]. Tāpēc kā optimālāka metode tika izvēlēta CD44s pozitīvo tubulāro vai glomerulāro struktūru skaita noteikšana un sekojoša skaita salīdzināšana vienā redzes laukā. Līdzīgu apsvērumu dēļ izvērtējot arī e-kadherīna ekspresiju tika noteikts pozitīvo struktūru skaits redzes laukā, bet neatkarīgi no histoloģiskā komponenta. Tā kā e-kadherīns pēc savas būtības ir epiteliālo šūnu marķieris [Gumbiner et al., 1986], nebija nepieciešamības noteikt tā ekspresiju stromālajā komponentā. Atsevišķi blastematozajā un epiteliālajā komponentā šīs imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitāte netika noteikta, jo pastāv grūtības diferencēt blastematozu komponentu no ļoti primitīva epiteliāla komponenta un izdarītā izmeklējuma mērķis nebija noteikt nobriedušo epiteliālo struktūru skaitu kā CKAE1/AE3 noteikšanas gadījumā.

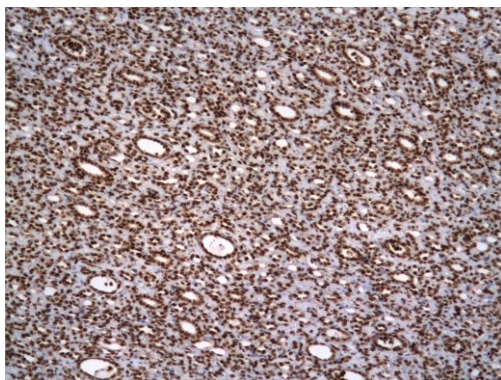
4.2.2. Potenciāli prognostiski nozīmīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas novērtējums

Apkopojot šī darba rezultātu sadaļā sniegtos datus redzams, ka primāro audzēju grupā ir atrasta būtiski pazemināta CD44s ekspresija epiteliāla tipa nefroblastomu epiteliālajā komponentā ($p=0,043$) salīdzinot ar minētā marķiera ekspresiju šajā histoloģiskajā komponentā citu tipu audzējos. Tajā pašā laikā atrasta statistiski būtiska pozitīva saistība starp CD44s ekspresiju epiteliālajā komponentā un CKAE1/AE3 ($p=0,02$) un e-kadherīna pozitīvo struktūru skaitu ($p=0,019$). Minēto atradni var izskaidrot ar faktu, ka augsts CKAE1/AE3 un e-kadherīna pozitīvo struktūru skaits sastopams arī regresīva tipa nefroblastomās un maksimālais CD44s pozitīvo struktūru skaits- 44 bija atrodams tieši regresīva tipa audzēja gadījumā. Savukārt jauktā tipa audzējos konstatēta būtiski paaugstināta CD44s ekspresija stromālajā komponentā ($p=0,027$) salīdzinot ar citu histoloģisko tipu nefroblastomām. Tomēr, ņemot vērā faktu, ka CD44s normā tiek ekspresēts fibroblastos un šīs reakcijas noteikšana stromā prezentētajā darbā drīzāk kalpo tam lai atdalītu tās reaktivitāti no imūnhistoķīmiskās reakcijas epiteliālajā un blastematozajā komponentā, uzskatāms, ka šai atradnei nav būtiskas ietekmes. Tāpat jādomā, ka būtiskas prognostiskas nozīmes nav konstatētajai CD44s stromālās ekspresijas pozitīvajai saistībai ar p16^{INK4a} proteīna imūnhistoķīmisko reaktivitāti blastematozajā un stromālajā komponentā ($p=0,015$ un $p=0,031$), vēl jo vairāk tāpēc, ka pozitīva p16^{INK4a} ekspresija izmantojot p16^{INK4a} klonu 2D9A12 uzskatāma par normu. Būtiska zinātniska nozīme prognostiski svarīgo marķieru pētniecībā varētu būt arī konstatētajai pozitīvajai saistībai starp p53 un CD44s ekspresiju visu primāro audzēju blastematozajā komponentā ($p=0,007$), jo ir pierādīta augstas p53 ekspresijas prognostiski sliktā nozīme nefroblastomas gadījumā, kas gan vairāk attiecas uz audzējiem ar nelabvēlīgu histoloģisko ainu. Tā piemēram ir aprakstīta izteikta p53 ekspresija anaplastiskās nefroblastomās salīdzinot ar labvēlīgas histoloģiskās ainas gadījumā novēroto ($p<0,001$) un būtiski samazināta dzīvildzi p53 pozitīvo

pacientu grupā salīdzinot ar negatīvajiem gadījumiem ($p < 0,01$) [Jadali et al., 2011]. Salīdzinot iegūtos rezultātus ar publikācijās pieejamo informāciju, redzams, ka literatūras dati attiecībā uz CD44s ekspresiju nefroblastomas gadījumā ir pretrunīgi. Vienā no pētījumiem konstatēta CD44s ekspresijas paaugstināšanās epiteliālajās šūnās paaugstinoties audzēja stadijai un minētā marķiera blastematozās reaktivitātes pozitīvā saistība ar audzēja stadiju [Ghanem et al., 2002]. Savukārt, pētot pirms operācijas periodā neārstētus pacientus, šī pati autoru grupa nav atradusi saistību starp CD44s ekspresiju un nefroblastomas stadiju vai klīnisko gaitu [Ghanem et al., 2011]. Citi zinātnieki apraksta pozitīvu minētā marķiera imunoreaktivitātes saistību ar audzēja histoloģisko tipu un riska pakāpi neatkarīgi no tā vai pirms operācijas ir vai nav bijusi pielietota ķīmijterapija [Taran et al., 2008]. Lai gan prezentētajā pētījumā netika atklātas būtiskas CD44s ekspresijas atšķirības atkarībā no nefroblastomas stadijas, histoloģiskā riska pakāpes vai audzēja progresijas un reakcijas intensitāte būtiski neatšķīrās izdzīvojušo un mirušo pacientu grupās, tomēr konstatētā pozitīvā saistībai starp p53 un CD44s ekspresiju primāro audzēju blastematozajā komponentā varētu liecināt par šī marķiera imunoreaktivitātes noteikšanas blastematozajā komponentā prognostisko nozīmi, kas būtu vēl jāapstiprina turpmākajos pētījumos. Pārējie rezultāti saistās ar CD44s ekspresijas izmaiņām atkarībā no audzēja histoloģiskā tipa. Konstatētā pazeminātā CD44s ekspresija epiteliāla tipa nefroblastomu epiteliālajā daļā iespējams vairāk atspoguļo nevis paša CD44s antigēna noteikšanas prognostisko nozīmi, bet gan iespējami zemāko epiteliāla tipa nefroblastomas malignitātes pakāpi.

p16^{INK4a} proteīna imūnhistoķīmiskās ekspresijas izvērtēšanā būtiska ir veiktās reakcijas interpretācija. Literatūrā aprakstīti dažādi iespējamie p16^{INK4a} ekspresijas varianti normālos audos, kuri ir atkarīgi no izmantotās antivielas klona. Lielākā daļa autoru konstatējuši, ka reakcijas intensitāte audzēja neskartajos audos ir ļoti zema vai vispār nav nosakāma un tas atbilst normālajam bazālajam p16^{INK4a} proteīna līmenim. Pašlaik daļā pētījumu un klīniskajā praksē tas ir pieņemts kā imūnhistoķīmiskās reakcijas izvērtēšanas standarts [Yao et al., 1998; Schrami et al., 2001; Natrajan et al., 2008; Zhao et al., 2012]. Atbilstoši Ziemeļvalstu patoloģijas laboratorijas apvienojošās zinātniskās organizācijas NordiQC imūnhistoķīmiskās kvalitātes kontroles protokolam (Nordic immunohistochemical quality control) pašlaik klīniskajā praksē visbiežāk izmantotais p16^{INK4a} proteīna klons ir E6H4, bet rekomendētā reakcijas kontrole izdarāma mandeļu audos. Šajā gadījumā pozitīva reakcija tiek novērota folikulāro dendrītisko šūnu kodolos un citoplazmā, kamēr vairošanās centru B šūnas ir pilnībā negatīvas. Arī nefroblastomas gadījumā izdarītajos pētījumos daļa autoru izmanto antivielas, kuru imūnhistoķīmiskās reaktivitātes intensitāte normālajos audos ir zema. Tā Natrajans un autori savos pētījumos izmanto p16^{INK4a} klonu 6H12, (Novocastra, Ņūkāstla, Anglija) par pozitīvo kontroli izmantojot reakciju neizmainīta aizkuņģa dziedzera saliņu šūnās. Šajā pētījumā pozitīva p16^{INK4a} proteīna ekspresija konstatēta tikai 16,1% ne-anaplastiskas nefroblastomas gadījumu. Darba autori uzskata, ka minētā atradne drīzāk atspoguļo normālu fizioloģisku stāvokli, nevis samazinātu imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitāti [Natrajan et al., 2008]. Prezentētajā pētījumā p16^{INK4a} proteīna noteikšanai izmantots klons 2D9A12 (Abcam, Kembridža, Masačūsetas štats, ASV). Par pozitīvo kontroli atbilstoši ražotāju instrukcijai, pielietot

pozitīvu kontroli normālos cilvēka galvas smadzeņu audos vai galvas smadzeņu audzējos, tika izmantota pozitīva ārēja kontrole galvas smadzeņu astrocitomas gadījumā (sk. nodaļu 2.2.2.). Izdarītās kontroles reakcijas rezultāti, papildus konstatētā p16^{INK4a} proteīna ekspresija audzēja neskartās nierēs kanāliņu epitēlija šūnu kodolos (sk. 4.2.att.) un literatūras dati par samazinātu minētās antivielas klona ekspresiju tajos galvas smadzeņu audzēju gadījumos, kad konstatēta CDKNDA/p16^{INK4a} alēles zudums, bet pozitīvu ekspresiju neizmainītos smadzeņu audos [Royds et al., 2011] liecina, ka šajā gadījumā par normālu fizioloģisku stāvokli būtu uzskatāma pozitīva kodolu reakcija.



4.2.att. Pozitīva p16^{INK4a} proteīna ekspresija audzēja neizmainītas nierēs distālo kanāliņu epitēlija šūnu kodolos, palielinājums x100.

Pētījuma dati ir arī atbilstoši atsevišķās publikācijās atspoguļotajai p16^{INK4a} proteīna imūnhistoķīmiskajai ekspresijai neizmainītos cilvēka nierēs audos [Basta-Jovanović et al., 2008]. Analizējot izdarītās imūnhistoķīmiskās reakcijas rezultātus redzams, ka kopumā ekspresija vērtējama kā augsta (sk. nodaļu 3.2.3), kas šajā gadījumā atbilst normai. Netika atrasta p16^{INK4a} ekspresivitātes izmaiņas atkarībā no tādiem prognostiski svarīgiem kritērijiem kā audzēja stadija un histoloģiskā malignitātes pakāpe. Tāpat imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitāte būtiski neizmainījās atkarībā no pirms operācijas periodā izdarītās ķīmijterapijas un audzēja reakcijas uz ķīmijterapiju. Nebija atšķirību izdzīvojušo un mirušo pacientu grupās, ka arī nebija statistiski būtiska paaugstināta vai pazemināta p16^{INK4a} ekspresija audzēja progresijas gadījumā. Līdz ar to pētījuma rezultāti liecina, ka visdrīzāk p16^{INK4a} ekspresijai nav prognostiskas nozīmes nefroblastomu gadījumā, kas atbilst Natrajana un autoru [Natrajan et al., 2008] veiktā pētījuma datiem, bet ir pretrunā ar Gordanas Bastas- Jovanovičas atrasto marķiera ekspresijas saistību ar audzēja stadijām [Basta- Jovanović et al., 2008]. Attiecībā uz p16^{INK4a} proteīna ekspresiju dažādās nefroblastomas histoloģiskajās grupās redzams, ka reakcijas intensitāte ir būtiski pazemināta blastematoza tipa audzēju stromālajā un epiteliālajā komponentā, salīdzinot ar pārējiem histoloģiskajiem tipiem (p=0,007; p=0,03). Stromāla tipa audzējos stromālā komponenta reaktivitāte bija būtiski paaugstināta salīdzinot ar reakciju šajā pašā histoloģiskajā komponenta cita tipa audzējos (p=0,03). Savukārt salīdzinot jaukta tipa audzējus ar pārējiem veidojumiem atrod būtiski paaugstinātu p16^{INK4a} ekspresiju blastematozajā un epiteliālajā komponentā (p=0,003; p=0,024). Grūti saprast vai minētajām sakarībām ir kāda ietekme uz pacienta prognozi. Iespējams, ka tās atspoguļo izteiktāku reakcijas intensitāti katra

audzēja tipa prevalējošā komponentā, kas varētu liecināt par histoloģiskā tipa nevis konkrēta marķiera ekspresijas ietekmi uz prognozi. Citu autoru darbos [Basta-Jovanović et al., 2008] atrastā statistiski būtiskā paaugstinātā p16^{INK4a} ekspresija blastemāla tipa audzējos, kas varētu liecināt par saistību ar augstāku malignitātes pakāpi, netika atrasta. Interesanti, ka arī šajā gadījumā, tāpat kā analizējot CD44s ekspresiju, ir atrasta pozitīva saistība starp p16^{INK4a} un p53 ekspresiju primāro audzēju blastematozajā komponentā ($p=0,029$), taču šim faktam varētu nebūt klīniskas nozīmes, jo augsta p16^{INK4a} proteīna ekspresija uzskatāma par fizioloģisku. P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzumam epiteliālajā komponentē bija negatīva saistība ar WT1 ekspresiju ($p=0,02$), taču interpretējot šo faktu būtu jāņem vērā, ka WT1 proteīns imūnhistoķīmiski noteikts neatkarīgi no histoloģiskajiem tipiem blastematozajā un primitīvā epiteliālajā komponentā, tādēļ tā ekspresija varētu būt samazināta audzējos ar izteiktu epiteliālu komponentu.

Pētot tāda citu audzēju gadījumā plaši pielietota un prognostiski svarīga marķiera kā Ki67 ekspresiju netika konstatēta būtiska atšķirība starp šī marķiera imunoreaktivitāti nevienā no pētītajām primāro audzēju grupām. Tāpat Ki67 ekspresija nebija paaugstināta metastātiskajiem veidojumiem. Arī pielietojot Spīrmēna neparametrisko korelāciju analīzi vienīgā pozitīvā saistība atrasta tikai starp p53 un Ki67 pozitīvo šūnu daudzumu primāro audzēju stromālajā komponentā ($p=0,001$), kā arī starp e-kadherīna pozitīvo struktūru skaitu un proliferācijas indeksu stromālajā komponentā ($p=0,024$), taču šai atradnei iespējams nav būtiskas prognostiskas nozīmes. Vidējais ar Ki67 palīdzību noteiktais proliferācijas indekss primāro nefroblastomu stromālajā komponentā gan ir 13,67% (diapazons 1,12%-37,66%; SD 10,31), kas gan ir augstāks nekā audzēja neskartajā nierē konstatētais 1% līdz 3% lielais PI [Ghanem et al., 2004], taču vidējais p53 pozitīvo šūnu skaits primāro audzēju gadījumā stromālajā komponentā bija 1,74% (diapazons 0%-12,77 %; SD 2,73). Pēc būtības p53 ekspresija stromālajā komponentā ir praktiski negatīva, vairumā publikāciju p53 pozitīvo šūnu daudzums mazāks par 5% tiek uzskatīts par negatīvu rezultātu [Govender et al., 1998], līdz ar to konstatēto sakarību klīniski nevar uzskatīt par nozīmīgu. Literatūras dati attiecībā uz Ki67 ekspresijas prognostisko nozīmi nefroblastomas gadījumā ir ārkārtīgi pretrunīgi. Pie tam dati ir grūti salīdzināmi, jo dažādi pētnieki analizē iegūto rezultātu dažādās histoloģiskajās komponentēs vairākās grupās atkarībā no izdarītās ķīmijterapijas, histoloģiskās malignitātes pakāpes vai citiem klīniskajiem rādītājiem. Daļā no pētījumiem atspoguļotie rezultāti liecina par iespējamo Ki67/MIB-1 noteikšanas prognostisko nozīmi. Tā pirms operācijas ķīmijterapeitiski ārstēto pacientu grupā epiteliālā, gan blastematozajā komponentā konstatētā paaugstinātā MIB1 ekspresija saistījās ar sliktu pacientu prognozi [Juszkiewicz et al., 1997], līdzīgi citā pētījumā publicēti dati par MIB-1 pozitīvo šūnu daudzuma blastematozajā komponentā ietekmi uz pacienta dzīvildzi, kamēr epiteliāla komponenta reaktivitātei nebija nozīmes [Ghanem et al., 2004]. Analizējot primārās nefrektomijas gadījumus vienfaktora dispersijas analīzē parādījās blastematozā MIB-1 saistība ar progresējošu slimības gaitu, bet Koksa regresijas analīzē netika atrasta saistība starp šo parametru un klīniskajiem rādītājiem [Ghanem et al., 2011]. Citā pētījumā noteikts metastāzes prognozējošais kritiskais Ki67 lielums blastematozajā komponentā vidējas malignitātes audzēju

gadījumā [Berrebi et al., 2008]. Tomēr citi zinātnieki izdarījuši secinājumu, ka Ki67 imūnhistoķīmisko noteikšana nedod būtisku ieguldījumu pirmsoperācijas periodā ārstētu nefroblastomu iespējamās prognozes izvērtēšanā [Jurić et al., 2010] un šī imūnhistoķīmiskā marķiera noteikšana prognostiskos nolūkos nav ieviesta klīniskajā praksē. Pašlaik prezentētā pētījuma rezultāti vairāk liecina par to, ka Ki67 ekspresijas noteikšana prognozes noteikšanai nav pamatota. Taču jāņem vērā fakts, ka visi pašreizējie rezultāti attiecas tikai uz labvēlīga histoloģiskā tipa nefroblastomām, kuras pārstāvētas pētītajā grupā.

Atšķirībā no iepriekš aprakstītajiem marķieriem, p53 imunoreaktivitātes nozīme nefroblastomas gadījumā ir labi izpētīta. Kopumā lielākā daļa zinātnieku atzīmē p53 ekspresijas saistību ar audzēja anaplāzijas pakāpi un sliktāku prognozi. Tiesa gan aprakstītā atradne vairāk attiecas uz nefroblastomām ar nelabvēlīgu histoloģisko ainu. Konstatēts būtiski palielināts p53 pozitīvo šūnu daudzums nelabvēlīgas histoloģiskās ainas gadījumā ($p < 0,001$), bet analizējot pacientu dzīvildzi konstatēta būtiska atšķirība ($p = 0,0003$) starp pacientu grupām ar nelielu un augstu reakcijas intensitāti [Govender et al., 1998]. Citā publikācijā imūnhistoķīmiski analizējot p53 ekspresiju dažādās histoloģiskās ainas gadījumā atrasta būtisku atšķirību ($p = 0,001$) starp nefroblastomām ar labvēlīgu histoloģisko ainu vai kodolu atipiju (angļu val. nuclear unrest) un anaplastisku audzēju gadījumiem: respektīvi p53 pozitīvo šūnu skaits attiecīgajās grupās ir 8,3%, 4% un 76% [Hill et al., 2003]. Pašreiz prezentētajā promocijas darbā visi analizētie primārie nefroblastomas gadījumi piederēja pie labvēlīgas histoloģiskās ainas veidojumu grupas. Tāpēc būtībā pētījumā atrastais vidējais p53 pozitīvo šūnu skaits blastematozajā komponentā 9,71%, stromālajā komponentā 1,74% un epiteliālajā komponentā 6,35% nav pretrunā ar publikācijās atspoguļoto. Saskaņā ar literatūras datiem, šajā grupā p53 ekspresijai nav tik lielas nozīmes kā anaplastisku audzēju gadījumā. Tā piemēram atsevišķi pētot tikai labvēlīgas histoloģiskās ainas nefroblastomas primāri izdarītas nefrektomijas gadījumā netika konstatēta statistiski būtiska saistība starp p53 ekspresiju un audzēja stadiju ($p > 0,3$) vai pacienta prognozi ($p > 0,3$) [D'Angelo et al., 2003]. Tajā pašā laikā citi pētnieki neatrod p53 ekspresijas saistību ar audzēja anaplāzijas pakāpi, bet tā bija biežāka blastematoza tipa nefroblastomās salīdzinot ar stromāla un epiteliāla tipa audzējiem. Tāpat šajā darbā tika konstatēta saistība starp audzēja stadiju un p53 pozitīvo šūnu skaitu un retāka ($p = 0,038$) nefroblastomas metastāžu attīstību (5% no gadījumiem) zemas reakcijas intensitātes grupā salīdzinot ar augstas reakcijas intensitātes grupu (31% no gadījumiem) [Sredni et al., 2001]. Pašlaik prezentētā pētījuma rezultāti varētu liecināt par to, ka paaugstinātai p53 ekspresijai ir nozīme arī labvēlīgas histoloģiskās ainas gadījumā. Pētījumā atrasta statistiski būtiski paaugstināta reakcijas intensitāte blastematozajā komponentā metastāžu/recidīva grupā salīdzinot ar primārajiem audzējiem ($p = 0,03$). Protams, šajā gadījumā diskutabls ir jautājums vai rezultāts ir attiecināms uz labvēlīgas histoloģiskās ainas audzēju grupu, jo ne visu metastāžu gadījumā bija pieejams primārā audzēja materiāls anaplāzijas pakāpes noteikšanai. Salīdzinot p53 ekspresiju tajos gadījumos, kad ir pieejams gan primārā audzēja, gan metastāzes materiāls, redzams, ka ir atrodami augstas ekspresijas gadījumi metastāžu audos. Tomēr šajā gadījumā jāņem vērā arī audzēja histoloģiskās struktūras izmaiņām pieaugot procesa agresivitātei. Var redzēt, ka

vienā no primāro audzēju gadījumiem veidojums pieder pie epiteliālā tipa un tajā praktiski nav blastematozā komponenta. Minētajam pacientam blastematozā komponenta nav pirmās metastāzes audos, savukārt otrā metastāze sastāv pārsvarā no blastēmas šūnām. Vēl vienā no analizētajiem gadījumā primārajā audzējā praktiski nav blastēmas šūnu. Tās konstatētas tikai metastāzes audos. Attiecībā uz analizēto primāro audzēju grupu bija būtiski paaugstināta p53 ekspresija epiteliāla tipa veidojumu epiteliālajā komponentā ($p=0,02$) salīdzinot ar analogisku reakciju cita tipa veidojumu epiteliālajā komponentā. Konstatēta arī būtiski paaugstināta p53 ekspresija epiteliālajā komponentā audzēja progresijas gadījumā ($p=0,039$). Tas liek domāt, ka labvēlīgas histoloģiskās ainas gadījumā būtu jāpievērš uzmanība pozitīvai p53 ekspresijai konkrētā histoloģiskā tipa prevalējošā komponentā arī salīdzinoši zemas imūnhistoķīmiskās reakcijas līmeņa gadījumā. Vidējais p53 ekspresijas līmenis to primāro audzēju epiteliālajā komponentā, kuru gadījumā atrasta audzēja progresija bija 22,69%, kas parasti pētījumos arī tiek traktēta kā zema reakcijas intensitāte [Govender et al. 1998]. Savukārt tajos gadījumos, ka progresija nav atrasta vidējais p53 pozitīvo šūnu skaits bija 4,63%, ko var uzskatīt par negatīvu reakciju.

Pētot CKAE1/AE3 pozitīvo tubulāro struktūru skaitu dažādās analizēto nefroblastomu grupās atrod statistiski būtiski samazinātu imūnhistoķīmiski pozitīvo epiteliālo struktūru skaitu atkārtotā procesa gadījumā salīdzinot ar primārajām nefroblastomām ($p=0,005$). Tas arī ir saskaņā ar iepriekš aprakstītajām audzēja histoloģiskās struktūras izmaiņām pieaugot procesa agresivitātei, kad metastāzes audos samazinās epiteliālā komponenta, bet pieaug blastematozā komponenta īpatsvars salīdzinot ar primārā audzēja materiālu tam pašam pacientam. Atradne šajā gadījumā varētu liecināt par to, ka epiteliālais komponents ir mazāk agresīvs un tā kopumā nav pretrunā ar literatūras datiem par intensīvas epiteliālo struktūru veidošanās audzēja audos saistību ar labāku pacienta prognozi [Lawler et al., 1975; Lawler et al., 1977]. Tajā pašā laikā pētījumā iegūtie dati nav pilnīgi, lai apstiprinātu citu pētnieku izteikto domu par to, ka epiteliāla tipa nefroblastomas ir mazāk agresīvas un būtu atsevišķi izdalāmas no vidējas malignitātes pakāpes audzēju grupas [Verschuur et al., 2010], jo nav konstatēta tubulāro struktūru skaita būtiskas atšķirības izdzīvojušo un mirušo pacientu grupās, kā arī audzējiem ar un bez klīniski konstatētas audzēja progresijas. Tāpat atradne ir pretrunā ar paaugstināto p53 ekspresiju epiteliālo veidojumu epiteliālajā komponentā, kas varētu liecināt par sliktāku prognozi. Tomēr rezultāts ir pietiekoši nozīmīgs, lai turpinātu tālākos pētījumus, jo pašlaik pirms operācijas periodā neārstēto audzēju gadījumā, gan epiteliāla, gan blastematoza tipa nefroblastomas atrodas vidējas malignitātes pakāpes audzēju grupā. Konstatētajai pozitīvajai saistībai starp CKAE1/AE3 un e-kadherīna pozitīvo struktūru skaitu ($p=0$) nav zinātniskas nozīmes, jo CKAE1/AE3 un e-kadherīns ir epiteliālie marķieri. Drīzāk minētā atradne varētu kalpot par sava veida datu statistiskās analīzes iekšējo kontroli. Toties interese izraisa atrastā CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru paaugstināšanās regresīva tipa audzēju gadījumā ($p=0,015$) salīdzinot ar citiem tiptiem. Šī atradne izsauc zināmas šaubas, jo loģiski CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaitam visaugstākajam būtu bijis jābūt epiteliāla tipa nefroblastomu gadījumā. Šajā gadījumā jāatzīmē iepriekšējā nodaļā aprakstītā problēma regresīva tipa nefroblastomu materiāla izvērtēšanā, kad daļā gadījumu histoloģiskais tips noteikts

veicot pilnīgu materiāla izgriešanu, bet daļā veicot retrospektīvu preparātu pārskatu. Jāatzīmē, gan, ka regresīva tipa nefroblastomas ar augstu CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaitu (sk. 3.67.att.) atrastas tieši veicot materiāla izgriešanu pētījuma laikā. Šajā gadījumā vairāk nekā trešdaļā materiāla audzēja audi nebija saglabāti, bet atlikušajā novēroja intensīvu nobriedušu epiteliālo tubulāro struktūru veidošanos. Līdz ar to pastāv jautājums par tālāku regresīvā tipa audzēju pētniecību un nevar izslēgt, ka būtu sīkāk sadalāma pašlaik pastāvošā vidējas malignitātes nefroblastomu grupa atsevišķi izdalot regresīva tipa nefroblastomas. Runājot par konstatēto CD34 pozitīvo mikroasinsvadu skaita saistību ar epiteliālo struktūru skaitu ($p=0,004$), jāatzīmē, ka arī šajā gadījumā visaugstākais vidējais mikroasinsvadu skaits redzes laukā (174,5) atrasts regresīva tipa audzējos. Tam seko blastematozs tips ar 154,4 un epiteliāls ar 174,5 struktūrām. Minētā atradne varētu ietekmēt rezultātu un varētu liecināt par nepieciešamību turpināt regresīva tipa audzēju izpēti un epiteliālo struktūru skaita ietekmi uz rezultātu kopumā. Tajā pašā laikā atsevišķi pētot CD34 ekspresiju audzēju audos nav atrasta nekāda atšķirība ne starp analizētajām primāro audzēju grupām, ne arī salīdzinot primāros un metastātiskos audzējus. Minētais rezultāts neapstiprina literatūras datus par iespējamo mikroasinsvadu skaita ietekmi uz prognozi [Sköldenberg et al., 2001; Abramson et al., 2003]. Tas ir saskaņā ar to autoru pētījumu rezultātiem, kuri neapstiprina mikroasinsvadu skaita ietekmi uz prognozi vai saistību ar histoloģiskajiem tiem [Ghanem et al., 2011].

Pētot e-kadherīna ekspresiju atrasta statistiski būtiska atšķirība salīdzinot zemas un vidējas malignitātes pakāpes audzējus ar augstas malignitātes audzējiem ($p=0,049$), kas atbilst literatūrā aprakstītajai samazinātajai imūnhistoķīmiskai e-kadherīna ekspresijai augstas stadijas nefroblastomas gadījumā salīdzinot ar zemas stadijas veidojumiem [Safford et al., 2005]. Tāpat konstatēta publikācijās atspoguļotā [Alami et al., 2003] zemākā reakcijas intensitāte metastātisko audzēju audos salīdzinot ar primārajiem veidojumiem ($p=0,046$). Abas šīs atradnes gan varētu būt saistītas ar audzēja histoloģiskā tipa ietekmi uz rezultātu, jo starp augstas malignitātes audzējiem prevalē blastematoza tipa audzēji pēc pirmsoperācijas periodā izdarītas ķīmijterapijas. Tāpat metastātisko veidojumu gadījumā novēro blastematozā komponenta pieaugumu audzēja audos attiecībā uz citiem komponentiem. Tomēr interesanti ir tas, ka pazemināta e-kadherīna ekspresija primāro audzēju audos atrasta arī tajos gadījumos, kad novērota veidojuma progresija uz ķīmijterapijas fona ($p=0,05$). Šajā gadījumā starp primārajiem audzējiem bija arī epiteliāla tipa veidojumi ar augstu CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaitu. Tāpat nav konstatēta saistība starp kādu no histoloģiskajiem audzēja tiem t. skaitā epiteliālu un regresīvu. Aprakstītie rezultāti vairāk liek domāt, ka e-kadherīna imūnhistoķīmiskajai ekspresijai varētu būt no arī no histoloģiskā tipa neatkarīga prognostiska nozīme. Tomēr būtiskas reakcijas intensitātes izmaiņas netika konstatētas izdzīvojušo un mirušo pacientu grupās, kas atbilst citu autoru atspoguļotajai atradnei, kurā netika konstatēta saistība starp e-kadherīna imūnhistoķīmisko ekspresiju, nefroblastomas stadiju un pacienta dzīvildzi. Citētajā darbā, gan tika atrasta statistiski būtiski paaugstināta reakcijas intensitāte ($p=0,003$) pirms operācijas veiktās ķīmijterapijas gadījumā [Ramburan et al., 2006], kura netika konstatēta prezentētajā promocijas darbā.

WT1 proteīna ekspresijas analīzē netika konstatēta būtiskas imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitātes atšķirības atkarībā no audzēja stadijas, histoloģiskās malignitātes pakāpes vai tipa. Būtiskas ekspresijas izmaiņas netika konstatētas arī izdzīvojušo un mirušo pacientu grupās, ka arī gadījumos, kad konstatēta audzēja progresija. Minētā atradne neatbilda citu autoru atrastajai WT1 proteīna ekspresijas saistībai ar augstāku audzēja stadiju, progresējošu nefroblastomas gaitu un audzēja izraisītu nāvi, kura konstatēta pirmsoperācijas periodā ārstēto nefroblastomu gadījumā [Ghanem et al., 2000]. Lai gan jāsap, ka šī pati autoru grupa, izmeklējot pirms operācijas neārstētu vidējas malignitātes pakāpes audzēju audus, neatrod saistību starp WT1 proteīna ekspresiju kādā no histoloģiskajiem komponentiem un audzēja stadiju, tajā pašā laikā konstatējot blastematozā komponenta reaktivitātes saistību ar progresējošu nefroblastomas gaitu [Ghanem et al., 2011]. Jāsaka, ka attiecībā uz histoloģiski noteiktajām audzēja malignitātes pakāpēm arī čehu zinātniece Kateržina Tarana nekonstatē saistību starp tām un WT1 proteīna ekspresiju epiteliālajā un blastematozajā audzēja komponentā [Taran et al., 2008]. Pašlaik prezentētajā promocijas darbā atrasta statistiski būtiska atšķirība ar p līmeni 0,009 starp WT1 proteīna ekspresiju gadījumos, kad audzēja atbilde uz ķīmijterapiju klīniski traktēta kā laba (M=52,86%) un nepietiekošas regresijas gadījumiem (M=1,37). Jāsaka, ka šīs atradnes prognostiskā nozīme ir ļoti diskutabla. Audzēju grupa ar klīniski konstatēto slikto reakciju uz ķīmijterapiju bija ļoti heterogēna. No 5 pētītajiem audzējiem 2 bija augstas malignitātes pakāpes ar saglabātu prevalējošo blastematozo komponentu arī pēc izdarītās ķīmijterapijas. Šajos gadījumos slikta reakcija uz izdarīto terapiju tiešām būtu saistāma ar palielinātu veidojuma malignitātes potenciālu. 1 gadījumā atrasta cistiska daļēji diferencēta nefroblastoma, kuras malignitātes potenciāls ir zems. Šajā gadījumā fakts, ka nenotiek audzēja izmēru samazināšanās, drīzāk saistāma ar to, ka labi diferencētie audzēja elementi ir mazāk jūtīgi uz izdarīto ārstēšanu. 1 gadījumā konstatēta regresīva tipa nefroblastoma, bet histoloģiskais tips noteikts preparātu pārskatā bez pilnīga visa makroskopiskā materiāla pārskata, bet 1 gadījumā jaukta tipa nefroblastoma. Līdz ar to jautājums, vai samazinātā WT1 proteīna ekspresija šajā gadījumā ir saistāma ar paaugstinātu vai pazeminātu audzēja malignitātes potenciālu, paliek atklāts.

4.2.3. Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16^{INK4a} ģenētisko izmaiņu izvērtējums

Izvērtējot CDK2A lokusa DNS sekvenēšanas rezultātā 50% no analizētajiem paraugiem iegūto 442. nukleotīda G nomaiņu uz A (c.442G>A) un attiecīgi aminoskābju līmenī p16^{INK4a} proteīna 148. aminoskābes alanīna nomaiņu ar treonīnu (A148T), kura ir būtiski biežāk sastopama analizētajā grupā nekā kontroles grupā ($p < 10^{-7}$), pastāv jautājums par šīs izmaiņas klīnisko nozīmīgumu. Ģenētisko izmaiņu pētniecībā būtiskais ir fakts, ka pastāv daudzas cilvēka genoma „strukturālās variācijas”. Šīs izmaiņas var izpausties gan mikroskopiskajā, gan submikroskopiskajā līmenī kā delēcijas, duplikācijas un DNS segmentu kopiju skaita variācijas vai ielikšana (angļu val. insertion), inversija un translokācija. Strauji pieaug pierādījumu skaits tam, ka šie strukturālie varianti genoma herogenitātes ietvaros var ietvert miljoniem nukleotīdu katrā genomā. Tā atsevišķu nukleotīdu polimorfisms ir atrasts vairāk nekā 1% no

cilvēku populācijas un ir iespējams, ka populācijā pastāv aptuveni 10 miljoni šādu nukleotīdu polimorfisma [Feuk et al., 2006]. Attiecībā uz CDKN2A lokusu daļā literatūras minētā izmaiņa 442G>A arī traktēta kā gēna polimorfisms. Tā melanomas pacientiem ir aprakstīti sekojoši šī gēna polimorfisma veidi: 442G>A, 500C>G, 513C>A, 540C>T [Puig et al., 2005]. Latvijā 2007. gadā veiktā pētījumā melanomas pacientiem konstatēta minētā CDKN2A lokusa otrā eksona polimorfisms 442G>A, un tā biežums bija statistiski būtiski paaugstināts melanomas pacientu grupā salīdzinot ar kontroles grupu [Pjanova et al., 2007]. Tāpēc iespējams nefroblastomu grupā atrastā minētā izmaiņa varētu tikt traktēta nevis kā gēna mutācija, bet gan kā polimorfisms. Par to vairāk liecina arī p16^{INK4a} proteīna imunohistoķīmiskajā noteikšanā iegūtais rezultāts. Salīdzinot DNS sekvenēšanas rezultātus ar p16^{INK4a} proteīna imūnhistoķīmisko ekspresivitāti statistiski būtisku atšķirību starp minētās imūnhistoķīmiskās reakcijas intensitāti blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā pacientiem ar 2. eksona savvaļas tipu un pacientiem ar atrasto 442. nukleotīda G nomaiņu ar A 2. gēna eksonā, nekonstatē ($p=0,086$; $p=0,177$). Tātad minētā izmaiņai nav ietekmes uz p16^{INK4a} proteīna sintēzi un jādodomā, tā ir bez būtiskas nozīmes. Tomēr pētījuma rezultāti pilnībā neizslēdz CDKN2A lokusa ģenētisko ietekmi nefroblastomas izcelsmē, jo analizējot mikrosatelītu pētniecībā iegūto rezultātu atrod LOH četru analizēto mikrosatelītu D9S736, D9S1604, D9S942 un D9S171 gadījumā, kas var liecināt par citu šajā lokusā esošo gēnu ietekmi. Vēl vienā gadījumā atrasts heterozigotātes zudums analizējot marķieri D9S1604, kas atrodas intronā pirms CDKN2A/p16^{INK4A} gēna, vienā gadījumā atrasts heterozigotātes zudums analizējot marķieri D9S736, kas atrodas aiz CDKN2A gēna pēdējā trešā eksona norādot, ka potenciāli ar nefroblastomas attīstību saistītas ģenētiskās izmaiņas šajā lokusā būtu meklējamas aiz minētā gēna. Vienā gadījumā heterozigotātes zudums atrasts gan marķierī D9S942, gan arī marķierī D9S171 vienlaicīgi. Minētie marķieri attiecīgi atrodas intronā starp 1β un 1α eksoniem un pirms CDKN2A gēna 1β eksona norādot uz lielāka reģiona delēciju. Tāpat netika konstatēta statistiski būtiska atšķirība starp minētā proteīna ekspresiju kādā no histoloģiskajiem komponentiem abās grupās ar un bez heterozigotātes zuduma (attiecīgi $p=0,88$; $p=0,75$, $p=0,091$), kas vairāk liecina par to, ka minētās izmaiņas nav saistītas ar CDKN2A/p16^{INK4a} gēnu. No klīniskā viedokļa interesanti ir tas, ka pacientei ar heterozigotātes zudumu analizējot marķieri D9S736 atrod progresējošu ļaundabīga procesa gaitu. Analizējot D9S942 un D9S171 mikrosatelītu marķierus heterozigotātes zudums atrasts vienai un tai pašai pacientei. Audzējs piederēja 2. stadijas augstas malignitātes blastematoza tipa veidojumiem un klīniski tika novērota slikta reakcija uz pirms operācijas periodā izdarīto ķīmijterapiju. Līdzīgā pētījumā autori pētīja CDKN2A lokusa izmaiņas nefroblastomas audos konstatējuši heterozigotātes zudumu 9 hromosomā CDKN2A/2B lokusā starp mikrosatelītiem D9S932 un D9S265 35% (12 no 34) no analizēto audzēju gadījumiem, heterozigotātes zudumu starp mikrosatelītiem D9S286 un D9S775 24% (8 no 34) gadījumos un heterozigotātes zudumu analizējot mikrosatelītu marķieri D9S1748 12% (4 no 34) gadījumu, kas liek domāt par šajā lokusā esošo citu gēnu iesaistīšanos nefroblastomas izcelsmē. Pētījumā gan netika atrasta nekāda saistība starp mikrosatelītu analīzē iegūto rezultātu un p16^{INK4a} proteīna ekspresiju vai klīniskajiem datiem [Natrajan et al., 2008].

5. SECINĀJUMI

1. Laika posmā no 1997. gada janvārim līdz 2012. gada jūlijam Latvijā biežāk diagnosticētais bērnu nieru audzējs ir nefroblastoma, kas atbilst pasaules datiem.

2. Latvijā ir diagnosticēti reti sastopamie bērnu vecuma audzēji, kā nieru gaišo šūnu sarkoma un nieres rabdoīds audzējs un procentuāli tie sastopami 2,04% un 4,08% gadījumu.

3. Analizētajā grupā nav konstatēti nieru šūnu vēža gadījumi, kas var liecināt par zemāku šī audzēja sastopamību Latvijā bērniem līdz 18 gadu vecumam, bet dati būtu jāapstiprina papildus statistiskos pētījumos.

4. Atkārtotās imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas gaitā konstatētās diagnostiskās neprecizitātes 4,08% gadījumu liecina par šīs metodes nozīmīgumu bērnu nieru audzēju diagnostikā.

5. P53 imūnhistoķīmiskās ekspresijas noteikšanai ir prognostiska nozīme arī labvēlīgas histoloģiskās ainas nefroblastomas gadījumā, jo pastāv statistiski būtiska saistība starp minētās reakcijas intensitāti audzēja epiteliālajā komponentā un audzēja progresiju.

6. E-kadherīna imūnhistoķīmiskās ekspresijas noteikšanai ir prognostiska nozīme labvēlīgas histoloģiskās ainas nefroblastomas gadījumā, jo ir konstatēta statistiski būtiski pazemināta e- kadherīna ekspresija metastātiskos audzējos salīdzinot ar primārajiem, būtiski pazemināta reakcijas intensitāte augstas malignitātes audzēju gadījumā salīdzinot ar zemas un vidējas malignitātes veidojumiem un pazemināta e- kadherīna ekspresija audzēja progresijas gadījumā.

7. CD44s glikoproteīda izoformas ekspresija blastematozajā komponentā var tikt izmantota turpmākai labvēlīgas histoloģiskās ainas nefroblastomas malignitātes potenciāla pētīšanai, jo pastāv statistiski būtiska pozitīva saistība starp CD44s un p53 ekspresiju nefroblastomu blastematozajā komponentā.

8. Nevar izslēgt vidējas malignitātes pakāpes labvēlīgas histoloģiskās ainas nefroblastomas dažādu histoloģisko tipu, sevišķi epiteliālā, stromālā un regresīvā, dažādu malignitātes potenciālu par kuru netieši liecina statistiski būtiski pazeminātā CD44s ekspresija epiteliāla tipa nefroblastomu epiteliālajā komponentā, paaugstinātā p53 ekspresija epiteliāla tipa nefroblastomu epiteliālajā komponentā, samazinātā CKAE1/AE3 pozitīvo epiteliālo struktūru skaits atkārtotā procesa gadījumā salīdzinot ar primārajiem nefroblastomām, CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaita palielināšanās regresīva tipa audzēju gadījumā.

9. Nefroblastomu grupā statistiski būtiski biežāk nekā kontroles personām atrasta izmaiņa c.442G>A CDKN2A/p16 gēnā, bet nevar izslēgt gēna polimorfismu, par ko liecina neizmainītā p16^{INK4a} imūnhistoķīmiskā ekspresija.

10. Atrasts heterozigotitātes trūkums četros no analizētajiem mikrosatelītu marķieriem (pa vienam D9S736, D9S1604, D9S942 un D9S171 gadījumā), kas nozīmē, ka CDKN2A lokuss var būt iesaistīts nefroblastomas ģenēzē, bet ar audzēja attīstību saistāmais gēns vēl ir jāidentificē.

6. PRAKTISKIE IETEIKUMI

Analizējot uz pētījuma rezultātos atspoguļotās problēmas bērnu vecuma audzēju diferenciālajā diagnostikā, praktizējošiem bērnu patologiņiem var rekomendēt:

- 1) paplašināt lietoto imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas paneli ar obligātu WT1 proteīna, neiroendokrīno epiteliālo marķieru, kā arī LCA, Ki67 un CD99 antigēnu noteikšanu, diferencējot blastematoza tipa nefroblastomas no citiem bērnu vecuma „sīko, apaļo, zilo šūnu audzējiem”,
- 2) ņemot vērā pētījumā konstatēto WT1 proteīna imūnhistoķīmisko pozitivitāti tikai 61,54% no gadījumiem, interpretēt negatīvu rezultātu tikai kompleksi, analizējot iegūto imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas atradni un izmantojot pietiekoši plašu izmeklēšanas shēmu,
- 3) paplašināt mezenhimālo marķieru t. skaitā muskulāro imūnhistoķīmiskās lietošanu cellulāras mezoblastiskas nefromas diagnostikā,
- 4) iesaistīties starpinstitutionālo bērnu vecuma nieru audzēju izpētes grupu darbā, lai saņemtu konsultācijas reto audzēju diagnostikā un pievienotu materiālu zinātniskās izpētes vajadzībām,
- 5) veidot sadarbību starp vairāku valstu laboratorijām INI1 proteīna imūnhistoķīmiskai noteikšanai rabdoīda nieru audzēja diagnostikā un citoģenētiskai translokācijas (12;15) (p13;q25) noteikšanai cellulāras mezoblastiskas nefromas diagnostikā.

7. PUBLIKĀCIJAS

1. Franckeviča I, Kleina R, Melderis I. Nefroblastoma Latvijā - tās prognoze un imūnhistoķīmiskais profils // RSU Zinātniskie raksti 2010 1. sējums / Rīga: RSU 2011: 385-396.
2. Kleina R, Franckeviča I, Sperga M, Lutinska D. The analysis of undiagnosed malignancies // Papers on Anthropology XX / Tartu: Tartu University Press 2011: 199-208.
3. Franckeviča I, Kleina R, Voika O. Originally misdiagnosed rhabdoid tumor of kidney. A case report and differential diagnosis. // Polish Journal of Pathology 2011; 3: 163-167. PMID:2102074.
4. Franckeviča I, Kleina R, Melderis I „Morphological and immunohistochemical characteristics of surgically removed paediatric renal tumours in Latvia (1997-2010)” // Acta Chirurgica Latviensis 2011; 11: 44-49. DOI 10.2478/v10163-012-0008-6.
5. Franckeviča I, Kleina R, Melderis I „CD44s glikoproteīna ekspresija nefroblastomas gadījumā” // RSU Zinātniskie raksti 2011 2. sējums / Rīga: RSU 2012: 236-248.
6. Franckeviča I, Kleina R. Bērnu nieru audzēju morfoloģisks raksturojums: ieskats literatūrā un situācija Latvijā // Latvijas Ārsts, 2013; 1: 18-22.

8. TĒZES UN ZIŅOJUMI KONFERENCĒS

1. Franckeviča I, Kleina R. Morfoloģiskais un imūnhistoķīmiskais nieru audzēju raksturojums bērniem. 6.Latvijas Ārstu kongress. Tēzes 2009: 30.
2. Franckeviča I, Sperga M. Nieru gaišo šūnu sarkomas - reta audzēja gadījuma-morfoloģiskais un imūnhistoķīmiskais raksturojums. Rīgas Stradiņa Universitāte 2009. gada zinātniskā konference. Tēzes 2009: 195.
3. Franckeviča I, Sperga M, Kleina R. Nieres rabdoīds tumors - diferenciāl-diagnostiskās iespējas patologa praksē. Rīgas Stradiņa Universitāte 2010. gada zinātniskā konference. Tēzes 2010: 268.
4. Sperga M, Kleina R, Franckeviča I. P16 INK4a ekspresijas salīdzinājums papillārām nieru karcinomām ar fona izmaiņām un bez tām. Rīgas Stradiņa Universitāte 2010. gada zinātniskā konference. Tēzes 2010: 267.
5. Franckeviča I. Rare variations of Renal Tumours in Children. Supplement Acta Chirurgica Latviensis 2010, 10 (1): 60.
6. Sperga M, Lietuvietis V, Franckevica I, Eglitis V, Kleina R. The comparison of P16 expression in papillary renal cell carcinomas with and without background nephrosclerosis. European Urology Supplements 2010, 9(6):554.
7. Franckeviča I, Sokolova L. Paediatric renal tumors of Latvia. Publikācija interneta vietnē www.paedpath.org un ziņojums 56. Pediatrijas Patologu biedrības (Paediatric Pathology Society) sēdē 2010. gada 16-18. septembrī Padujā, Itālijā.
8. Kleina R, Franckevica I, Sperga M, Lutinska D. Analysis of undiagnosed malignancies. Baltic Morphology VI. Tartu. Conference programme. Abstracts of presentations 2011: 65.
9. Franckevica I, Kleina R. CD44s isoform expression in Wilms' tumor cases in Latvia. Virchows Archiv 2011, 459 (Suppl 1): S123.
10. Franckeviča I, Kleina R. CD44 glikoproteīna imūnhistoķīmiskā ekspresija nefroblastomas gadījumā. Rīgas Stradiņa Universitāte 2011. gada zinātniskā konference. Rīga. Tēzes 2011: 281.
11. Franckeviča I, Sperga M. Bērnu vecuma nieru audzēju imūnhistoķīmiskās diagnostikas iespējas Latvijā. Rīgas Stradiņa Universitāte 2011. gada zinātniskā konference. Rīga. Tēzes 2011: 233.
12. Franckeviča I, Kleina R. E-kadherīna imūnhistoķīmiskās ekspresijas nozīme Vilmsa audzēja gadījumā. Rīgas Stradiņa Universitāte 2012. gada zinātniskā konference. Rīga. Tēzes 2012: 255.
13. Franckeviča I, Kleina R. Immunohistochemical expression of E-cadherine in primary and metastatic nephroblastoma cases. Virchows Archiv 2012, 461 (Suppl 1): S217.

9. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Aaltoma S., Lipoponen P., Ala-Opas M., et al. Expression and prognostic value of CD44 standart and variant v3 and v6 isoforms in prostate cancer // *European Urology*, 2001; 39 (2): 138-144.
2. Abosoudah I., Ngan B. Y., Grant R., Weitzman S. WT1 expression and hemihypertrophy in congenital mesoblastic nephroma // *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 2008; 30(10):768-771.
3. Abramson L. P., Grundy P. E., Rademaker A. W., et al. Increased microvascular density predicts relapse in Wilms' tumor // *Journal of Pediatric Surgery*, 2003; 38(3):325-330
4. Adem C., Gisselsson D., Dal Cin P., Nascimento A. G. ETV6 rearrangements in patients with infantile fibrosarcomas and congenital mesoblastic nephromas by fluorescence in situ hybridization // *Modern Pathology*, 2001;14(12):1246-1251.
5. Adnani A., Latib R., Bouklata S., et al. Sarcome á cellules claires du rein chez l' adulte: á propos d'un cas // *Journal de Radiologie*, 2006; 87(2 Pt 1):136-138.
6. Ahmed H. U., Arya M., Levitt G., et al. Part II: Treatment of primary malignant renal non Wilms' tumor in children // *Lancet Oncology*, 2007; 8 (9):842-848.
7. Alami J., Williams B. R., Yeger H. Derivation and characterization of a Wilms' tumour cell line, WiT 49 // *International Journal of Cancer*, 2003; 107(3):365-374.
8. Alami J., Williams B. R., Yeger H. Differential expression of E kadherin and beta catenin in primary and metastatic Wilm's tumours // *Molecular Pathology*, 2003; 56 (4): 218-225.
9. Amar A.M., Tomlinson G., Green D.M., et al. Clinical presentation of rhabdoid tumors of the kidney // *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 2001; 23(2):105-108.
10. Arcellana- Panlilio M. Y., Egeler R. M., Ujack E., et al. Decreased expression of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors in Wilms tumor // *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2000; 29(1):63-69.
11. Arcellana- Panlilio M. Y., Ujack E., Dome J. S. et al. A case cohort study of INK4 expression in relapsed favourable histology Wilms tumor // *Medical and Pediatric Oncology*, 2003; 41 (4): 285.
12. Argani P. Clear cell sarcoma // *World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs* / Ed. by Eble J. N., Sauter G., Epstein J.I. & Sesterhenn A. I.- Lion: IARC Press 2004. - Pp. 56-57.
13. Argani P., Faria P. A., Epstein J. I., et al. Primary renal synovial sarcoma: molecular and morphologic delineation of an entity previously included among embryonal sarcomas of the kidney // *The American Journal of Surgical Pathology*, 2000; 24 (8): 1087-96 .http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Reuter%20VE%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=10935649
14. Argani P., Landany M. Renal carcinomas associated with Xp11.2 translocations / TFE3 gene fusions // *World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs* / Ed. by Eble J. N., Sauter G., Epstein J.I. & Sesterhenn A. I.- Lion: IARC Press 2004. - Pp. 37-38.
15. Argani P. Metanephric stromal tumour // *World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics, Tumours of the Urinary System and Male Genital*

- Organs / Ed. by Eble J. N., Sauter G., Epstein J.I. & Sesterhenn A. I.- Lion: IARC Press 2004. - Pp. 46-47.
16. Argani P. Rhabdoid tumor // World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs / Ed. by Eble J. N., Sauter G., Epstein J.I. & Sesterhenn A. I.- Lion: IARC Press, 2004. - Pp. 58-59.
 17. Argani P., Perlman E. J., Breslow N.E. et al. Clear cell sarcoma of the kidney: a review of 351 cases from the National Wilms Tumor Study Group Pathology Center // The American Journal of Surgery, 2000; 24 (7):4-18.
 18. Argani P., Sorensen P.H.B. Congenital mesoblastic nephroma // World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs / Ed. by Eble J. N., Sauter G., Epstein J.I. & Sesterhenn A. Isabell.- Lion: IARC Press, 2004.- Pp. 60-61.
 19. Armin M.B., de Peralta-Venturina M. N., Ro J. Y., et al. Clear cell sarcoma of kidney in an adolescent and in young adults: a report of four cases with ultrastructural, immunohistochemical, and DNA flow cytometric analysis // The American Journal of Surgical Pathology, 1999; 23(12):1455-1463.
 20. Asiri M., Al- Sawad A. Renal primitive neuroectodermal tumour in childhood: Case report and review of literature // Canadian Urological Association Journal, 2010; 4(6):158-160.
 21. Bahrami A., Truong L.D., Ro J.Y. Undifferentiated Tumor: true identity by immunohistochemistry // Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2008; 132 (3): 326-348.
 22. Bai L., Zhu W. G. P53: structure, functions and therapeutic applications // Journal of Cancer Molecules, 2006; 2 (4): 141-153.
 23. Bardeesy N., Falkoff D., Petruzzi M. J., et al. Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations // Nature Genetics, 1994; 7(1): 91-97.
 24. Barnoud R., Sabourin J. C., Pasquier D., et al. Immunohistochemical expression of WT1 by desmoplastic small round cell tumor: a comparative study with other small round cell tumors // The American Journal of Surgical Pathology, 2000; 24 (6): 830-836.
 25. Barroca H. Nephroblastoma is a success of paediatric oncologic therapy. How further can we go? : results of a cyto-histologic correlation study // Diagnostic Cytopathology, 2010; 38 (7): 477-481.
 26. Bartsch D., Shevlin D. W., Tung W.S., et al. Frequent mutations of CDKN2 in primary pancreatic adenocarcinomas // Genes, Chromosomes & Cancer, 1995, 14(3):189-195.
 27. Basta- Jovanović G., Suzić S., Savin M., et al. Immunohistochemical expression of protein p16 in Wilms' tumor // Acta Veterinaria (Beograd), 2008; 58 (4): 297- 306.
 28. Baudry D., Hamelin M., Cabanis M. O., et al. WT1 splicing alterations in Wilms' tumors // Clinical Cancer Research, 2000, 6(10):3957-65.
 29. Becker K. F., Atkinson M. J., Reich U., et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas // Cancer Research, 1994; 54(14):3845-3852
 30. Beckwith J. B. Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations // American Journal of Medical Genetics, 1998; 79 (4):268-273.

31. Beckwith J. B., Palmer N. F. Histopathology and prognosis of Wilms tumor: results from the First National Wilms' Tumor Study // *Cancer*, 1978, 41 (5): 1937-1948.
32. Beckwith J. B. Precursor lesions of Wilms tumor: clinical and biological implications // *Medical and Pediatric Oncology*, 1993; 21(3):158-168.
33. Beniers A. J., Efferth T., Füzesi L. et al. p53 expression in Wilms tumor: a possible role as prognostic factor // *International Journal of Oncology*, 2001; 18 (1): 133- 139.
34. Berner H. S., Nesland J. M. Expression of CD44 isoforms in infiltrating lobular carcinoma of the breast // *Breast Cancer Research and Treatment*, 2001; 65 (1): 23-29.
35. Bernstein L., Linet M., Smith M.A., et al. Renal Tumors// *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995* / Ed. by Ries L. A. G., Smith M. A., Gurney J. G. et al. Bethesda, MD: National Cancer Institute, SEER Program, 1999.- NIH Pub No. 99-4649.- Pp.79- 90.
36. Berrebi D., Leclerc J., Schleiermacher G. et al. High Cyclin E staining Index in Blastemal, Stromal or Epithelial Cells is Correlated with tumor aggressiveness in Patients with nephroblastoma // *PLoS One*, 2008; 3(5):e2216 // www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0002216; (sk.22.05.2010.).
37. Berx G., Cleton-Jansen A. M., Nollet F., et al. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers // *The EMBO Journal*, 1995; 14(24):6107-6115.
38. Betticher D. C., White G. R., Vonlanthen S., et al. G1 control gene status is frequently altered in resectable non- small lung cancer // *International Journal of Cancer*, 1997; 74(5):556-562.
39. Biegel J. A., Fogelgren B., Wainwright L.M., et al. Germline INI1 mutation in a patient with a central nervous system atypical teratoid tumor and renal rhabdoid tumor // *Genes, chromosomes & cancer*, 2000; 28(1):31-37.
40. Birch J. M., Breslow N. Epidemiologic features of Wilms tumor // *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 1995; 9 (6):1157-1178.
41. Bisceglia M., Ragazzi M., Galliani C. A., et al. TTF-1 expression in nephroblastoma // *The American Journal of Surgical Pathology*; 2009, 33(3):454-461.
42. Blish K. R., Clausen K. E., Hawkins G. A., et al. Loss of heterozygosity and SOSTDC1 in adult et pediatric renal tumors // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2010; 29 (1): 147.
43. Bolande R.P., Brough A. J., Izant R.J. Jr. Congenital mesoblastic nephroma of infancy. A report of eight cases and the relationship to Wilms' tumor // *Pediatrics*, 1967; 40(2):272-278.
44. Bonaïti-Pellié C., Chompret A., Tournade M.F., et al. Genetics and epidemiology of Wilms' tumor: the French Wilms' tumor study // *Medical and Pediatric Oncology*, 1992; 20(4):284-291.
45. Borg A., Sandberg T., Nilsson K., et al. High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families // *Journal of The National Cancer Institute*, 2000; 92(15):1260-1266.
46. Breslow N., Beckwith J. B., Ciol M., Sharples M. Age distribution in Wilms' tumor: report fro the National Wilms'Tumor Study // *Cancer Research*, 1988; 48 (6): 1653-1657.

47. Breslow N., Beckwith J. B., Perlman E. J., Reeve A. E. Age distributions, birth weights, nephrogenic rests, and heterogeneity in the pathogenesis of Wilms' tumor // *Pediatric Blood & Cancer*, 2006; 47(3):260-267.
48. Breslow N., Olshan A., Beckwith J. B., Green D. M. Epidemiology of Wilms tumor // *Medical and Pediatric Oncology*, 1993; 21 (3): 172-181.
49. Breslow N. E., Palmer N. F., Hill L. R., et al. Wilm's tumor: prognostic factors for patients without metastases at diagnosis. Results of the National Wilm's tumor Study // *Cancer*, 1978; 41 (4): 1577-1589.
50. Breslow N. E., Sharples K., Beckwith J. B., et al. Prognostic factors in nonmetastatic, favourable histology Wilms tumor. Results of the Third National Wilms Tumor Study // *Cancer*, 1991; 68 (11): 2345-2353.
51. Brown D. C., Gatter K. C. Monoclonal antibody Ki67: its use in histopathology // *Histopathology*, 1990; 17(6):489-503.
52. Brownlee N.A, Hazen-Martin D. J., Garvin A. J., Re G. G. Functional and gene expression analysis of the p53 signaling pathway in clear cell sarcoma of the kidney and congenital mesoblastic nephroma // *Pediatric and Developmental Pathology*, 2002; 5(3):257-268.
53. Brownlee N. A., Perkins L. A., Stewart W., et al. Recurring translocation (10;17) and deletion (14q) in clear cell sarcoma of the kidney // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2007; 131(3):446-451.
54. Bruder E., Passera O., Harms D., et al. Morphologic and molecular characterization of renal cell carcinoma in children and young adults // *The American Journal of Surgical Pathology*, 2004; 28(9):1117-1132.
55. Burger P.C., Yu I.T., Tihan T., et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system: a highly malignant tumor of infancy and childhood frequently mistaken for medulloblastoma: a Pediatric Oncology Group study // *The American Journal of Surgical Pathology*, 1998; 22(9):1083-1092.
56. Carpentieri D.F., Nichols K., Chou P.M., et al. The expression of WT1 in the differentiation of rhabdomyosarcoma from other pediatric small round blue cell tumors // *Modern Pathology*, 2002; 15(10):1080-1086.
57. Chae S. W., Sohn J. H., Kim D. H., et al. Overexpression of Cyclin B1, cdc2, p16, p53 in human breast cancer: the clinicopathological correlations and prognostic implications // *Yonsei Medical Journal*, 2011; 52(3):445-453.
58. Chambers C. H., Camitta B. M., Garg U., Tang T. T., et al. Nephroblastoma (Wilms tumor): tubule density and prognosis // *Medical and Pediatric Oncology*, 1978; 5(1): 127-135.
59. Charles A. K., Mall S., Watson J., Berry P.J. Expression of the Wilms' tumour gene WT1 in the developing human and in paediatric renal tumors: an immunohistochemical study // *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*, 1997; 50 (3): 138-144.
60. Chatten J., Cromie W. J., Duckett J. W. Ossifying tumor of infantile kidney: report of two cases // *Cancer*, 1980; 45(3):609-6012.
61. Cheah P. L., Looi L. M., Chan L. L. Immunohistochemical expression of p53 proteins in Wilm's tumour: a possible association with the histological prognostic parameter of anaplasia // *Histopathology*, 1996; 28 (1): 49-54.
62. Cheah P. L., Looi L. M. Implications of p53 protein expression in clear cell sarcoma of the kidney // *Pathology*, 1996; 28(3):229-231.

63. Chen B. F., Tzen C. Y., Liang D. C., et al. Immunohistochemical expression of Wilms' tumor 1 protein in nephroblastoma // Journal of the Chinese Medical Association, 2004; 67(10):506-510.
64. Chen Y., Zhang H., Yue B., Li H. Study of P16 gene in acute leukemia // Journal of Tongji Medical University, 2000; 20(3):210-211.
65. Chudnovsky Y., Khavari A. P., Adams E. A. Melanoma genetics and development of rational therapeutics // Journal of Clinical Investigation, 2005; 115 (4): 813-824.
66. Coffin C.M., Belchis D. Immunohistology of pediatric neoplasms // Diagnostic immunohistochemistry / Ed. by Dabbs D.-2st ed.- Philadelphia: Churchill Livingstone, 2006. – Pp. 611-637.
67. Coppes J. M., Haber A. D., Grundy P. E. Genetic events in the Development of Wilms' tumor // New England Journal of Medicine, 1994; 331: 586-590.
68. Coppes- Zantinga A.R., Coppes J. M. Max Wilms and „Die Mischgeschwulste der Niere” // Canadian Medical Association Journal, 1999; 160 (8): 1196.
69. Dalchau R., Flanagan B. F., Allen A. K., et al. Chemical composition and tissue distribution of the human CD44 glycoprotein // Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference / Ed. by Knapp W., Dörken B., Gilks W. R., et al.- 1989 Feb 21-25 Vienna, Austria - Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1989.- Pp. 622-25.
70. D'Angelo M. F., Kausik S. J., Sebo T. J., et al. P53 immunopositivity in histologically favorable Wilms tumor is not related to stage at presentation or to biological aggression // The Journal of Urology, 2003; 169(5):1815-1817.
71. Davis C. J. Jr., Barton J. H., Sesterhenn I. A., Mostofi F. K. Metanephric adenoma. Clinicopathological study of fifty patients // The American Journal of Surgical Pathology, 1995; 19(10):1101-1114.
72. Davis C. J. Jr., Mostofi F. K., Sesterhenn I. A. Renal medullary carcinoma. The seventh sickle cell nephropathy // The American Journal of Surgical Pathology, 1995; 19(1):1-11.
73. Davis I. J., Hsi B. L., Arroyo J. D., et al. Cloning of a novel alpha- TFEB fusion in renal tumors harboring the t(6;11)(p21;q130 chromosome translocation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003; 100 (10): 6051-6056.
74. Delahunt B., Farrant G. J., Bethwaite P. B., et al. Assessment of proliferative activity in Wilms' tumour // Analytical Cellular Pathology, 1994; 7(2):127-38.
75. Denk H., Weybora W., Ratschek M., et al. Distribution of vimentin, cytokeratins, and desmosomal-plaque proteins in human nephroblastoma as revealed by specific antibodies: co-existence of cell groups of different degrees of epithelial differentiation // Differentiation; 1985; 29(1):88-97.
76. DeLeo A. B., Jay G., Appella E., et al. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997; 76(5):2420-2424.
77. de Silva R. C., Medeiros Filho P., Chioato L., et al. Desmoplastic small round cell tumor of the kidney mimicking Wilms tumor: a case report and review of the literature // Applied Immunohistochemistry & Molecular Pathology, 2009; 17(6):557-562.
78. de Vries E., Bray F., Coebergh J. W., et al. Malignant melanoma: Intraduction // World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics, Skin Tumours /

- Ed. by LeBoit E. P., Burg G., Weedon D, Sarasin A.- Lion: IARC Press 2006. - Pp. 52-65.
79. Dobelis J. Uroģenitālās sistēmas orgānu audzēji // Bērnu uroloģija / J.Dobelis.-Rīga: Madris, 2003.- 279-296 lpp.
 80. Dray M., Russell P., Dalrymple C., et al. p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies // Pathology, 37(2):112-124.
 81. Dublin E.A., Patel N.K., Gillett C. E., et al. Retinoblastoma and p16 in mammary carcinoma: their relationship to cyclin D1 and histopathological parameters // International Journal of Cancer, 1998; 20; 79(1):71-75.
 82. Duchrow M., Schlüter C., Key G., et al. Cell-proliferation associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell- cycle maintaining proteins // Archives of Immunology, Therapy and Experimentation, 1995; 43: 117-21.
 83. Duchrow M., Schlüter C., Wohlenberg C., et al. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67 // Cell Proliferation, 1996; 29(1):1-12.
 84. Eble J.N., Bonsib S.M. Extensively cystic renal neoplasms: cystic nephroma, cystic partially differentiated nephroblastoma, multilocular cystic renal cell carcinoma, and cystic hamartoma of renal pelvis // Seminars in Diagnostic Pathology, 1998; 15(1):2-20.
 85. Eble J. N. Cystic partially differentiated nephroblastoma // World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs / Ed. by Eble J.N. , Sauter G. , Epstein J. I. & Sesterhenn A. I. - Lion: IARC Press, 2004. – Pp. 55.
 86. Eble J. N., Grignon D. J., Moch H. Metanephric adenoma and metanephric adenofibroma // World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs / Ed. by Eble J.N., Sauter G. , Epstein J. I. & Sesterhenn A. I. - Lion: IARC Press, 2004. – Pp. 44- 45.
 87. Eble J. N., Young R. H. Mesenchymal tumors of the kidney // Diagnostic Histopathology of Tumors / Ed. by Fletcher C.D.M.-3st ed. - Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2007.-Pp. 502-510.
 88. Eble J. N., Young R. H. Renal tumors in children // Diagnostic Histopathology of Tumors / Ed. by Fletcher C.D.M.-3st ed.- Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2007. – Pp. 510-519.
 89. el Bahtimi R., Hazen-Martin D. J., Re G. G., et al. Immunophenotype, mRNA expression, and gene structure of p53 in Wilms' tumors // Modern Pathology, 1996; 9 (3): 238-244.
 90. Ewalt H. D., Sheffield E., Steven P., et al. Renal lesion growth in children with tuberous sclerosis complex // The Journal of Urology, 1998; 160 (1): 141-145.
 91. Fanburg-Smith J.C., Hengge M., Hengge U. R., et al. Extrarenal rhabdoid tumors of soft tissue: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 18 cases // Annals of Diagnostic Pathology, 1998; 2(6):351-362.
 92. Faussillon M., Monnier L., Junien C., Jeanpierre C. Frequent overexpression of cyclinD1/cyclin- dependent kinase 4 in Wilms' tumor // Cancer Letters, 2005; 221(1):67-75.
 93. Feuk L., Marshall R. C., Wintle F. R., Scherer W. S. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies // Human Molecular Genetics, 2006; 15 (1): 57-66.

94. Fort D. W., Tonk V. S, Tomlinson G. E, et al. Rhabdoid tumor of the kidney with primitive neuroectodermal tumor of the central nervous system: associated tumors with different histologic, cytogenetic, and molecular findings // *Genes, Chromosomes & Cancer*, 1994; 11(3):146-152.
95. Franckeviča I, Kleina R., Melderis I. CD44s glikoproteīna ekspresija nefroblastomas gadījumā // *RSU Zinātniskie raksti*, 2011. 2. sējums // Rīga: RSU 2012: 236-248.
96. Furtwängler R., Reighard H., Beier R. Clear-cell sarcoma (CCSK) of the kidney-results of the SIOP 93-01/GHOP trial // *Pediatric Blood & Cancer*, 2005; 45 (6): 423.
97. Furtwaengler R., Reinhard H., Leuschner I., et al. Mesoblastic nephroma--a report from the Gesellschaft fur Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) // *Cancer*, 2006; 106(10):2275-2283.
98. Gerdes J., Li L., Schlueter C., et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation- associated nuclear antigen that is defined with monoclonal antibody Ki67 // *American Journal of Pathology*, 1991; 138 (4): 867-873.
99. Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation // *International Journal of Cancer*, 1983; 31(1):13-20.
100. Ghanem M. A. Reply to Letter to Editor // *Clinical Cancer Research*, 2004; 10 (22): 7786.
101. Ghanem M. A., van der Kwast T. H., den Hollander J. C., et al. Expression and prognostic value of Wilms' tumor 1 and early growth response 1 proteins in nephroblastoma // *Clinical Cancer Research*, 2000; 6(11):4265-4271.
102. Ghanem M., van der Kwast T. H., Molenaar W. M. The predictive value of immunohistochemical markers in untreated Wilms' tumor: are they useful?? // *World Journal of Urology*, 2011; DOI: 10.1007/s00345-011-0684-1
<http://www.springerlink.com/content/a1u84r721876730j/> (sk. 25.05.2011.).
103. Ghanem A. M., van der Kwast H. T., Sudaryo K. M. et al. MIB-1 (Ki-67) Proliferation index and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27^{Kip1} Protein expression in Nephroblastoma // *Clinical Cancer Research*, 2004; 10 (3): 591-597.
104. Ghanem A. M., van Steenburger J. G., Nijman M. J. R. Prognostic markers in nephroblastoma (Wilms' tumor) // *Urology*, 2005; 65 (6): 1047-1054.
105. Ghanem M. A., van Steenbrugge G. J., Sudaryo M. K., et al. Expression and prognostic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT-1) in nephroblastoma // *Journal of Clinical Pathology*, 2003; 56(2):107-113.
106. Ghanem M. A., van Steenbrugger G. J., van der Kwast T. H., et al. Expression and prognostic value of CD44 isoforms in nephroblastoma (Wilms' tumor) // *Journal of Urology*, 2002; 168 (2): 681-686.
107. Gonzalez-Crussi F., Goldschmidt R. A, Hsueh W., Trujillo Y.P. Infantile sarcoma with intracytoplasmic filamentous inclusions: distinctive tumor of possible histiocytic origin // *Cancer*; 1982, 49(11):2365-2375.
108. Grønskov K., Olsen J. H., Sand A. Population-based risk estimates of Wilms tumor in sporadic aniridia. A comprehensive mutation screening procedure of PAX6 identifies 80% of mutations in aniridia // *Human Genetics*, 2001; 109 (1): 11-18.
109. Goldstein N. S, Uzieblo A. WT1 immunoreactivity in uterine papillary serous carcinomas is different from ovarian serous carcinomas // *American Journal of Clinical Pathology*, 2002; 117 (4): 541-545.

110. Gooskens S. L. M., Furtwängler R., Vujanic G. M., et al. Clear cell sarcoma of kidney: A review // *European Journal of Cancer*, 2012;
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804912003504> (sk. 19.06.2012.)
111. Govender D., Harilal P., Hadley G. P., Chetty R. p53 protein expression in nephroblastomas: a predictor of poor prognosis // *British Journal of Cancer*, 1998; 77 (2): 314-318.
112. Graziano F., Mandolesi A., Ruzzo A., et al. Predictive and prognostic role of E-cadherin protein expression in patients with advanced gastric carcinomas treated with palliative chemotherapy // *Tumour Biology*, 2004; 25(3):106-110.
113. Green D. M., Breslow N. E., Beckwith J. B., Norkool P. Screening of children with hemihypertrophy, aniridia, and Beckwith- Wiedemann syndrome in patients with Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study // *Medical and Pediatric Oncology*, 1993; 21 (3): 188-192.
114. Grignon D. J., McIsaac G. P., Armstrong R.F., Wyatt J. K. Primary rhabdomyosarcoma of the kidney, a light microscopic, immunohistochemical, and electron microscopic study // *Cancer*, 1998; 62 (9):2027-2032.
115. Grundy P. E., Breslow N. E., Li S., et al. Loss of heterozygosity of chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable- histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group // *Journal of Clinical Oncology*, 2005; 23 (29): 7312- 7321.
116. Gumbiner B., Simons K. A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide // *The Journal of Cell Biology*, 1986; 102(2):457-468.
117. Gupta D. K., Sharma S., Agarwala S., Carachi R. Saga of Wilms' tumor: lessons learnt from the past // *Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons*, 2005; 10 (4): 217-228.
118. Haas J. E., Bonadio J. F., Beckwith J. B. Clear cell sarcoma of the kidney with emphasis on ultrastructural studies // *Cancer*, 1984; 54(12):2978-2987.
119. Haas J. E., Palmer N. F., Weinberg A. G. et al. Ultrastructure of malignant rhabdoid tumor of the kidney. A distinctive renal tumor of children // *Human Pathology*, 1981; 12: (7) 646-657.
120. Haber D. A., Englert C., Maheswaran S. Functional properties of WT1 // *Medical and Pediatric Oncology*, 1996; 27 (5): 453-455.
121. Haber D. A., Sohn R. L., Buckler A. J., et al. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992; 88(21):9618-9622.
122. Hall A. P. The role of angiogenesis in cancer // *Comparative Clinical Pathology*, 2005; 13 (3): 95-99.
123. Heidelberger K. P., Ritchey M. L., Dauser R. C., et al. Congenital mesoblastic nephroma metastatic to the brain // *Cancer*, 1993; 72 (8): 2499- 2502.
124. Hempel L., Sauerbrey A., Zintl F., et al. Successful management of a child with clear cell sarcoma of the kidney (CCSK) and multifocal bone metastases at diagnosis // *Medical and Pediatric Oncology*, 2003; 41(1):97-99.
125. Hill D. A., Shear T. D., Liu T., et al. Clinical and biologic significance of nuclear unrest in Wilms tumor // *Cancer*, 2003; 97 (9)- 2318- 2326.

126. Hoot A.C., Russo P., Judkins A.R., et al. Immunohistochemical analysis of hSNF5/INI1 distinguishes renal and extra-renal malignant rhabdoid tumors from other pediatric soft tissue tumors // *The American Journal of Surgical Pathology*, 2004; 28(11):1485-1491.
127. Hsueh C., Wang H., Gonzalez-Crussi F., et al. Infrequent p53 gene mutations and lack of p53 protein expression in clear cell sarcoma of the kidney: immunohistochemical study and mutation analysis of p53 in renal tumors of unfavorable prognosis // *Modern Pathology*, 2002; 15(6):606-610.
128. Huff V. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene // *Nature Reviews. Cancer*, 2011; 11(2):111-121.
129. Hung N. A. Congenital "clear cell sarcoma of kidney" // *Virchows Archiv*, 2005; 446(5):566-568.
130. Ickowski K. A. Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer // *American Journal of Translational Research*, 2011; 3 (1): 1-7.
131. Ickowski K. A., Pantazis C. G., Collins J. The loss of expression of CD44 standard and variant isoforms is related to prostatic carcinoma development and tumor progression // *Journal of Urologic Pathology*, 1997; 6: 119-129.
132. Indolfi P., Terenziani M., Casale F., et al. Renal cell carcinoma in children: a clinicopathologic study // *Journal of Clinical Oncology*, 2003; 21(3):530-535.
133. Isaacs J. H. Fetal and neonatal renal tumors // *Journal of Pediatric Surgery*, 2008; 43 (9): 1587- 1595.
134. Jadali F., Sayadpour D., Rakhshan M., et al. Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic factor in Wilms tumor // *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 2011; 5(3):149-153.
135. Jankauskiene A., Drustė- Kurilavičienė S., Puzinas A. Nephrectomy to children (in lithuanian) // *Medicinos teorija ir praktika*, 2009; 71-75.
136. Jones C., Jones- Pritchard K. Letters to the Editor. MIB-1 and p27^{Kip1} Expression in Nephroblastoma // *Clinical Cancer Research*, 2004; 10 (22): 7785-86.
137. Joshi V.V, Beckwith J.B., Multilocular cyst of the kidney (cystic nephroma) and cystic, partially differentiated nephroblastoma. Terminology and criteria for diagnosis // *Cancer*, 1989; 64(2):466-479.
138. Judkins A. R., Mauger J., Ht A., et al. Immunohistochemical analysis of hSNF5/INI1 in pediatric CNS neoplasms // *The American Journal of Surgical Pathology*, 2004; 28(5):644-650.
139. Juric I., Pogorelic`Z., Prusac- Kuzmic I. et al. Expression and prognostic value of the KI-67 in Wilms tumor: experience with 48 cases // *Pediatric Surgery International*, 2010; 26 (5): 487-493.
140. Juszkievicz P. Immunohistochemical evaluation of the percentage of proliferating neoplastic cells of Wilms' tumor in children by means of the MIB-1 monoclonal antibody // *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, 1997; 43:113-27.
141. Juszkievicz P., Tuziak T., Zbislowski W. et al. Tumour cell proliferation rate as determined by MIB-1 antibody in Wilms tumor // *Polish Journal of Pathology*, 1997; 48 (2): 113-119.
142. Kabiri M., Sichani M. M., Taheri D., et al. Prognostic value of CD44 in renal cell carcinoma // *Journal of Research in Medical Sciences*, 2006; 11(4): 252-256.

143. Kayton M. L., Rowe D. H., O'Toole K. M., et al. Metastasis correlates with production of vascular endothelial growth factor in a murine model of human Wilms' tumor // *Journal of Pediatric surgery*, 1999; ;34(5):743-747.
144. Keiserling E., Ruck P., Handgretinger R., et al. Immunohistochemical and cytogenetic findings in malignant rhabdoid tumor // *General & Diagnostic Pathology*, 1996; 141(5-6):327-337.
145. Keiša L., Tūce L., Uruma A. Nefroblastiskie audzēji bērnu vecumā // RSU VIII Morfoloģisko zinātņu konference. Referātu tēzes, 2003; 46-47.lpp.
146. Khine M. M., Aung W., Sibbons P. D., et al. Analysis of relative proliferation rates of Wilms' tumor components using proliferating cell nuclear antigen and MIB-1 (Ki-67 equivalent antigen) immunostaining and assessment of mitotic index // *Laboratory Investigations*, 1994, 70(1):125-129.
147. Kidd J. M. Exclusion of certain renal neoplasms from the category of Wilms' tumor // *American Journal of Pathology*, 1970; 59: 16a.
148. Klein G., Steiner M., Wiener F., Klein E. Human leukemia associated anti- nuclear reactivity // *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 1974; 71(3): 685-689.
149. Köhler B., Schumacher V., Shulte- Overberg U., et al. Bilateral Wilms tumor in a boy with severe hypospadias and cryptorchidism due to a heterozygous mutation in the WT1 gene // *Pediatric Research*, 1999; 45 (2): 187-90.
150. Kokashi K., Oda Y., Nakamori M., et al. Multifocal metanephric adenoma in childhood // *Pathology International*, 2009; 59(1): 49-52.
151. Krasts J. Biežākās bērnu onkoloģiskās slimības // *Bērnu ķirurģija* / A. Pētersona red.- Rīga: Nacionālais apgāds, 2005.- 562-591 lpp.
152. Krishnamurthy J., Ramsey M. R., Ligon K. L. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential // *Nature*, 2006; ;443(7110):453-457.
153. Kumar S., Carr T., Marsden H. B., Calabuig-Crespo M. C. Study of childhood renal tumours using antisera to fibronectin, laminin, and epithelial membrane antigen // *Journal of Clinical Pathology*, 1986; 39(1):51-57.
154. Lahoti C., Thorner P., Malkin D., Yeger H. Immunohistochemical detection of p53 in Wilms' tumors correlates with unfavorable outcome // *The American Journal of Pathology*, 1996; 148(5):1577-1589.
155. Lawler W., Marsden H. B., Palmer M. K. Wilms tumor-histologic variations and prognosis // *Cancer*, 1975; 36 (5): 1122-1126.
156. Lawler W., Marsden H. B., Palmer M. K. Histopathological study of the first medical research council nephroblastoma trial // *Cancer*, 1977; 40 (4): 1519-1525.
157. Lee C. T., Capodiceci P., Osman I., et al. Overexpression of the cyclin- dependent kinase inhibitor p16 is associated with tumor recurrence in human prostate cancer // *Clinical Cancer Research*, 1999; 5(5):977-983.
158. Leong A. S-Y., Cooper K., Leong F. J. W. -M. Cytokeratins // *Manual of diagnostic antibodies for immunohistology* / Ed. by Leong A. S-Y., Cooper K., Leong F. J. W.- 2nd ed.- London: Greenwich Medical Media Ltd, 2003.- Pp. 167-170.
159. Leong A. S-Y., Cooper K., Leong F. J. W. -M. P53 // *Manual of diagnostic antibodies for immunohistology* / Ed. by Leong A. S-Y., Cooper K., Leong F. J. W.- 2nd ed.- London: Greenwich Medical Media Ltd, 2003.- Pp. 349-351.

160. Liggett W. H. Jr., Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer // *Journal of Clinical Oncology*, 1998; 16(3):1197-1206.
161. Linzer D. I. , Levine A. J. Characterization of 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells // *Cell*, 1979; 17 (1): 43-52.
162. Little M., Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations // *Human Mutations*, 1997; 9 (3): 209-225.
163. Little S. E., Hanks S. P., King- Underrwood L., et al. Frequency and heritability of WT1 mutations in nonsyndromic Wilms' tumor patients: a UK Children's Cancer Study Group Study // *Journal of Clinical Oncology*, 2004; 22 (20): 4140- 4146.
164. Liu L., Qian J., Bostwick D.G. Immunohistology of the prostate, bladder, testis and kidney. *Kidney // Diagnostic immunohistochemistry / Ed. by Dabbs D.-2st ed.- Philadelphia: Churchill Livingstone, 2006. – Pp. 595-610.*
165. Loeb D. M., Sukumar S. The role of WT1 in oncogenesis: tumor suppressor or oncogene? // *International Journal of Hematology*, 2002; 76(2):117-126.
166. Longnoni E., Berti G. L., Paccaduscio A. Metanephric adenoma: case report and review of the literature // *Archivio Italiano di Urologia, Andrologia*, 2004; 76(3):121-123.
167. Lowe L. H., Isuani B. H., Heller R. M., et al. Pediatric renal masses: Wilms tumor and beyond // *Radiographics*, 2000; 20(6):1585-603.
168. Luithle T., Szavay P., Furtwängler R. Treatment of cystic nephroma and cystic partially differentiated nephroblastoma--a report from the SIOP/GPOH study group // *The Journal of urology*, 2007; 177(1):294-296.
169. Mailman M. D., Muscarella P., Schirmer W. J., et al. Identification of MEN1 mutations in sporadic enteropancreatic neuroendocrine tumors by analysis of parafin- embedded tissue // *Clinical Chemistry*, 1999; 45(1):29-34.
170. Malik, K.T.A., Yan, P., Huang TH-M., et al. Wilms' tumor: A paradigm for the new genetics // *Oncology Research*, 2001; 12 (11—12), 441-449.
171. Malkin D., Sexsmith E., Yeger H., et al. Mutations of the p53 tumor suppressor gene occur infrequently in Wilms' tumor // *Cancer Research*, 1994; 54(8):2077-2079.
172. Marsden H.B., Lawler W., Kumar P. M. Bone metastasizing renal tumor of childhood: morphological and clinical features, and differences from Wilms' tumor // *Cancer*, 1978; 42(4):1922-1928.
173. Martignoni G., Amin M. B. Angiomyolipoma // *World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs / Ed. by Eble J. N., Sauter G., Epstein J.I. & Sesterhenn A. I.- Lion: IARC Press 2004. - Pp. 65-67.*
174. Maw A. M., Grundy P. E., Millow J. L., et al. Third Wilms tumor locus on Chromosome 16q // *Cancer Research*, 1992; 52 (9): 3094-3098.
175. Mayes L. C, Kasselberg A. G, Roloff J. S, Lukens J. N. Hypercalcemia associated with immunoreactive parathyroid hormone in a malignant rhabdoid tumor of the kidney (rhabdoid Wilms' tumor) // *Cancer*, 1984; 54(5):882-884.
176. Mazzoleni S., Vecchiato L., Alaggio R., et al. Clear cell sarcoma of the kidney in a newborn // *Medical and Pediatric Oncology*, 2003; ;41(2):153-155.
177. Medeiros L. J. Renal cell carcinoma associated with neuroblastoma // *World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics, Tumours of the Urinary*

- System and Male Genital Organs / Ed. by Eble J. N., Sauter G., Epstein J.I. & Sesterhenn A. I.- Lion: IARC Press 2004. - Pp. 39.
178. Melk A., Schmidt B. M. , Takeuchi O., et al. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney // *Kidney International*, 2004 ;65(2):510-20.
 179. Miyoshi Y., Ando A., Egawa C., et al. High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients // *Clinical Cancer Research*, 2002; 8(5):1167-1171.
 180. Moll R., Franke W. W., Schiller D. L., et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells // *Cell*, 1982; 31(1):11-24.
 181. Monkeviča V., Šakalova I. Results of Wilms' Tumor Treatment in Children's Clinical University Hospital 2001—2010 // 6th Baltic Sea Region Conference in Medical Sciences. Abstract book, 2011; 161-162.
 182. Morgan E., Kidd J. M. Undifferentiated sarcoma of the kidney: a tumor of childhood with histopathologic and clinical characteristics distinct from Wilms' tumor // *Cancer*, 1978; 42(4):1916-1921.
 183. Mrowka C., Schedl A. Wilms' tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features // *Journal of American Society of Nephrology*, 2000; Suppl 16:S106-15.
 184. Muir T. E., Cheville J. C., Lager D. J. Metanephric adenoma, nephrogenic rests, and Wilms' tumor: a histologic and immunophenotypic comparison // *The American Journal of Surgical Pathology*, 2001; 25 (10): 1290- 1296.
 185. Mundlos S., Pelletier J., Darveau A., et al. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues // *Development*, 1993; 119(4):1329-1341.
 186. Nagoshi M., Tsuneyoshi M. Expression of proliferating cell nuclear antigen in Wilms' tumors and other pediatric renal tumors: the correlation between histologic classification and proliferative activity // *Journal of Surgical Pathology*, 1994; 55(2):114-21.
 187. Naor D., Nedvetzki S., Golan I., et al. CD44 in cancer // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2002; 39(6): 527-579.
 188. Naor D., Sionov R. V., Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process // *Advances in Cancer Research*, 1997; 71: 241-319.
 189. Narod s. A., Hawkins M. M., Robertson C. M., Stiller C. A. Congenital anomalies in childhood cancer in Great Britain // *American Journal of Human genetics*, 1997; 60 (3): 474-485.
 190. Natrajan R., Little S. E., Reis- Filho J. S., et al. Amplification and overexpression of CCNA1E correlates with relapse in favorable histology Wilms' tumors // *Clinical Cancer Research*, 2006; 12 (24): 7284- 7293.
 191. Natrajan R., Warren W., Messhael B., et al. Complex patterns of chromosome 9 alterations including the p16^{INK4a} locus in Wilms tumours // *Journal of Clinical Pathology*, 2008; 61 (1): 95-102.
 192. Netinatsunthorn W., Hanprasertpong J., Dechsukhum C., Leetanaporn R., et al. WT1 gene expression as a prognostic marker in advanced serous epithelial ovarian carcinoma: an immunohistochemical study // *BMC Cancer*, 2006; 6:90

193. Nielsen G. P., Stemmer-Rachamimov A. O., Shaw J., et al. Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues // *Laboratory Investigation*, 1999; 79(9):1137-1143.
194. Nobori T., Miura K., Wu D. J., et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers // *Cancer*, 1994; 368(6473):753-756.
195. Nowicki M., Ostalska-Nowicka D., Kaczmarek M., et al. The significance of VEGF-C/VEGFR-2 interaction in the neovascularization and prognosis of nephroblastoma (Wilms' tumour) // *Histopathology*, 2007; 50(3):358-364.
196. Ozluk Y., Kilicaslan I., Gulluoglu M. G., et al. The prognostic significance of angiogenesis and the effect of vascular endothelial growth factor on angiogenic process in Wilms' tumour // *Pathology*, 2006; 38(5):408-14.
197. Paner G. P., Turk T. M., Clark J. I., et al. Passive seeding in metanephric adenoma. A review of pseudometastatic lesions in perinephric lymph nodes // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2005; 129 (10):1317-1321.
198. Parenti R., Perris R., Vecchio G. M., et al. Immunohistochemical expression of Wilms' tumor protein (WT1) in developing human epithelial and mesenchymal tissues // *Acta Histochemica*, 2012 //
199. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128112000633>.
200. Parham D.M., Peiper S.C., Robicheaux G., et al. Malignant rhabdoid tumor of the liver. Evidence for epithelial differentiation // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 1988; 112(1):61-64.
201. Park S., Bernard A., Bove K. E., et al. Inactivation of WT1 in nephrogenic rests, genetic precursors to Wilms' tumor // *Nature Genetics*, 1993; 5 (4): 363-367.
202. Payá A., Alenda C. , Pérez-Carbonell L. Utility of p16 immunohistochemistry for the identification of Lynch syndrome // *Clinical Cancer Research*, 2009; 15(9):3156-3162.
203. Perlman E. J. Paediatric renal tumours: practical updates for the pathologist // *Pediatric and Developmental Pathology*, 2005; 8 (3): 320-338.
204. Perlman E. J. Renal tumors // *Potter's Pathology of the Fetus, Infant and Child* / Ed. by Gilbert-Barness E. - 2nd. edition. - New York: Mosby Elsevier, 2007.-Pp. 1345- 1355.
205. Perlman E. J., Boccon-Gibod L. Nephrogenic rests and nephroblastomatosis // *World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs* / Ed. by Eble J.N. , Sauter G. , Epstein J. I. & Sesterhenn A. I. - Lion: IARC Press, 2004. – Pp. 53- 54.
206. Perlman E. J., Grosfeld J. L. , Togashi K. , Boccon-Gibod L. Nephroblastoma // *World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs* / Ed. by Eble J.N. , Sauter G. , Epstein J. I. & Sesterhenn A. I. - Lion: IARC Press, 2004. – Pp. 48- 52.
207. Perry A., Fuller E. C, Judkins A. R., et al. INI1 expression is retained in composite rhabdoid tumors, including rhabdoid meningiomas // *Modern Pathology*, 2005; 18 (7): 951-958.
208. Pettinato G., Manivel J. C, Wick M. R., Dehner L. P. Classical and cellular (atypical) congenital mesoblastic nephroma: a clinicopathologic, ultrastructural, immunohistochemical, and flow cytometric study // *Human Pathology*, 1989; 20(7):682-690.
209. Picken M. M., Curry J. L., Lindgren V., Clark J. I. Metanephric adenosarcoma in a young adult: morphologic, immunophenotypic, ultrastructural, and fluorescence in situ

- hybridization analyses: a case report and review of the literature // the American Journal of surgical Pathology, 2001; 25(11):1451-1457.
210. Pins M. R., Jones E. C., Vazquez Martu E., et al. Metanephric adenoma- like tumors of the Kidney: report of 3 malignancies with emphasis on discriminating features // Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 1999; 123 (5): 415-420.
 211. Piepenhagen P. A., Nelson W. J. Biogenesis of polarized epithelial cells during kidney development in situ: roles of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and membrane cytoskeleton organization // Molecular Biology of the Cell, 1998; 9(11):3161-177.
 212. Pjanova D., Engele L., Randerson-Moor J. A., et al. CDKN2A and CDK4 variants in Latvian melanoma patients: analysis of a clinic based population // Melanoma Reserch, . 2007;17(3):185-91
 213. Porteus M.H., Narkool P., Neuberg D., et al. Characteristics and outcome of children with Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group // Journal of clinical oncology; 2000; 18(10):2026-2031.
 214. Puig S., Malveyh J., Badenas C., et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas // Journal of clinical oncology, 2005, ;23(13):3043-3051.
 215. Ramani P., Bradley N. J., Fletcher C. D. QBEND/10, a new monoclonal antibody to endothelium: assessment of its diagnostic utility in paraffin sections // Histopathology, 1990; 17(3):237-42.
 216. Ramani P., Cowell J. K. The expression pattern of Wilms' tumour gene (WT1) product in normal tissues and paediatric renal tumours // The Journal of Pathology, 1996; 179 (2): 162-8.
 217. Ramburan A., Hadley G. P, Govender D. Expression of E-cadherin, cadherin-11, alpha-, beta- and gamma-catenins in nephroblastomas: relationship with clinicopathological parameters, prognostic factors and outcome // Pathology, 2006; 38(1):39-44.
 218. Reinhard H., Aliani S., Ruebe C., et al. Wilms' tumor in adults: results of the Society of Pediatric Oncology (SIOP) 93-01 / Society of Pediatric Oncology and Hematology (GPOH) Study // Journal of Clinical Oncology, 2004; 22 (22): 4500- 4506.
 219. Reinhard H., Reinert J., Beier R., et al. Rhabdoid tumors in children: prognostic factors in 70 patients diagnosed in Germany // Oncology Reports, 2008; 19(3):819-823.
 220. Ries L. A. G., Percy L. C., Bunin G. R. Introduction // Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995 / Ed. by Ries L. A. G., Smith M. A., Gurney J. G. et al. Bethesda, MD: National Cancer Institute, SEER Program, 1999.- NIH Pub No. 99-4649.
 221. Risinger J. I., Berchuck A., Kohler M. F., Boyd J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers // Nature Genetics, 1994; 7(1):98-102.
 222. Rivera M.N., Kim W.J., Wells J., et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor // Science, 2007; 315(5812):642-5.
 223. Ro J. Y., Kim R. K., Argani P., Landany M. Synovial sarcoma of the kidney// World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs / Ed. by Eble J. N., Sauter G., Epstein J.I. & Sesterhenn A. I.- Lion: IARC Press 2004. - Pp. 79-80.
 224. Roelens, J., Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., et al. p16INK4a immunocytochemistry versus human papilloma virus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities // Cancer Cytopathology, 2012; . doi: 10.1002/cncy.21205

225. Rosai J. Pediatric tumors and tumorlike conditions. // Rosai and Ackerman's Surgical pathology / Ed. by Rosai J. - 9th ed.- Edinburg, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Mosby, 2004.- Pp 1240-1251.
226. Rowe D. H., Huang J., Kayton M. L., et al. Anti-VEGF antibody suppresses primary tumor growth and metastasis in an experimental model of Wilms' tumor // Journal of Pediatric Surgery, 2000; ;35(1):30-2.
227. Rowe D. H., Kayton M. L., O'Toole K. M., et al. Pathological angiogenesis in a murine model of human Wilms' tumor // Journal of Pediatric Surgery, 1999; 34(5):676-679.
228. Royds J.A., Al Nadaf S., Wiles A.K., et al. The CDKN2 G500 allele is more frequent in GBM patients with no telomere maintenance mechanism tumors and is associated with poorer survival // PLoS One. 2011;6(10):e26737. doi: 10.1371/journal.pone.0026737. Epub 2011 Oct 26.
229. Rubin B. P., Chen C. J., Morgan T. W., et al. Congenital mesoblastic nephroma t(12;15) is associated with ETV6-NTRK3 gene fusion: cytogenetic and molecular relationship to congenital (infantile) fibrosarcoma // The American Journal of Pathology, 1989; 153(5):1451-1458.
230. Ruteshouser E.C., Huff V. Familial Wilms tumor // American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics, 2004; 129 C(1):29-34.
231. Safford S. D., Freerman A. J., Langdon S., Bentley R .Decreased E-cadherin expression correlates with higher stage of Wilms' tumors // Journal of Pediatric Surgery , 2005; 40 (2): 341-348.
232. Saida T. Recent advances in melanoma research // Journal of Dermatological Science, 2001; 26(1):1-13.
233. Sakamoto J., Takata A., Fukuzawa R., et al. A novel WT1 gene mutation associated with Wilms' tumor and congenital male genitourinary malformation // Pediatric Research, 2001; 50 (3): 337-334.
234. Sanches Lockhart M., Hajos S. E., Basilio F. M., et al. Splice variant expression of CD44 in patients with breast and ovarian cancer // Oncology Reports, 2001; 8 (1): 145-151.
235. Schmidt D. Nephroblastomas (Wilms' tumors) and special variations of nephroblastomas // Veröffentlichungen aus der Pathology, 1989; 133:1-174.
236. Schulz S., Becker K. F., Braungart E., et al. Molecular analysis of E-cadherin and cadherin-11 in Wilms' tumours // The Journal of Pathology, 2000; 191(2):162-169.
237. Schumacher V., Schneider S., Figge A., et al. Correlation of germ- line mutations and two- hit inactivation of the WT1 gene whit Wilms tumors of stromal predominant histology // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997; 94 (8): 3972-3977.
238. Schraml P., Struckmann K., Bednar R., et al. CDKNA2A mutation analysis, protein expression, and deletion mapping of chromosome 9p in conventional clear-cell renal carcinomas: evidence for a second tumor suppressor gene proximal to CDKN2A // The American Journal of Pathology, 2001; 158(2):593-601.
239. Skotnicka-Klonowicz G., Kobos J., Łoś E., et al. Prognostic value of p53 expression in Wilms' tumor in children // Medical Science Monitor, 2001, 7(6):1224-1229.
240. Scott R. H., Douglas J., Baskcomb L., et al. Constitutional 11p15 abnormalities, including heritable imprinting centre mutations, cause nonsyndromic Wilms tumor // Nature Genetics, 2008; 40 (11): 1329-1334.

241. Shao L., Hill D. A, Perlman E. J. Expression of WT-1, Bcl-2 and CD34 by primary renal spindle cell tumors in children // *Pediatric and Developmental Pathology*, 2004; 7 (6):577-582.
242. Sebire J.N. Renal pathology // *Diagnostic Pediatric Surgical Pathology* / Ed. by Sebire J. N., Malone M., Answorth M., Jacques T. S. — 1st ed. — Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2010. — Pp. 1-103.
243. Sebire J. N, Vujanic G. M. Paediatric renal tumors: recent development, new entities and pathological features // *Histopathology*, 2009; 54 (5):516-528.
244. Sévenet N., Lellouch-Tubiana A., Schofield D., et al. Spectrum of hSNF5/INI1 somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations // *Human Molecular Genetics*, 1999; 8(13):2359-2368.
245. Sellaturay S. V., Arya M., Banisadr S., Murthi G.V., et al. Primary intrarenal neuroblastoma: a rare, aggressive tumour of childhood mimicking Wilms' tumour // *Journal of Pediatric Urology*, 2006; 2(5):522-524.
246. Serrano M., Hannon G. J., Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 // *Nature*, 1993; 704-707.
247. Sévenet N., Sheridan E., Amram D., et al. Constitutional mutations of the hSNF5/INI1 gene predispose to a variety of cancers // *American Journal of Human Genetics*, 1999; 65(5):1342-1348.
248. Silberstein J., Grabowski J., Saltzstein S.L., Kane C. J. Renal cell carcinoma in the pediatric population: Results from the California Cancer Registry // *Pediatric Blood & Cancer*, 2009; 52(2):237-241.
249. Singh K. P., Roy D. SKCG-1: a new candidate growth regulatory gene at chromosome 11q23.2 in human sporadic Wilms tumours // *British Journal of Cancer*, 2006; 94 (10): 1524-1532.
250. Sköldenberg E. G., Christiansson J., Sandsted B. et al. Angiogenesis and angiogenetic growth factors in Wilms tumor // *The Journal of Urology*, 2001; 165 (6): 2274-2279.
251. Sköldenberg E. G. Angiogenesis in Childhood Malignancies, 2003 // <http://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:162998/FULLTEXT01> (sk.21.07.2012)
252. Sredni S. T., de Camargo B., Lopes L. F., et al. Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic indicator in Wilms tumor // *Medical and Pediatric Oncology*, 2001; 37(5):455-458.
253. Steliarova-Foucher E., Stiller C., Lacour B., Kaatsch P. International Classification of Childhood Cancer, third edition // *Cancer*, 2005; 103 (7):1457-67.
254. Stoll M., Dalchau R., Shmidt R. E. N6 Cluster report: CD44 // *Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference* / Ed. by Knapp W., Dörken B., Gilks W. R., et al.- 1989 Feb 21-25 Vienna, Austria - Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1989.- Pp. 619-622.
255. Straume O., Akslen L. A. Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expressions in subgroups of cutaneous melanoma // *International Journal of Cancer*, 1997; 74(5):535-539.
256. Sutherland R.W., Wiener J.S., Hicks M. J. Congenital mesoblastic nephroma in a child with the Beckwith-Wiedemann syndrome // *The Journal of Urology*, 1997; 158(4):1532-1553.

257. Swartz M.A., Karth J., Schneider D.T., et al. Renal medullary carcinoma: clinical, pathologic, immunohistochemical, and genetic analysis with pathogenetic implications // *Urology*, 2002; 60(6):1083-1089.
258. Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis // *Development*, 1988; 102 (4): 639-655.
259. Tamaro P. Wilms`tumor: reached progress and future prospects // <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9417294> (sk. 25.05.2010).
260. Taran K., Kobos J., Sporny S. Examination of Expression of WT1 gene product and CD44 adhesive molecule in nephroblastoma histologic types // *Polish Journal of Pathology*, 2008; 59 (3):177-182.
261. Tay J. Molecular genetics of Wilms tumor // *Journal of Paediatric and Child Health*, 1995; 31 (5): 379-383.
262. Taylor M.D., Gokgoz N., Andrulis I. L., et al. Familial posterior fossa brain tumors of infancy secondary to germline mutation of the hSNF5 gene // *American Journal of human Genetics*, 2000; 66(4):1403-1406.
263. Terpe J. H., Störkel S., Zimmer U., et al. Expression of CD44 isoforms in renal cell tumors. Positive Correlation to Tumor Differentiation // *American Journal of Pathology*, 1996; 148 (2): 453-463.
264. Thorner P., Squire J., Plavsic N. et al. Expression of WT1 in pediatric small cell tumors: report of two cases with a possible mesothelial origin // *Pediatric and Developmental Pathology*, 1999; 2 (1):33-41.
265. Trindade F., Tellechea O., Torrelo A., et al. Wilms tumor 1 expression in vascular neoplasms and vascular malformations // *The American Journal of Dermatopathology*, 2011; 33(6):569-572.
266. Trobaugh-Lotrario A.D., Finegold M. J., Feusner J. H. Rhabdoid tumors of the liver: rare, aggressive, and poorly responsive to standard cytotoxic chemotherapy // *Pediatric Blood & Cancer*, 2011; 57(3):423-428.
267. Tsihlias J., Kapusta L., Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer // *Annual Review of Medicine*, 1999; 50:401-423.
268. Tsokos M., Kouraklis G., Chandra R. S, et al. Malignant rhabdoid tumor of the kidney and soft tissues. Evidence for a diverse morphological and immunocytochemical phenotype // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 1989; 113(2):115-120.
269. Tytgat G. A. M., de Kraker J. Pediatric renal tumors // <http://www.touchbriefings.com/download.cfm?fileID=16048> (sk.28.04.2012).
270. Udayakumar D., Mahato B., Gabree M., Tsao H. Genetic determinants of cutaneous melanoma predisposition // *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 2010; 29(3):190-195.
271. van den Heuvel-Eibrink M. M., Grundy P., Graf N., et al. Characteristics and survival of 750 children diagnosed with a renal tumor in the first seven months of life: A collaborative study by the SIOP/GPOH/SFOP, NWTSG, and UKCCSG Wilms tumor study groups // *Pediatric Blood & Cancer*, 2008; 50(6):1130-1134.
272. van den Heuvel-Eibrink M. M., van Tinteren H., Rehorst H. et al. Malignant rhabdoid tumours (MRTKs) registered on recent SIOP protocols from 1993 to 2005: A report of the SIOP renal tumour study group // *Pediatric Blood & Cancer*, 2011; 56: 733-737.

273. Verschuur A. C., Vujanic G. M., van Tinteren H., et al. Stromal and epithelial predominant Wilms tumours have an excellent outcome: the SIOP 93 01 experience // *Pediatric Blood & Cancer*, 2010; 55(2):233-238.
274. Vogel A. M., Gown A. M., Caughlan J., et al. Rhabdoid tumors of the kidney contain mesenchymal specific and epithelial specific intermediate filament proteins // *Laboratory Investigations, a Journal of Technical Methods and Pathology*, 1984; 50(2):232-238.
275. Vujanić G. M., Delemarre J. F., Moeslichan S., et al. Mesoblastic nephroma metastatic to the lungs and heart--another face of this peculiar lesion: case report and review of the literature // *Pediatric Pathology*, 1993; 13(2):143-153.
276. Vujanić G. M., Kelsey A., Perlman E. J., et al. Anaplastic sarcoma of the kidney: a clinicopathologic study of 20 cases of a new entity with polyphenotypic features // *The American Journal of Surgical Pathology*, 2007; ;31(10):1459-1468.
277. Vujanic G. M, Sandsted B., Harms D., et al. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) Working Classification of Renal tumors of Childhood // *Medical and Pediatric Oncology*, 2002; 38 (2):79-82.
278. Vujanic G. M, Sandsted B., Harms D., et al. Rhabdoid tumour of the kidney: a clinicopathological study of 22 patients from the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) nephroblastoma file // *Histopathology*, 1996; 28 (4):333-340.
279. Vujanic G. M., Sandsted B. The pathology of Wilms tumor (nephroblastoma): the International Society of Paediatric Oncology approach // *Journal of Clinical Pathology*, 2010; 63 (2): 102-109.
280. Wagner K. J., Cooper W. N., Grundy R. G., et al. Frequent RASSF1A tumour suppressor gene promoter methylation in Wilms tumour and colorectal cancer // *Oncogene*, 2002; ;21(47):7277-7282.
281. Wales M. M., Biel M. A., el Deiry W., et al. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3 // *Nature Medicine*, 1995; 1(6):570-577.
282. Watanabe N., Haruta M., Soejima H., et al. Duplication of the paternal IGF2 allele in trisomy 11 and elevated expression levels of IGF2 mRNA in congenital mesoblastic nephroma of the cellular or mixed type // *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2007; ;46(10):929-935.
283. Weeks D. A., Beckwith J. B, Mierau G. W., et al. Rhabdoid tumor of kidney. A Report of 111 cases from the National Wilms' Tumor Study Pathology Center // *The American Journal of Surgical Pathology*, 1989; 13 (6): 439-458.
284. Weeks D. A., Beckwith J. B, Mierau G. W, Zuppan C. W. Renal neoplasms mimicking rhabdoid tumor of kidney. A report from the National Wilms Tumor Study Pathology Center // *The American Journal of Surgical Pathology*, 1991; 15 (11): 1042-1054.
285. Wegert J., Wittmann S., Leuschner I., et al. WTX inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact // *Genes Chromosomes Cancer*, 2009; 48(12):1102-1111.
286. White F.V., Dehner L.P., Belchis D.A., et al. Congenital disseminated malignant rhabdoid tumor: a distinct clinicopathologic entity demonstrating abnormalities of chromosome 22q11 // *the American Journal of surgical Pathology*, 1999; 23(3):249-256.
287. Whittle S., Gosain A., Brown P. Y. S., et al. Regression of a congenital mesoblastic nephroma // *Pediatric Blood & Cancer*, 2010; 55 (2): 364-368.

288. Williams R. D., Al-Saadi R., Chagtai T., et al. Subtype-specific FBXW7 mutation and MYCN copy number gain in Wilms' tumor // *Clinical Cancer Research*, 2010; 16 (17): 2036- 2045.
289. Xu H. J., Quinlan D. C., Davidson A. G., et al. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early- stage non small lung cell carcinoma // *International Journal of Cancer*, 1994; 86(9):695-699.
290. Yao J., Pollock R., E., Lang A., et al. Infrequent mutation of the p16/MTS1 gene and overexpression of cyclin-dependent kinase 4 in human primary soft-tissue sarcoma // *Clinical Cancer Research*, 1998; 4(4):1065-1070.
291. Yuan C., Selby T. L., Li J., Byeon I.J. Tumor suppressor INK4: refinement of p16INK4A structure and determination of p15INK4B structure by comparative modeling and NMR data // *Protein science*, 2000; 9(6):1120- 1128.
292. Zhao W., Huang C. C., Otterson G. A. Altered p16(INK4) and RB1 Expressions Are Associated with Poor Prognosis in Patients with Nonsmall Cell Lung Cancer // *Journal of Oncology*; 2012, doi: 10.1155/2012/957437
293. Zuppan C. W., Beckwith J. B., Weeks D. A. et al. The effect of preoperative therapy on the histologic features of Wilms' tumors. An analysis of cases from the Third National Wilms' Tumor Study // *Cancer*, 1991; 68 (2): 385-394.

PATEICĪBAS

Sirsnīgi pateicos savai ģimenei sevišķi manam vīram *Robertam*, bez kura atbalsta, sapratnes un tehniskās palīdzības nebūtu iespējama šī darba tapšana.

Tāpat liels paldies par atbalstu un pastāvīgu palīdzību šī promocijas darba vadītājai RSU profesorei *Regīnai Kleinai* un RSU Patoloģijas katedras vadītājai asociētajai profesorei *Ilzei Štrumfai*, kā arī visiem maniem kolēģiem patologiem un histoloģijas laborantiem Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas Bērnu patoloģijas birojā.

Paldies par nesavtīgu palīdzību ģenētisko izmekējumu tapšanā sakāms bioloģijas zinātņu doktorei *Dacei Pjanovai* Latvija Universitātes Biomedicīnas studiju un pētījumu centrā.

Un protams, jāpateicas Rīgas Stradiņa universitātei un Eiropas Sociālajam fondam (Vienošanās Nr.2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009; projekts „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē”) par dāvāto iespēju veltīt kādu laiku zinātniskajam darbam, nedomājot par materiālajām grūtībām.