



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Ivanda Franckeviča

LATVIJAS BĒRNU NIERU
AUDZĒJU MORFOLOĢISKAIS,
IMŪNHISTOĶĪMISKAIS UN
ĢENĒTISKAIS RAKSTUROJUMS

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – patoloģija

Rīga, 2013

Promocijas darbs izstrādāts:

Rīgas Stradiņa universitātes Patoloģijas katedrā
VSIA Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas
Bērnu patoloģijas birojā

Darba zinātniskā vadītāja:

Dr. med., profesore **Regīna Kleina**, RSU Patoloģijas katedra

Oficiālie recenzenti:

Dr. med., asociētā profesore **Ilze Štrumfa**,
RSU Patoloģijas katedra

Dr. med., **Ruta Brūvere**,
Latvijas Biomedicīnas un pētījumu centrs

Dr. med., **Vitālijs Svjatoha**,
Karolinskas Universitātes slimnīca, Zviedrija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2013. gada 28. jūnijā plkst. 12.00
Rīgas Stradiņa universitātes Teorētiskās medicīnas Promocijas padomes
atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

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

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



Promocijas padomes sekretāre

Dr. habil. med., profesore **Līga Aberberga-Augškalne**

SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI.....	6
1. IEVADS	8
1.1. Pētījuma aktualitāte	8
1.2. Darba mērķis	9
1.3. Darba uzdevumi	10
1.4. Pētījuma hipotēzes.....	10
1.5. Pētījuma zinātniskā novitāte.....	10
1.6. Pētījuma praktiskā nozīme	11
1.7. Promocijas darba struktūra.....	11
2. MATERIĀLS UN METODES	12
2.1. Pētījuma uzbūve.....	12
2.2. Analizētā materiāla imūnhistoķīmiskā izmeklēšana	13
2.2.1. Histoloģiskās un imūnhistoķīmiskās audu apstrādes metodika	13
2.2.2. Imūnhistoķīmisko reakciju izvērtēšanas metodika analizēto nefroblastomu grupā	14
2.3. Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16 ^{INK4a} ģenētisko izmaiņu noteikšanas metodika nefroblastomu audos	15
2.3.1. DNS ekstrakcija no parafinā ieguldītiem audiem	15
2.3.2. CDKN2A/p16 ^{INK4a} gēna pavairošana izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju	16
2.3.3. CDKN2A/ p16 ^{INK4a} gēna sekvenēšana.....	16
2.3.4. Heterozigotitātes zuduma analīze CDKN2A lokusā izmantojot mikrosatelītu marķierus	16
2.4. Datu statistiskās apstrādes metodes	17
3. REZULTĀTI.....	19
3.1. Latvijas pediatriko nieru audzēju morfoloģiska spektra raksturojums	19
3.1.1. Primāro nieres audzēju morfoloģiska spektra raksturojums pēc sākotnējās histoloģiskās izmeklēšanas datiem.....	19
3.1.2. Primāro nieres audzēju morfoloģiskā spektra raksturojums pēc atkārtotas morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas datiem.....	20

3.1.3.	Primāro nieres audzēju morfoloģiskā spektra salīdzinājums pirms un pēc atkārtotas morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas	23
3.2.	Imūnhistoķīmiski noteikto, potenciāli prognostiski svarīgo marķieru ekspresija nefroblastomas gadījumā	25
3.2.1.	Pētītās grupas pacientu klīnisko un histoloģisko parametru raksturojums	25
3.2.2.	CD44s glikoproteīda izoformas ekspresija	26
3.2.3.	Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16 ^{INK4a} kodētā p16 ^{INK4a} proteīna ekspresija	28
3.2.4.	Ar šūnas proliferāciju saistītā kodolu antigēna Ki67 ekspresija	30
3.2.5.	P53 proteīna ekspresija.....	31
3.2.6.	E-kadherīna ekspresija.....	33
3.2.7.	CK AE1/AE3 ekspresija.....	34
3.2.8.	CD34 pozitīvo asinsvadu proliferācija	35
3.2.9.	Vilmsa audzēja nomācēja gēna proteīna ekspresija	36
3.2.10.	Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresivitātes savstarpējā saistība	37
3.3.	Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16 ^{INK4a} ģenētiskās izmaiņas nefroblastomas gadījumā	41
3.3.1.	Pētītās audzēju grupas raksturojums	41
3.3.2.	CDKN2A lokusa DNS sekvenēšanā iegūto ģenētisko izmaiņu analīze	41
3.3.3.	CDKN2A lokusa DNS sekvencēšanā iegūtā rezultāta un p16 ^{INK4A} proteīna imūnhistoķīmiskās ekspresijas salīdzinājums	43
4.	DISKUSIJA.....	44
4.1.	Latvijas bērnu nieru audzēju morfoloģiskā spektra analīze	44
4.2.	Imūnhistoķīmiskās un molekulāri ģenētiskās atradnes saistība ar klīniski morfoloģiskajiem datiem nefroblastomas gadījumā.....	47
4.2.1.	Potenciāli prognostiski nozīmīgo imunohistoķīmisko marķieru ekspresijas novērtējums	47
4.2.2.	Audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16 ^{INK4a} ģenētisko izmaiņu izvērtējums	55

5. SECINĀJUMI.....	58
6. PRAKTISKIE IETEIKUMI.....	60
7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	61
8. PUBLIKĀCIJAS.....	65
9. TĒZES UN ZIŅOJUMI KONFERENCĒS	66
PATEICĪBAS	67

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

A	- adenoziņš
BKUS	- Bērnu Klīniskā Universitātes slimnīca
Bcl-2	- bcl-2 (angļu val. B-cell chronic lymphocytic leukemia) gēna kodētais proteīns
Bp	- bāzu pāris
CDKN2A	- ciklīna atkarīgās kināzes inhibitora 2A gēns (angļu val. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)
CK	- citokeratīns
CKAE1/AE3	- kopējais citokeratīns (klons CKAE1/AE3)
CI	- ticamības intervāls (angļu val. confidence interval)
CMN	- cellulāra mezoblastiska nefroma
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)
g	- brīvās krišanas paātrinājums, ~9,81 m/s ²
G	- guanīns
H&E	- hematoksilīns eozīns
INK4a	- kināzes 4a inhibitors
LCA	- leukocītu kopējais antigēns
NSE	- neironu specifiskā enolāze
NWTSG	- Vilmsa audzēja izpētes grupa ASV (angļu val. - National Wilms Tumor Study Group)
M	- mainīgā lieluma vidējā aritmētiskā vērtība
Max	- mainīgo lielumu diapazona maksimālā vērtība
Min	- mainīgo lielumu diapazona minimālā vērtība
Mo	- moda, mainīgā lieluma visbiežāk sastopamā vērtība
n	- izlases apjoms (gadījumu skaits)
NŠV	- nieru šūnu vēzis
nt	- nukleotīds

NTRK3	- neirotrofiskās tirozīna kināzes receptoru gēns 3.tipa gēns (neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3)
p	- būtiskuma līmenis (varbūtība, ka spēkā ir nulles hipotēze)
PCR	- polimerāžu ķēdes reakcija (angļu val. polymerase chain reaction)
PI	- proliferācijas indekss
PNET	- primitīvs neuroektodermāls audzējs
r	- Spīrmena rangu korelācijas koeficients
SD	- mainīgā lieluma standartnovirze
SIOP	- starptautiskā Pediatrijas Onkoloģijas Biedrība (angļu val.- International Society of Paediatric Oncology)
Taq polimerāze	- termostabīlā termofilās baktērijas Thermus aquaticus DNS polimerāze
TBS	- buferēts tris(hidroksimetil) aminometāna šķīdums
Tris	- tris(hidroksimetil)aminometāns (ķīmiskā formula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$)
WT1	- Vilmsa audzēja nomācēja gēns

1. IEVADS

1.1. 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 [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 vecuma 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 piešķirta arī tāpēc, ka to ārstēšana un pacienta prognoze ļoti atšķiras atkarībā no diagnosticētā audzēja morfoloģiskā veida. Pasaulē to izpēti 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 nefroblastomas gadījumā bija novērojama 8% pacientu, tad 1960. gadā šo rādītāju sasniedza jau 50%, bet 2000. gadā 90% pacientu [Perlman, 2005] Līdzīgi arī nieru gaišo šūnu sarkomas gadījumā, uzsākot doksorubicīna pielietošanu, ķīmijterapijas protokolos, 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% šī audzēja pacientu mirst pirmajos piecos gados pēc

diagnozes noteikšanas [Malik et al., 2001]. Diskusijas rada arī novērotā dažādā audzēju reaktivitāte uz izdarīto ķīmijterapiju. 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 uzsvāru liekot uz molekulāri ģenētiskās patoloģijas, potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru un ķīmijterapijas izraisīto audzēja izmaiņu izpēti. 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, 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 ieskatu bērnu vecuma uroģenitālās sistēmas audzēju klasifikācijā sniedz Latvijā iznākušī 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. Histoloģiskā audzēju diagnostika notiek BKUS Bērnu Patoloģijas birojā. 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. Visi iepriekšminētie fakti nosaka izvēlētais promocijas darba tēmas aktualitāti, fundamentālo nozīmi un praktisko vērtību.

1.2. Darba mērķis

Veikt Latvijas bērnu nieru jaunveidojumu morfoloģiskā spektra izpēti un raksturot potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresiju, tās saistību ar klīniskajiem un morfoloģiskajiem rādītājiem, kā arī ģenētisko patoloģiju nefroblastomas gadījumā.

1.3. 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 supresora gēna CDKN2A/p16^{INK4a} izmaiņu un gēna kodētā proteīna p16^{INK4a} imūnhistoķīmiskās ekspresijas saistības analīzi.

1.4. Pētījuma hipotēzes

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

2. Imūnhistoķīmiskajai izmeklēšanai ir būtiska nozīme bērnu nieru audzēju diagnostikā.

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

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

1.5. Pētījuma zinātniskā novitāte

1. Pirmoreiz apkopoti 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.

1.6. Pētījuma 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.

1.7. Promocijas darba struktūra

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā. Tam ir klasiska uzbūve. Darbs aptver ievadu, literatūras apskatu, materiālu un metožu apskatu, rezultātus, diskusiju, secinājumus, praktiskos ieteikumus un literatūras avotu sarakstu. Promocijas darbs noformēts uz 181 lpp., tajā iekļautas 71 tabulas un 97 attēli. Darbā izmantoti 293 literatūras avoti.

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. Diagnosticēto audzēju audu histoloģiskais materiāls, BKUS Bērnu patoloģijas birojā noteiktās morfoloģiskās diagnozes un slimnieku klīnisko slimības vēsturu dati (tai skaitā personu apliecinātie), iegūti no BKUS arhīva. Sākotnēji, primāro nieru audzēju morfoloģiskā spektra noteikšanai un nefroblastomu padziļinātas izpētes grupas izveidošanai, izdarīts visu izmeklēto audzēju materiāla H&E (hematoksilīna- eozīna) mikropreparātu pārskats un BKUS Bērnu Patoloģijas birojā noteikto diagnožu imūnhistoķīmiska verifikācija. Diagnostiskos nolūkos imūnhistoķīmiskā izmeklēšana veikta 31 audzēja gadījumā jeb 63,26% no visiem diagnosticētajiem veidojumiem. Potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija primāras nefroblastomas gadījumā analizēta 26 primāro nefroblastomu 8 attālo metastāžu un 1 recidīva audu paraugos. Kopumā pētīti 35 gadījumi, izmantojot 8 potenciāli svarīgos imūnhistoķīmiskos marķierus. Primāro audzēju gadījumā pētniecība veikta sadalot veidojumus 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. Tāpat savstarpēji salīdzināta imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija primāro nefroblastomu un metastāžu/recidīva grupā. P16^{INK4a} proteīna ekspresija gan primāro, gan metastātisko audzēju gadījumā analizēta arī atkarībā no DNS sekvenčēšanā atklātajām audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16^{INK4a} izmaiņām. 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. Ģenētiski analizēto nefroblastomu gadījumā DNS izolēta no parafīnā ieguldītajiem audiem, DNS amplifikācija un sekvenčēšana veikta ar polimerāžu ķēdes reakcijas (PCR) palīdzību. DNS izolēšana no parafīnā ieguldītajiem audu paraugiem, sekojoša pavairošana un sekvenčēšana 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. Papildus veikta minētā lokusa mikrosatelītu marķieru analīze 14 primārā audzēja audu paraugos. 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 paraplasta (Diapath S.r.l. Bergamo, Itālija) blokos. Audzēju izmeklēšanai gan hematoksilīna-eozīna preparātos, gan imūnhistoķīmiskai vizualizācijai iegūti 3 µm biezi griezumī. Griezumi 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) izdarīta endogēnās peroksidāzes bloķēšana inkubējot audus 3% ūdeņraža peroksīda šķīdumā 5 minūtes. Diagnostiskiem nolūkiem izmantojotas 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) un INI1 proteīna noteikšanai (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. Visos etapos izmantotas adekvātas pozitīvās un negatīvās kontrolreakcijas.

2.2.2. 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. Analizējot CD44s ekspresiju, par pozitīvu uzskatīta membranoza reakcija. Stromālajā un blastematozajā komponentā CD44s ekspresija izvērtēta skaitot pozitīvās šūnas vienā redzes laukā (palielinājums x400) un procentuāli izsakot pozitīvi reaģējošo 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). P53 proteīna, Ki67 un p16^{INK4a} proteīna pozitivitāte tika izvērtēta skaitot pozitīvās šūnas vienā redzes laukā (palielinājums x400) un procentuāli izsakot pozitīvi reaģējošo 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). E-kadherīna ekspresija noteikta skaitot pozitīvo struktūru skaitu vienā redzes laukā (palielinājums x100) Par pozitīvu uzskatīta membranoza reakcija. WT1 proteīna ekspresija noteikta skaitot pozitīvās šūnas vienā redzes laukā (palielinājums x400) un procentuāli izsakot pozitīvi reaģējošo šūnu attiecību pret visām dotajā redzes laukā esošajām šūnām. 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.

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

2.3.1. DNS ekstrakcija no parafinā ieguldītiem audiem

DNS ekstrakcija no parafinā 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 parafinā 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 95°C temperatūrā 10 minūtes, kurai seko 35 cikli, kas sastāv no denaturācijas posma 95°C temperatūrā 30 sekundes, praimeru piesaistīšanās pie 55°C 30 sekundes un sintēzes 72°C temperatūrā 1 minūti, kam seko beigu sintēzes fāze 7 min 72°C temperatūrā. Darbā izmantotos praimerus iepriekš aprakstījusi D. Pjanova un citi [Pjanova et al., 2007]. Visi praimeri sintezēti Metabion International GA.

Lai pārliecinātos par PCR rezultātā iegūtā produkta esamību, materiāls analizēts 1,5% agarozes gēla elektroforēzē un vizualizēts ar etīdija bromīda (1μg/ml) palīdzību.

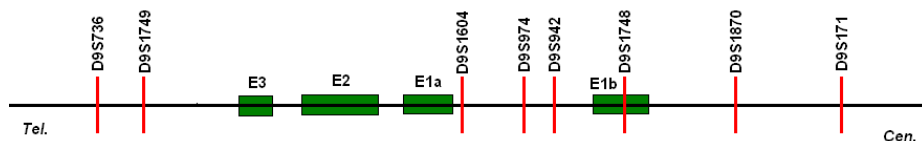
2.3.3. CDKN2A/ p16^{INK4a} gēna sekvenēšana

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 94°C temperatūrā 30 sekundes, praimeru piesaistīšanās 53°C temperatūrā 30 sekundes un sintēzes 60°C 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).

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). Izmantoto mikrosatelītu marķieru izvietojums CDKN2A lokusā ir parādīts 2.1. attēlā.



2.1. att. CDKN2A lokusa uzbūves shematiskais 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. Potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija primārās nefroblastomas grupās, kā arī metastāžu/recidīva grupā raksturota nosakot katra mainīgā vidējo aritmētisko lielumu, mainīgā lieluma standartnovirzi, vidējā aritmētiskā lieluma ticamības intervālu un mainīgo lielumu diapazonu. Iegūtie dati pārbaudīti normālajam sadalījumam izmantojot Kolmogorova-Smirnova kritēriju. Mainīgo sadalījums neatbilda normālajam,

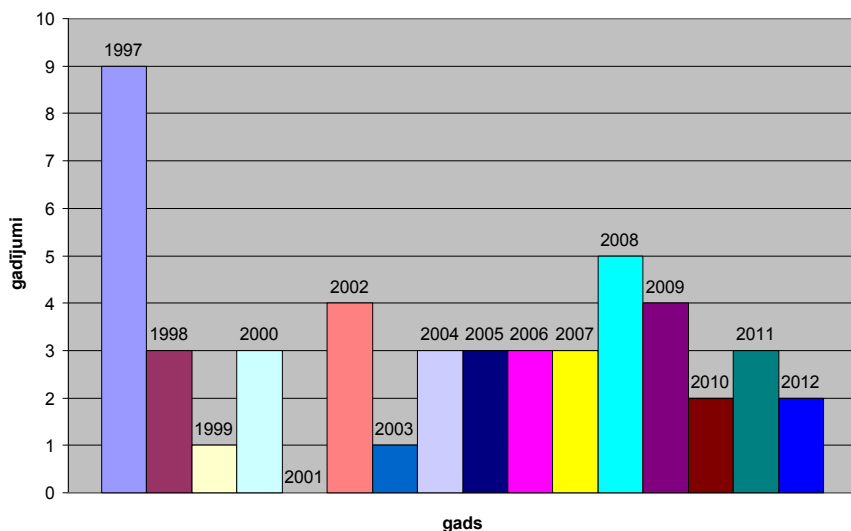
tāpēc turpmākajā analīzē izmantotas neparametriskās datu statistiskās apstrādes metodes. Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas salīdzināšanai starp primāro audzēju un metastāžu/recidīva grupu, kā arī savstarpēji dažādās primāro audzēju grupās tika izmantots Manna-Vitneja (Mann-Whitney) kritērijs. Par statistiski nozīmīgu uzskatīts būtiskuma līmenis (p), kas ir mazāks vai vienāds par 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. 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 imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas savstarpējo saistību lietota Spīrmena neparametriskā korelāciju analīze. Lai izvērtētu CDKN2A/p16^{INK4a} gēna analīzē atrastās izmaiņu lomu nefroblastomas attīstībā, to sastopamības biežums slimnieku grupā salīdzināts ar tās biežumu kontroles grupā izmantojot Fišera testu. Kontroles grupa sastāvēja no 203 praktiski veselīem, Valsts iedzīvotāju genoma datubāzes dalībniekiem, kuriem CDKN2A gēna analīze ir aprakstīta iepriekš [Pjanova et al., 2007].

3. REZULTĀTI

3.1. Latvijas pediatriisko nieru audzēju morfoloģiskā spektra raksturojums

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

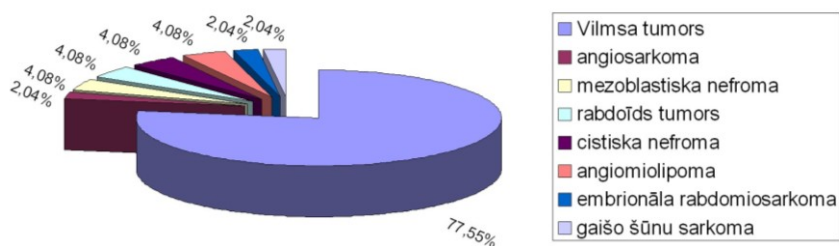
Klīniski diagnosticētu primāru nieru audzēju dēļ laika posmā no 1997. gada janvāra līdz 2012. gada jūlijam BKUS tika izdarītas 50 nefrektomijas un 3 daļējas nieru rezekcijas. Audzēja diagnoze morfoloģiski tika apstiprināta 49 jeb 92,45% no izmeklētajiem gadījumiem. Diagnosticēto audzēju sadalījums pa gadiem ir atspoguļots attēlā 3.1.



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

Analizējot VSIA 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 primāras nefroblastomas gadījumiem. Praktizējošo patologu birojā veiktās morfoloģiskās izmeklēšanas rezultāti parādīti attēlā 3.2.



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

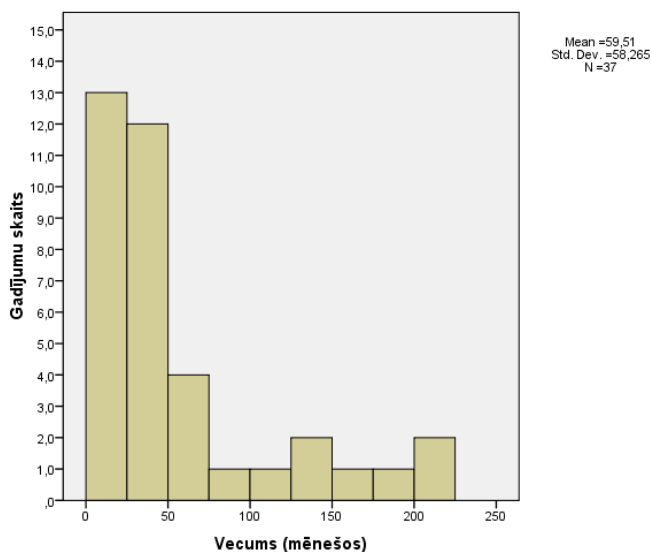
Aplūkotajā laika periodā morfoloģiski izmeklēts 9 primāru nierēs audzēju attālo metastāžu materiāls un metastātiskā procesa diagnoze apstiprināta 6 pacientiem, kuriem jau izdarīta audzēja rezekcija un sekojoša ķīmijterapija. Histoloģiski vienā gadījumā konstatētas rabdoīda audzēja metastāzes, pārējos gadījumos primāri atrasta nefroblastoma. 5 gadījumos metastāzes lokalizējas plaušās, 1 gadījumā intraperitoneāli, 1 gadījumā liesas augšpolā un intraperitoneāli, 1 gadījumā diafragmas kupolā. Histoloģiski izmeklēts arī 2 primāru nierēs audzēju recidīvu materiāls.

3.1.2. Primāro nierēs 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, veidojumā nebija EMA un CKAE1/AE3 pozitīvu epiteliālu struktūru, bet reakcija neironālo marķieru NSE, sinaptofizīna 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 proliferācijas indekss bija 40%. Atbilstoši histoloģiskajai un imunohistoķīmiskajai ainai, tika noteikta diagnoze neuroblastoma un audzējs izslēgts no pētāmo nefroblastomu grupas.

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. attēlu 3.3).



3.3. 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 gadījumi. Atkārtoti nosakot histoloģiskos apakštipus atbilstoši pašreiz lietotajai SIOP 2001. gada klasifikācijai [Vujanic et al., 2002] konstatētais, nefroblastomas sadalījums bija sekojošs: blastemāla tipa nefroblastomas 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. Nevienā no primārā audzēja audiem netika konstatēta anaplāzija. Difūza anaplāzija atrasta tikai vienā gadījumā, blastematoza tipa nefroblastomas recidīva audos. 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. Pētījuma laikā (pēdējā datu pārbaude veikta 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. Laika posmā no 1997. līdz 2007. gadam diagnosticētas 23 nefroblastomas, miruši bija 17,39% (n=4) slimnieku, precīzus datus par pacientu dzīvildzi neizdevās iegūt 4,35% (n=1), līdz ar to piecu gadu dzīvildze konstatēta 78,26% (n=18) gadījumos.

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. Abos gadījumos diagnozes apstiprināšanai tika izdarīta atkārtota imūnhistoķīmiskā izmeklēšana, kurā atrasta vimentīna pozitivitāte, EMA un CKAE1/AE3 pozitivitāte (sk. attēlu 3.4, 38.lpp), tāpat tika noteikta INI1 proteīna imūnhistoķīmiskā ekspresija un atrasta negatīva reakcija audzēja šūnu kodolos, kamēr reakcija saglabātajos nierēs audos bija pozitīva (sk. attēlu 3.5, 38 lpp.), kas atbilst nierēs rabdoīdā audzēja imunoprofilam [Coffin et al., 2006].

Klīniski abiem pacientiem novērota šim veidojumam raksturīgā agresīvā gaita. Viens no pacientiem miris 2 mēnešus, bet otrs 9 mēnešus pēc primārā audzēja ekscīzijas.

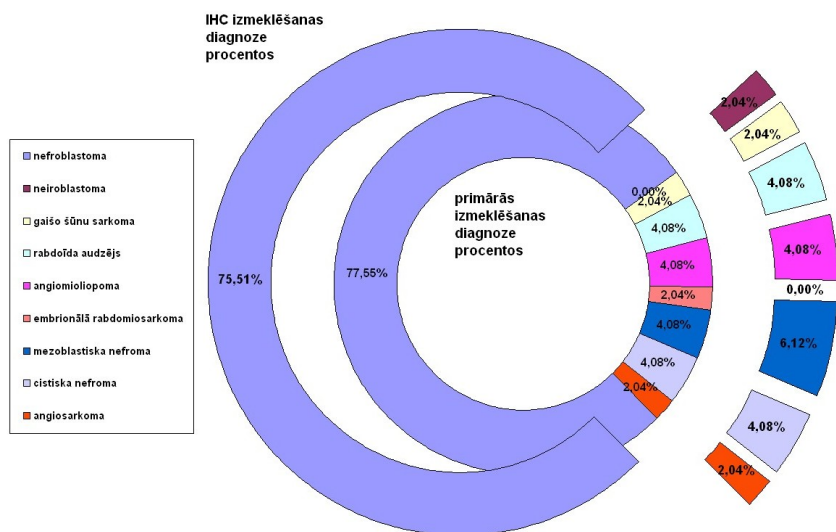
Apskatītajā laika periodā tika diagnosticēts arī tāds rets primārs pediatriks nieru audzējs kā gaišo šūnu sarkoma. Pacients bija 8 mēnešus vecs zēns. Operācijas laikā konstatēts metastātisks process aknu audos. Imūnhistoķīmiski konstatēta vimentīna and bcl-2 citoplazmatiska pozitivitāte, kamēr reakcijas WT1 proteīna, CD34, EMA muskuļu specifiskā aktīna, desmīna CKAЕ1/AЕ3, LCA noteikšanai bija negatīvas. Ki67 proliferācijas indekss bija 30%. Konstatēta histoloģiskā aina un imūnhistoķīmiskais profils bija atbilstošs literatūrā aprakstītajai atradnei nieru gaišo šūnu sarkomas gadījumā (Argani 2004.). Pašlaik, 4 gadus pēc diagnozes noteikšanas, konstatēta audzēja remisija.

Preparātu pārskats izdarīts arī primārajā morfoloģiskajā izmeklēšanā diagnosticētās embrionālās rabdomiosarkomas gadījumā. Paciente bija 25 dienas veca meitene ar iedzimtu, fokāli cistisku makroskopiski dzeltenas krāsas nieru audzēju. H&E preparātos konstatēts augstas cellularitātes audzējs, ko veido apaļas, miofibroblastiem līdzīgas vārpstveida šūnas, kuras infiltrē nieru audus. 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, CKAЕ1/AЕ3, 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). Pašlaik, 6 gadus pēc pirmreizējās diagnozes noteikšanas, slimniecei konstatēta audzēja remisija.

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 neuroblastoma, 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 nierēs gaišo šūnu sarkomas, nierēs rabdoīda audzēja, cistiskas nefromas, angiomioliopomas un angiosarkomas diagnozes (sk. attēlu 3.6). Kopumā diagnostiskas neprecizitātes atrastas 2 gadījumos jeb 4,08% no visiem izmeklētajiem audzējiem.



3.6. att. Bērnu Patoloģijas birojā izdarītās morfoloģiskās izmeklēšanas un atkārtotās imūnhistoķīmiskā pārskata rezultātu salīdzinājums (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

Turpmākamajam darbam potenciāli prognostiski svarīgo imūnhistoķīmisko marķieru noteikšanai izmantots materiāls no BKUS Bēnu 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. 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. 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. 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. Visos primārajos veidojumos konstatēta labvēlīga histoloģiskā aina. 57,69% no gadījumiem ($n=15$) pirms operācijas veikta ķīmijterapija, 42,31% pacientiem ($n=11$) vispirms veikta nieres un audzēja izņemšana. 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 audzēja progresijas gadījumiem pacients pašlaik ir miris, otrā gadījumā atrodas paliatīvajā aprūpē, bet trešajā konstatēta audzēja remisija un pacients 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

pacienti. 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. 3 jeb 50% jeb gadījumu izmeklēšanai ir pieejams un pētāmā grupā ir iekļauts arī primārā audzēja audu materiāls. 3 gadījumos primārais audzējs diagnosticēts pirms 1998. gada un atkārtotai imūnhistokīmiskai 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% (0%-17,41%; SD 4,85), stromālajā komponentā $M=34,54\%$ (8,93%-78,49%; SD 19,93), savukārt vidējais pozitīvo epiteliālo struktūru skaits redzes laukā bija 7 (0-44; SD 14,2). Metastāžu un recidīva grupā blastematozajā komponentā $M=3,39\%$ (0,76% - 9,98%; SD 3,16), stromālajā komponentā $M=48,69\%$ (16,62%-97,42%; SD 28,22), bet epiteliālajā komponentā $M=3,75$ (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. attēlu 3.7, 38.lpp). Epiteliālajā komponentā pārsvarā konstatē nevienmērīgu reakcijas intensitāti, kad daļa epiteliālo struktūru ir pilnībā negatīvas, bet daļa pilnībā pozitīvas. Statistiski būtiski paaugstinātu CD44s ekspresiju metastātisko audzēju stromā salīdzinot ar primāras nefroblastomas stromu neatrod ($p=0,186$). Tāpat nebija statistiski būtiskas atšķirības starp reakcijas intensitāti abās grupās blastematozajā un epiteliālajā audzēja komponentā (attieciņi $p=0,664$ un $p=0,488$).

Primāro audzēju grupā netika konstatēta statistiski būtiski atšķirīga reakcijas intensitāte ne blastematozajā, ne stromālajā, ne epiteliālajā komponentā ($p=0,13$; $p=1$; $p=0,35$) atkarībā no nefroblastomas stadijas.

Tāpat netika atrasta statistiski būtiska atšķirība starp CD44s ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā zemas un vidējas malignitātes audzēju grupā salīdzinot ar augstas malignitātes audzēju grupu (attieciņi $p=0,16$; $p=0,25$; $p=0,75$).

Raksturojot CD44s ekspresivitāti atkarībā no prevalējošā histoloģiskā tipa statistiski būtisku atšķirību starp CD44s ekspresiju blastematoza tipa

audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā, salīdzinot ar pārējiem histoloģiskajiem tipiem, nekonstatē ($p=0,093$; $p=0,2$; $p=0,791$). 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 ($p=0,027$).

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. Tomēr statistiski būtisku atšķirību starp CD44s ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā audzējiem ar labu un ar sliktu reakciju uz ķīmijterapiju neatrod (attiecīgi $p=0,13$; $p=1$; $p=0,35$).

Statistiski būtisku atšķirību starp CD44s ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā mirušo un izdzīvojušo pacientu grupās neatrod ($p=0,182$; $p=0,56$; $p=0,307$).

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 $M=36,52\%$ ($26,76\%-48,61$; $SD\ 11,1$; $CI\ 95\%\ vidējam\ 8.93-64,11$). Tajos gadījumos, kad metastāžu vai recidīva attīstību uz izdarītās ārstēšanas fona

nenovēro, blastematozajā komponentā $M=3,31\%$ ($0\%-17,41\%$; $SD\ 4,57$; $CI\ 95\%$ vidējam $1,00-5,58$), stromālajā komponentā $34,26\%$ ($8,93\%-78,49\%$; $SD\ 21,07$; $CI\ 95\%$ vidējam $26,44-43,85$), epiteliālajā komponentā vidēji atrastas $7,77\ CD44s$ pozitīvas epiteliālas struktūras ($0-44$; $SD\ 14,8$; $CI\ 95\%$ vidējam $0,40-15,13$). 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 $M=76,91\%$ ($0,94\%-100\%$; $SD\ 26,31$), stromālajā komponentā $M=78,3\%$ ($0,8\%-100\%$; $SD\ 27,42$), epiteliālajā komponentā $M=86,86\%$ ($0\%-100\%$; $SD\ 24,65$). Metastātisko audzēju un recidīva grupā blastematozajā komponentā $M=92,73\%$ ($81,09\%-99,23\%$; $SD\ 6,66$), stromālajā komponentā $M=93,47\%$ ($82,75\%-100\%$; $SD\ 6,54$), epiteliālajā komponentā $M=91,4\%$ ($86,53\%-97\%$; $SD\ 4,37$). Kopumā reakcijas intensitāte vērtējama kā augsta. Pozitīvo šūnu skaits vairāk par 80% blastematozajā komponentā jāatzīmē $66,66\%$ ($n=12$) no gadījumiem. (sk. attēlu 3.8, 38.lpp). Statistiski būtiski atšķirīgu reakcijas intensitāti metastātisko audzēju blastematozajā, epiteliālajā un stromālajā komponentā salīdzinot ar $p16^{INK4a}$ ekspresiju minētajos histoloģiskajos komponentos primāro nefroblastomu gadījumā nekonstatē (attiecīgi $p=0,276$; $p=0,391$; $p=0,177$).

Analizējot $p16^{INK4a}$ ekspresiju atkarībā no veidojuma stadijām, analogiski kā pētot $CD44s$ reaktivitāti statistiski būtisku atšķirību starp $p16^{INK4a}$ ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā zemas un augstas stadijas audzēju gadījumā nekonstatē (attiecīgi $p=0,77$; $p=0,22$; $p=0,21$).

Tāpat netika konstatēta statistiski būtiska atšķirība starp $p16^{INK4a}$ ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā zemas un vidējas malignitātes audzēju grupā salīdzinot ar augstas malignitātes audzēju grupu (attiecīgi $p=0,75$; $p=0,46$; $p=0,42$).

Analizējot $p16^{INK4a}$ ekspresiju atkarībā no nefroblastomas histoloģiskajiem tipiem, konstatēta statistiski būtiska pazemināta tā ekspresija blastematoza tipa audzēju stromālajā un epiteliālajā komponentā, salīdzinot ar pārējiem histoloģiskajiem tipiem ($p=0,007$; $p=0,03$), bet reakcijas intensitāte

neatšķirās blastematozajā komponentē ($p=0,075$). Salīdzinot reakcijas intensitāti stromālā 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 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 ($p=0,057$).

Statistiski būtisku atšķirību starp p16^{INK4a} ekspresiju audzējiem pēc izdarītas ķīmijterapijas un terapijas neietekmētā materiālā, kā arī atkarībā no audzēja reakcijas uz ķīmijterapiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā neatrod ($p=0,85$; $p=0,18$; $p=0,15$; $p=0,77$; $p=0,22$; $p=0,21$).

Tāpat nav statistiski nozīmīgas atšķirības starp p16^{INK4a} ekspresiju mirušo un izdzīvojušo pacientu grupās blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā ($p=0,48$; $p=0,81$; $p=0,18$).

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^{INK4a} pozitīvās šūnas veidoja 89% no tā šūnām. Epiteliālajā komponentā vidējais pozitīvo šūnu skaits $M=96,31\%$ ($92,63\%$ - 100% ; $SD\ 5,21$; $CI\ 95\%$ vidējam $49,49-143,13$), bet stromālajā komponentā $M=86,09\%$ ($77,46\%$ - $91,93\%$; $SD\ 7,62$; $CI\ 95\%$ vidējam $67,14-105,03$). Tajos gadījumos, kad metastāžu vai recidīva attīstību uz izdarītās ārstēšanas fona nenovēro, blastematozajā komponentā $M=81,68\%$ ($35,86\%$ - 100% ; $SD\ 18,97$; $CI\ 95\%$ vidējam $71,92-91,43$), stromālajā komponentā $81,1\%$ (25% - 100% ; $SD\ 23,04$; $CI\ 95\%$ vidējam $70,3-91,88$), epiteliālajā komponentā $M=85,81$ (0% - 100% ; $SD\ 25,8$; $CI\ 95\%$ vidējam $72,97-98,64$). Statistiski būtisku atšķirību starp p16^{INK4a} 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 (PI) blastematozajā komponentā bija 37,04% (3,57%-78,57%; SD 16,82), stromālajā komponentā 13,67% (1,12%-37,66%; SD 10,31), epiteliālajā komponentā 23,5% (2,33%-38,55%; SD 12,55). Metastātisko audzēju/recidīva grupā blastematozajā komponentā proliferācijas indekss bija 34,78 (9,7% - 62,29%; SD 17,59), stromālajā komponentā 6,93% (1,6%-17,52%; SD 5,8), epiteliālajā komponentā 12,14% (5%-28,57%; SD 11,2). Šajā gadījumā jāatzīmē plašais reakcijas intensitātes diapazons, jo pat identiska tipa audzēju gadījumā PI bija atšķirīgs (sk. attēlus 3.9 un 3.10, 39. lpp.).

Statistiski būtiski paaugstinātu tā lielumu metastātisko audzēju blastematozajā, epiteliālajā un stromālajā komponentā salīdzinot ar primāro nefroblastomu gadījumiem nekonstatē (attiecīgi $p=0,931$; $p=0,75$; $p=0,89$).

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

Tāpat netika konstatēta statistiski būtiska atšķirība starp PI lielumu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā zemas un vidējas malignitātes audzēju grupā salīdzinot ar augstas malignitātes audzēju grupu ($p=0,48$; $p=0,63$; $p=0,09$).

Statistiski būtisku atšķirību starp PI blastematoza tipa audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā, salīdzinot ar pārējiem histoloģiskajiem tiem, nekonstatē ($p=0,74$; $p=0,57$; $p=0,75$). 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 PI lielumu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,072$; $p=0,053$; $p=0,68$).

Statistiski būtisku atšķirību starp PI lielumu audzējiem pēc izdarītas ķīmijterapijas un terapijas neietekmētā materiālā, kā arī audzējiem ar labu un

sliktu reakciju uz izdarīto ķīmijterapiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,41$; $p=0,43$; $p=1$; $p=0,8$; $p=0,61$; $p=0,52$).

Mirušo un izdzīvojušo pacientu grupās statistiski būtisku atšķirību starp PI lielumu blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,18$; $p=0,4$; $p=0,32$).

Vienīgajā progresējošā audzēja gadījumā, kurā atrasts blastematozais komponents PI tajā bija 53,33%, savukārt epiteliālajā komponentā audzēja progresijas gadījumā vidējais PI bija 20,25% (13,84%-26,66%; SD 9,06; CI 95% vidējam 0-101,69), stromālajā komponentā $M=10,32\%$ (2,36 %-22,22%; SD 10,49; CI 95% vidējam 0-36,4). Tajos gadījumos, kad metastāžu vai recidīva attīstību uz izdarītās ārstēšanas fona nenovēro, blastematozajā komponentā vidējais PI 36,14% (3,57 %-78,57%; SD 18,97; CI 95% vidējam 27,77-44,51), stromālajā komponentā $M=14,15\%$ (1,12%-37,66%; SD 10,45; CI 95% vidējam 9,4-18,91), epiteliālajā komponentā $M=23,84\%$ (2,33%-38,55%; SD 13; CI 95% vidējam 17,57-30,11). 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% (0%-37,37%; SD 11,44), stromālajā komponentā 1,74% (0%-12,77 %; SD 2,73), epiteliālajā komponentā 6,35% (0%-25,38%; SD 9,03). Metastātisko audzēju/recidīva grupā blastematozajā komponentā $M=27,58\%$ (1,92%-88,46%; SD 29,03), stromālajā komponentā 3,84% (0%-17,05%; SD 5,95), epiteliālajā komponentā 9,1% (3.03%-20,89%; SD 8,25). Statistiski būtiski paaugstinātu reakcijas intensitāti metastātisko audzēju, epiteliālajā un stromālajā komponentā salīdzinot ar p53 ekspresiju minētajos histoloģiskajos komponentos primāro nefroblastomu gadījumā nekonstatē ($p=0,179$; $p=0,269$). Paaugstinātā reakcijas intensitāte blastematozajā komponentā metastāžu/recidīva grupā (sk. attēlu 3.11, 39. lpp.) salīdzinot ar primārajiem audzējiem bija statistiski būtiska ($p=0,03$).

Attiecībā uz primārajiem audzējiem, salīdzinot p53 ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā 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 statistiski būtisku atšķirību starp p53 ekspresiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā zemas un vidējas malignitātes audzēju grupā salīdzinot ar augstas malignitātes grupu nekonstatē ($p=0,16$; $p=0,68$; $p=1$).

Analizējot p53 ekspresiju atkarībā no nefroblastomas histoloģiskajiem tipiem, statistiski būtisku atšķirību starp p53 ekspresiju blastematoza tipa audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā, salīdzinot ar pārējiem histoloģiskajiem tipiem, nekonstatē (attiecīgi $p=0,62$; $p=0,73$; $p=0,09$). Netika atrasta statistiski būtiska atšķirība starp imūnhistoķīmiskās 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 ($p=0,19$; $p=0,6$; $p=0,44$).

Statistiski būtisku atšķirību starp p53 ekspresiju audzējiem pēc izdarītas ķīmijterapijas un terapijas neietekmētā materiālā, kā arī audzējiem ar sliktu un labu reakciju uz izdarīto ķīmijterapiju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā nekonstatē ($p=0,46$; $p=0,92$; $p=0,38$; $p=0,8$; $p=0,26$; $p=0,64$).

Statistiski būtisku atšķirību starp p53 ekspresiju mirušo un izdzīvojušo pacientu grupās audzēju blastematozajā, stromālajā un epiteliālajā komponentā neatrod ($p=0,79$; $p=0,52$; $p=0,21$).

Vienīgajā progresējošā audzēja gadījumā, kurā atrasts blastematozais komponents p53 pozitīvo šūnu skaits bija 15,26 %, savukārt epiteliālajā komponentā audzēja progresijas gadījumā $M=22,69\%$ (20%-25,38%; SD 3,8; CI 95% vidējam 0,00-56,86), stromālajā komponentā $M=1,47\%$ (0,00%-2,85%; SD 1,42; CI 95% vidējam 0,00-5,01). Tajos gadījumos, kad metastāžu vai recidīva attīstību uz izdarītās ārstēšanas fona nenovēro, blastematozajā komponentā $M=9,41\%$ (0,00%-37,37%; SD 11,7; CI 95% vidējam 3,5-15,22), stromālajā komponentā $M=1,78\%$ (0,00%-12,77%; SD 2,89; CI 95% vidējam 0,46-3,1), epiteliālajā komponentā $M=4,63\%$ (0,00%-23,68%; SD 7,55; CI

95% vidējam 0,98-8,27). 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 bija 22,74 (0-86; SD 23,21). Metastātisko audzēju/recidīva grupā $M=9,88$ (0-40; SD14,86). Gan primāro audzēju, gan metastāžu gadījumā atrasta pozitivitāte labi diferencētās tubulārās struktūrās (sk. attēlu 3.12, 39.lpp.). Reakcijas intensitāte metastātiskā procesa gadījumā bija statistiski būtiski pazemināta salīdzinot ar primārajām nefroblastomām ($p=0,046$).

Primāro audzēju grupā salīdzinot reakcijas intensitāti zemas un augstas stadijas audzēju grupā, statistiski būtisku atšķirību starp abām grupām nekonstatē ($p=0,36$). Savukārt, analizējot e-kadherīna ekspresiju atkarībā no audzēja malignitātes pakāpes, augstas malignitātes audzēju grupā tā bija būtiski pazemināta salīdzinot ar zemas un vidējas malignitātes audzēju grupu ($p=0,049$).

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 $M=24,13$ (0-86; SD 28,36, CI 95% vidējam 8,43-39,84), bet ķīmijterapijas neietekmētā materiālā $M=31,86$ (0-66, SD 17,23, CI 95% vidējam 19,79-42,94). Statistiski būtiska atšķirība starp e-kadherīna ekspresiju abās grupās nav konstatēta ($p=0,15$). Ja audzēja atbilde uz ķīmijterapiju klīniski traktēta kā laba $M=28,20$ (0-86, SD 30,26, CI 95% vidējam 6,55-49,85). Nepietiekošas audzēja regresijas gadījumā $M=16$ (0-60; SD 25,11; CI 95% vidējam 0,00-47,18). Atšķirība starp abām grupām nav statistiski būtiska ($p=0,34$).

Mirušo pacientu grupā vidējais e-kadherīna pozitīvo struktūru skaits $M=13,5$ (0-2, SD 19,09 CI 95% vidējam 0,00-185,00). Izdzīvojušo pacientu grupā $M=28,33$ (0-86; SD 24,49, CI 95% vidējam 17,99-38,67). 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 $M=4,33$ (0-13; SD 7,5; CI 95% vidējam 0,00-22,97). Ja audzēja progresiju neatrod, tad $M=30,17$ (0-86 SD 24; CI 95% vidējam 19,79-40,55). 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 bija 94,7 (0-480; SD 128,61). Lielākais CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits konstatēts epiteliāla tipa glomerulāras diferenciācijas nefroblastomas gadījumā (sk. attēlu 3.13, 40. lpp.). Imūnhistoķīmiski pozitīvo epiteliālo struktūru skaits atkārtotā procesa gadījumā bija statistiski būtiski pazemināts salīdzinot ar primārajām nefroblastomām ($p=0,005$).

Primāro audzēju grupā statistiski būtisku atšķirību starp CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaitu zemas un augstas stadijas audzēju gadījumā un zemas un vidējas malignitātes pakāpes audzēju grupā, salīdzinot ar augstas malignitātes audzēju grupu, neatrod ($p=0,36$ un $p=0,11$).

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 $M=121,73$ (0-480; SD 158,97; CI 95% vidējam 33,69-9,77), bet ķīmijterapijas neietekmētā materiālā $M=58$ (0-199; SD 58,27, CI 95% vidējam 18,84-7,50, bet aprakstītā atšķirība nebija statistiski būtiska ($p=0,49$). Ja audzēja atbilde uz ķīmijterapiju klīniski traktēta kā laba $M=159,90$ (0-480, SD 182,66, CI 95% vidējam 29,22-90,57). Nepietiekošas audzēja regresijas gadījumā $M=45,4$ (0-114; SD 49,58; CI 95% vidējam 0,00-06,96). Atšķirība starp abām aprakstītajām grupām nebija statistiski būtiska ($p=0,21$).

Mirušo pacientu grupā vidējais CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaits $M=24$ (0-48; SD 33,94; CI 95% vidējam 0,00-8,94). Izdzīvojušo pacientu grupā $M=100,66$ (0-480; SD 132,13, CI 95% vidējam 44,87-6,46). 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 $M=160$ (0-480; SD

277,12; CI 95% vidējam 0,00-48,42). Ja audzēja progresiju neatrod, tad $M=86,26$ (0-476; SD 105,64; CI 95% vidējam 40,57-1,94). 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 bija 123,46 (25-374; SD 87,84). Metastātisko audzēju/recidīva grupā $M=116,44$ (24-66; SD 8,3). Statistiski būtisku atšķirību starp mikroasinsvadu skaitu atkārtotā un primārā procesa gadījumā neatrod ($p=0,439$). Visos gadījumos atrod gan jau izveidotās asinsvadu struktūras ar lūmenu, gan CD34 pozitīvo šūnu struktūras bez lūmena veidošanās (sk. attēlu 3.14, 40. lpp.).

Primāro nefroblastomu grupā salīdzinot reakcijas intensitāti zemas un augstas stadijas audzēju grupā, kā arī zemas un vidējas malignitātes pakāpes audzēju grupā, salīdzinot ar augstas malignitātes audzēju grupu, statistiski būtisku atšķirību neatrod ($p=0,51$ un $p=0,16$).

Salīdzinot reakcijas intensitāti starp kopējo audzēju grupu un dažādiem histoloģisko tipiem, 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 ($p=0,19$; $p=0,12$; $p=0,58$; $p=0,095$; $p=0,3$).

Audzējiem, kuriem pirms operācijas veikta ķīmijterapija vidējais CD34 pozitīvo mikroasinsvadu skaits $M=125,26$ (25-270; SD 89,07; CI 95% vidējam 75,93-174,59), bet ķīmijterapijas neietekmētā materiālā $M=121$ (40-374, SD 90,4, CI 95% vidējam 60,26-181,7). Statistiski būtisku atšķirību starp abām audzēju grupām nekonstatē ($p=0,9$). Ja audzēja atbilde uz ķīmijterapiju klīniski traktēta kā laba $M=135$ (25-270, SD 89,66, CI 95% vidējam 70,85-199,14). Nepietiekošas audzēja regresijas gadījumā $M=105,8$ (diapazons 40-270; SD 94,7; CI 95% vidējam 0,00-223,39). Statistiski būtisku atšķirību starp audzējiem ar labu un nepietiekošu reakciju uz ķīmijterapiju nekonstatē ($p=0,75$).

Mirušo pacientu grupā vidējais CD34 pozitīvo asinsvadu skaits $M=92,5$ (56-129, SD 51,61, CI 95% vidējam 0,00-556,27). Izdzīvojušo pacientu grupā $M=126,04$ (25-374, SD 90,45, CI 95% vidējam 87,84-164,23). Gadījumos, ja konstatēta audzēja progresija, primārajos veidojumos noteiktais vidējais CD34 pozitīvo asinsvadu skaits $M=100,33$ (25-220 SD 104,7; CI 95%

vidējam 0,00- 360,63). Statistiski būtisku atšķirību starp reakcijas intensitāti mirušajiem un izdzīvojušajiem pacientiem nekonstatē ($p=0,73$). Ja audzēja progresiju neatrod, tad $M=126,47$ (32-374, SD 87,68; CI 95% vidējam 88,56-164,39). Statistiski būtisku atšķirību starp abām minētajām grupām neatrod ($p=0,44$).

3.2.9. Vilmsa audzēja nomācēja gēna proteīna ekspresija

Primāro audzēju grupā vidējais WT1 proteīna pozitīvo šūnu daudzums $M=44,13\%$ (0,00%-99,47%; SD 44). Metastātisko audzēju/recidīva grupā $M=63,23\%$ (0,00%-99,23%; SD 47,55). Statistiski būtisku atšķirību starp WT1 ekspresiju metastātiskā un primārā procesa gadījumā neatrod ($p=0,525$). Pozitīva reakcija konstatēta blastematozā un primitīvā epiteliālā komponenta šūnu kodolos, lai gan ir konstatēta arī iztrūkstoša imunoreaktivitāte histoloģiski klasiskas nefroblastomas blastematozā komponenta šūnās (sk. attēlu 3.15 un attēlu 3.16, 40.lpp.).

Attiecībā uz primārajiem audzējiem, salīdzinot reakcijas intensitāti zemas un augstas stadijas audzēju grupā, kā arī zemas un vidējas malignitātes audzēju grupā, salīdzinot ar augstas malignitātes grupu statistiski būtisku atšķirību nekonstatē ($p=0,62$; $p=0,94$).

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) nav būtiski atšķirīgs no skaita kopējā grupā ($p=0,62$; $p=0,23$; $p=0,078$; $p=0,66$, $p=0,27$).

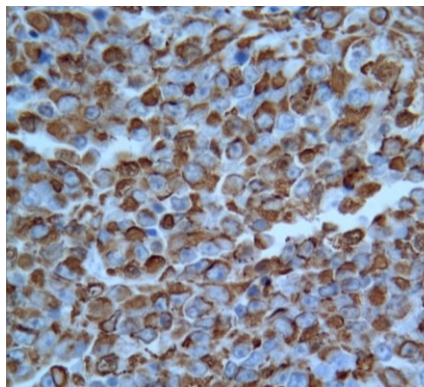
Audzējiem, kuriem pirms operācijas veikta ķīmijterapija vidējais WT1 pozitīvo šūnu daudzums $M=35,70\%$ (0,00%-99,00%; SD 41,76; CI 95% vidējam 12,57-58,82), bet ķīmijterapijas neietekmētā materiālā $M=55,63\%$ (0,00%-99,47%, SD 46,3, CI 95% vidējam 24,50-86,76). Statistiski būtisku atšķirību starp reakcijas intensitāti ķīmijterapijas ietekmētā un neietekmētā materiālā, nekonstatē ($p=0,41$). Ja audzēja atbilde uz ķīmijterapiju klīniski traktēta kā laba $M=52,86\%$ (0,00%-99,00%, SD 41,55, CI 95% vidējam 23,14-82,59). Nepietiekošas audzēja regresijas gadījumā $M=1,37\%$ (diapazons 0,00-6,87; SD 3,07; CI 95% vidējam 0-5,18). Minētā atšķirība ir statistiski būtiska ($p=0,009$).

Mirušo pacientu grupā vidējais WT pozitīvo šūnu daudzums $M=46,52\%$ (0,00%-93,04%, SD 65,78, CI 95% vidējam 0,00-637,61).

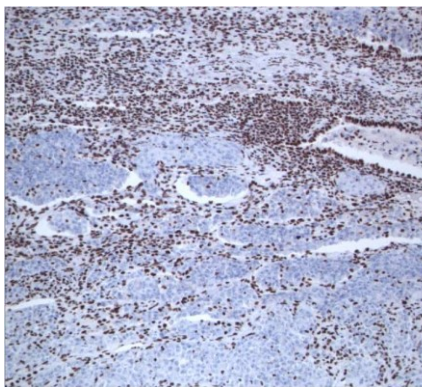
Izdzīvojušo pacientu grupā $M=43,93\%$ ($0,0\%-99,47\%$, $SD\ 43,77$, $CI\ 95\%$ vidējam $25,45-62,42$). Statistiski būtisku atšķirību starp reakcijas intensitāti mirušo un izdzīvojušo pacientu grupā neatrod ($p=0,76$). Gadījumos, ja konstatēta audzēja progresija, primārajos veidojumos noteiktais vidējais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

3.2.10. Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresivitātes savstarpējā saistība

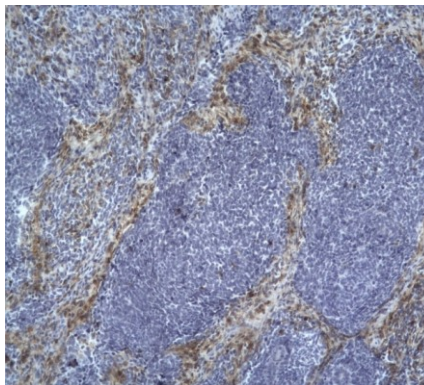
Izmantojot Spīrmena neparametrisko korelāciju analīzi imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas savstarpējās saistības noteikšanai primāro audzēju grupā konstatēta statistiski būtiska pozitīva saistība starp imūnhistoķīmiski ar CD34 vizualizēto asinsvadu skaitu un CKAE1/AE3 pozitīvo epiteliālo struktūru skaitu veidojumu 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 p16^{INK4a} un p53 ekspresiju blastematozajā komponentā ($r=0,513$; $p=0,029$). P16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzumam epiteliālajā komponentē 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 ($r=0,404$, $p=0,024$).



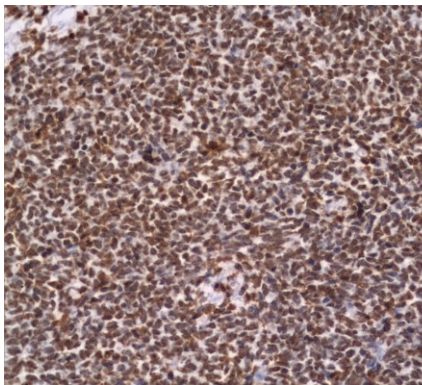
3.4. att. Nieres rabdoīds audzējs - pozitīva vimentīna ekspresija, palielinājums x400.



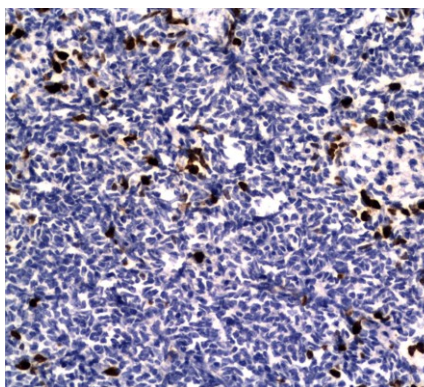
3.5. att. Nieres rabdoīds audzējs- negatīva INI1 ekspresija audzēja šūnu kodolos, pozitīva iekšējā kontrole saglabātajos niere audos, palielinājums x200.



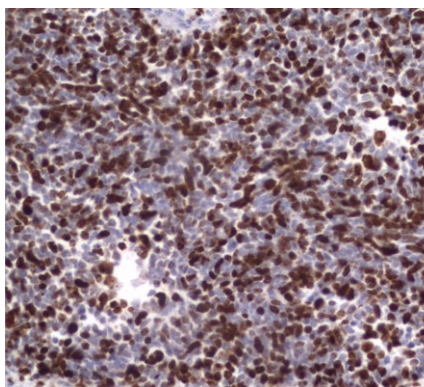
3.7. att. Pozitīva CD44s ekspresija blastematozas nefroblastomas stromā, negatīva reakcija blastematozā komponenta šūnās, palielinājums x100.



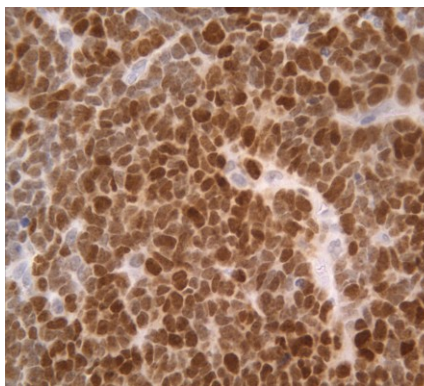
3.8. att. Pozitīva p16^{INK4a} ekspresija nefroblastomas blastematozā komponenta šūnu kodolos, palielinājums x200.



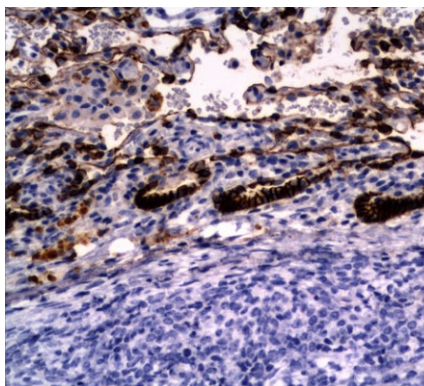
3.9. att. Zema Ki67 ekspresija blastematoza tipa augstas malignitātes nefroblastomas blastēmas šūnu kodolos, audzējs pēc pirms operācijas periodā izdarītas ķīmijterapijas, palielinājums x200.



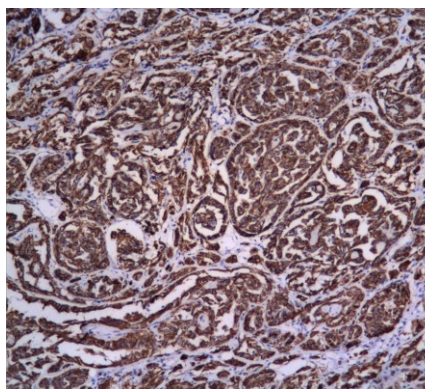
3.10. att. Augsta Ki67 ekspresija blastematoza tipa vidējas malignitātes pakāpes nefroblastomas blastēmas šūnu kodolos primāras nefrektomijas gadījumā, palielinājums x200.



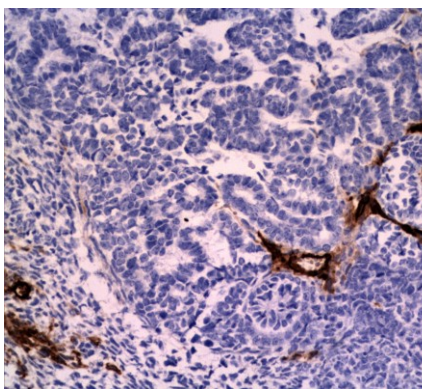
3.11. att. P53 ekspresija nefroblastomas plaušu metastāzes blastematozā komponenta šūnās, palielinājums x400.



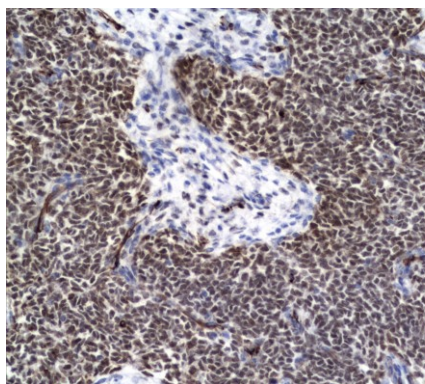
3.12. att. E-kadherīna ekspresija nefroblastomas metastāzes tubulārajās struktūrās uz robežas ar plaušu audiem, palielinājums x200.



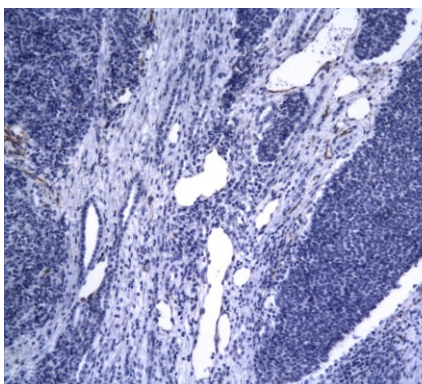
3.13. att. CKAE1/AE3 ekspresija primitīvās tubulārās un glomerulārās struktūrās epiteliāla tipa nefroblastomas gadījumā, palielinājums x200.



3.14. att. CD34 pozitīvas struktūras ar un bez lūmena veidošanos epiteliāla tipa vidējas malignitātes pakāpes nefroblastomas gadījumā, palielinājums x200.



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



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

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. Mikrosatelītu marķieri analizēti 14 primārā audzēja audu paraugos.

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} 1α eksona savvaļas forma, kas atbilst normai. Attiecībā uz 2. eksonu savvaļas tips konstatēts 4 (28,57%) gadījumos. 7 jeb 50% no analizētajiem audu paraugiem atrasts, ka 442. nukleotīds guanīns (G) nomainīts uz adenozīnu (A) (turpmāk tekstā c.442G>A) jeb p16^{INK4a} proteīna 148. aminoskābe alanīns nomainīta ar treonīnu (turpmāk tekstā A148T). A148T sastopamības biežums nefroblastomas pacientu grupā tika salīdzināts tās sastopamības biežumu kontroles grupā (sk. nodaļu 2.4). 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%) četriem dažādiem mikrosatelītiem (sk. tabulu 3.1). Par heterozigotitātes zudumu tika uzskatīts vienas alēles pilnīgs zudums vai tās redukcija vismaz par 50% salīdzinot ar normālajiem audiem (sk. attēlu 3.17.). Vienā gadījumā jeb 7,14% no analizētajiem paraugiem 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 CDKN2A gēna. Vienā gadījumā (7,14%) no analizētajiem

paraugiem atrasts heterozigotātes zudums analizējot marķieri D9S1604, kas atrodas intronā pirms CDKN2A/p16^{INK4A} gēna, norādot uz iespējamu šī gēna saistību ar nefroblastomas attīstību. Precīzu delēcijas lielumu noteikt neizdevās, jo pārējie analizētie mikrosatelītu marķieri bija neinformatīvi (sk. 3.1. tabulu). Šajā audzējā tika atrasta arī CDKN2A gēna A148T izmaiņa 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 attēlu 2.1) norādot uz lielāka reģiona delēciju. Diemžēl līdzīgi kā iepriekš precīzu delēcijas lielumu noteikt nav iespējams, jo pārējie analizētie marķieri bija neinformatīvi. Taču līdzīgi kā iepriekš arī šajos audos papildus delēcijai tika atrasta arī CDKN2A gēna A148T izmaiņa.

3.1. tabula

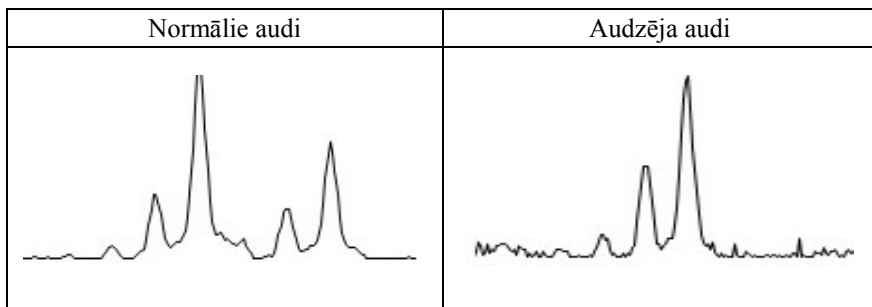
CDKN2A lokusa mikrosatelītu marķieru analīzes rezultāti

Nr.	D9S736	D9S1604	D9S974	D9S942	D9S1748	D9S1870	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).



3.17. att. Heterozigotitātes zudums CDKN2A lokusā mikrosatelīta marķieri D9S171 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 izmaiņu A148T vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā ir 84,30% (70,00%-98,57%, SD 11,69), stromālajā komponentā 93,58% (88,88%-100,00%, SD 5,19) un epiteliālajā komponentā 97,10% (92,63%-100,00%, SD 3,05). Pacientiem bez minētās izmaiņas blastematozajā komponentā vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums bija 78,06% (51,85%-92,77, SD 22,7), stromālajā komponentā M=71,15% (41,66%-92,47%, SD 22,58), bet epiteliālajā komponentā 77,63% (42,66%-96,5%, SD 30,3). 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 ($p=1$; $p=0,086$; $p=0,177$).

Gadījumos, kad mikrosatelītu analīzē konstatētas abas alēles vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā bija 80,55% (51,85%-100,00%, SD 17,02), stromālajā komponentā 79,87% (37,97%-100%, SD 24,46), epiteliālajā komponentā 87,25% (42,66%-100,00%, SD 18,97). Ja atrasts heterozigotitātes zudums, vidējais p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā bija 84,28% (70,00%-98,57%, SD 20,2), stromālajā komponentā 93,51% (88,88%-98,14%, SD 6,54), epiteliālajā komponentā visos gadījumos p16^{INK4a} pozitīvo šūnu daudzums bija 100%. Statistiski būtisku atšķirību starp minētā proteīna ekspresiju kādā no histoloģiskajiem komponentiem abās grupās nekonstatē (attiecīgi $p=0,88$; $p=0,75$, $p=0,091$).

4. DISKUSIJA

4.1. Latvijas bērnu 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. 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 nedeja pietiekošu pamatojumu esošās histoloģiskās diagnozes nomaīnai un audzēja izslēgšanai no primāro nieru audzēju grupas. Tādējādi atsevišķi mezoblastiskās nefromas gadījumi, kā arī angiosarkoma tika iekļauti kopējā nieru audzēju spektrā bez papildus imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas.

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 šis audzējs veido 77,55% no visiem nieru jaunveidojumiem bērniem vecumā līdz 18 gadiem, bet atkārtotās imūnhistoķīmiskā 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 [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 (NŠV) gadījums. Klīniski un radioloģiski aizdomas par NŠV tika izteiktas

3 gadījumos jeb 5,66% no visa morfoloģiski izmeklētā nefrektomiju un daļējo nieres rezekciju materiāla, bet histoloģiski tika konstatēts ksantogranulomatozs pielonefrīts. 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]. Kopumā jāsaņem, ka pētījuma dati attiecībā uz nieru šūnu vēža vietu kopējā audzēju spektrā bērniem Latvijā atšķiras no pasaules literatūras datiem, taču nebūtu vietā 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 Veselības ekonomikas centra datu bāzē atrodamo informāciju.

Analizējot gadījumus, kad atkārtotās imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas gaitā tika izmainīta esošā histoloģiskā diagnoze, redzams, ka kopumā diagnostiskas neprecizitātes atrastas 2 gadījumos jeb 4,08% no visiem izmeklētajiem audzējiem. Šie rezultāti arī izgaismo dažas problēmas, kuras būtu jārisina praktiski strādājošiem bērnu patoloģiem. 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. Diagnostiskas 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 vairāk neuroblastomai atbilstošs imunofenotips vienā no sākotnēji diagnosticētās blastemāla tipa nefroblastomas gadījumiem. 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. Veiktajā pētījumā sākotnējā etapā no apkopotā materiāla tika apzināti izslēgti visi diagnosticēto neuroblastomu gadījumi, 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 imūnhistoķīmiskas izmeklēšanas gaitā atklātā neuroblastomas gadījumā, jautājums par veidojuma ģenēzi ir diskutabls. Lai gan pašlaik klīniski veidojums tiek traktēts kā primārs nieres audzējs, pirmreizēji izdarītajā kompjūtertomoģrafiskajā izmeklēšanā pastāv aizdomas par retroperitoneālu audzēju ar ieaugšanu nierē. Šajā gadījumā 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 zināmas statistiskas novirzes.

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 imunohistoķīmiskā 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 (CMN) 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 aprakstīto 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. No praktiskā viedokļa apskatītais gadījums rāda, ka turpmāk nepieciešams kritiski izvērtēt mezenhimālās ģenēzes primāru nieru audzēju diagnozes bērnu vecumā un pielietot izmeklēšanā plašas muskulāro marķieru imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas shēmas ņemot vērā arī celullāras mezoblastiskās nefromas eksistenci.

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

4.2.1. 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 epiteliālā tipa nefroblastomu epiteliālajā komponentā ($p=0,043$) salīdzinot ar minētā marķiera ekspresiju šajā histoloģiskajā komponentā citu tipu audzējos. Interesanti, ka tajā pašā laikā atrasta statistiski būtiska pozitīva saistība starp CD44s ekspresiju epiteliālajā komponentā un CKAEl/AE3 ($p=0,02$) un e-kadherīna pozitīvo struktūru skaitu ($p=0,019$). Minēto atradni var izskaidrot ar faktu, ka augsts CKAEl/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 jaukta 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 saistībai 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 klonu 2D9A12 uzskatāma par normu. Būtiska zinātniska nozīme prognostiski svarīgo marķieru pētniecībā varētu būt 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 anaplastiskos audzējos 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 neārstētas pacientus, šī pati autoru grupa nav atradusi saistību starp CD44s ekspresiju un nefroblastomas stadiju vai klīnisko gaitu [Ghanem et al., 2011]. Citi zinātnieki apraksta pozitīva minētā marķiera imunoreaktivitātes saistību ar audzēja histoloģisko tipu un malignitātes 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, histoloģiskās malignitātes 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 komponentā 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 [Natrajan et al., 2008; Zhao et al., 2012]. Arī nefroblastomas gadījumā izdarītajos pētījumos daļa autoru izmanto antivielas, kuru imūnhistoķīmiskās reaktivitātes intensitāte normālajos audos ir zema. Prezentētajā pētījumā p16^{INK4a} proteīna noteikšanai izmantots klons 2D9A12

(Abcam, Kembridža, Masačūsets 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. Izdarītās kontroles reakcijas rezultāti, papildus konstatētā p16^{INK4a} proteīna ekspresija audzēja neskartās nierēs kanāliņu epitēlija šūnu kodolos 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. 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, 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 p16^{INK4a} 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 tiptiem ($p=0,007$; $p=0,03$). 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] konstatēta 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 nav būtiskas 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 tiem blastematozajā un primitīvā epiteliālajā komponentā, tādēļ tā ekspresija varētu būt samazināta audzējos ar izteiktu epiteliālu komponentu.

Interesi izraisa fakts, ka 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 nav būtiskas prognostiskas nozīmes. Vidējais Ki67 pozitīvo šūnu daudzums 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 proliferācijas indekss [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 daļa zinātnieku 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.

Kā jau iepriekš atzīmēts, p53 imūnoreaktivitātes nozīme nefroblastomas gadījumā ir labi izpētīta. Kopumā lielākā daļa zinātnieku atzīmē p53 ekspresijas saistību ar nefroblastomas anaplāzijas pakāpi un sliktāku prognozi [Govender et al., 1998]. Imūnhistoķīmiski analizējot p53 ekspresiju dažādās histoloģiskās ainas gadījumā atrasta būtisku atšķirība ($p=0.001$) starp nefroblastomām ar labvēlīgu histoloģisko ainu vai kodolu atipiju un anaplastisko 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 zemas reakcijas intensitātes grupā salīdzinot ar augstas reakcijas intensitātes grupu [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 vairāk būtu jārunā par 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., 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 ($p=0$) starp CKAE1/AE3 un e-kadherīna pozitīvo struktūru skaitu nav zinātniskas nozīmes, jo gan viens gan otrs 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 tiem. Šī atradne izsauc zināmas šaubas, jo loģiski CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaitam visaugstākajam būtu bijis jābūt epiteliāla tipa nefroblastomu gadījumā. Jāatzīmē, gan, ka regresīva tipa nefroblastomas ar augstu CKAE1/AE3 pozitīvo struktūru skaitu 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 atrasts regresīva tipa audzējos. 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 [Abramson et al., 2003], bet 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 ($p=0,05$). Tāpat nav konstatēta statistiski būtiska 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 pētījumā.

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 jāsaņem, 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]. Prezentētajā pētījumā atrasta statistiski būtiska atšķirība ar p līmeni 0,009 starp WT1 proteīna ekspresiju gadījumos, kad audzēja atbilde uz ķīmijterapiju klīniski traktēta kā laba un nepietiekošas regresijas gadījumiem. 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 jutīgi 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.

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

Izvērtējot CDKN2A lokusa DNS sekvenēšanas rezultātā 50% no analizētajiem paraugiem iegūto 442. nukleotīda G nomaiņu uz A (c.442G>A), 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 [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]. Runājot par pēlto nefroblastomu grupu 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 imunohistoķīmisko ekspresivitāti, atrod, ka statistiski būtisku atšķirību starp minētās imunohistoķīmiskās reakcijas intensitāti histoloģiskajos komponentos 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 jādāmā, 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 meklējamās aiz CDKN2A 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. Tomēr 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. Līdzīgā pētījumā autori pētot 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 tāpat 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 vecuma 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% gadījumū.

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 veidojumu epiteliālajā komponentā, samazinātā CKAE1/AE3 pozitīvo epiteliālo struktūru skaits atkārtotā procesa gadījumā salīdzinot ar primārajām 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^{INK4a} 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 patoloģiem 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 starpinstucionālo bērnu vecuma nieres 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 nieres audzēja diagnostikā un citoģenētiskai translokācijas (12;15) (p13;q25) noteikšanai cellulāras mezoblastiskas nefromas diagnostikā.

7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. 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
2. 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
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. 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
5. 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
6. 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
7. 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.
8. 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.).
9. Birch J. M., Breslow N. Epidemiologic features of Wilms tumor // *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 1995; 9 (6):1157-1178.
10. Coffin C.M., Belchis D. Immunohistology of pediatric neoplasms // *Diagnostic immunohistochemistry* / Ed. by Dabbs D.-2st ed.- Philadelphia: Churchill Livingstone, 2006. – Pp. 611-637.
11. 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

12. Dobelis J. Uroģenitālās sistēmas orgānu audzēji // Bērnu uroloģija / J.Dobelis.- Rīga: Madris, 2003.- 279-296 lpp
13. 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.
14. 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.
15. Ghanem M., van der Kwast T. H., Molenaar W. M. The predictive value of immunohistochemical markers in untreated Wilms' tumor: are they useful?? // Word Journal of Urology, 2011; DOI: 10.1007/s00345-011-0684-1 <http://www.springerlink.com/content/a1u84r721876730j/> (sk. 25.05.2011.)
16. Ghanem A. M., van der Kwast H. T., Sudaryo K. M. et al. MIB-1 (Ki-67) Proliferation index and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 Protein expression in Nephroblastoma // Clinical Cancer Research, 2004; 10 (3): 591-597.
17. Ghanem A. M., van Steenburger J. G., Nijman M. J. R. Prognostic markers in nephroblastoma (Wilms' tumor) // Urology, 2005; 65 (6): 1047-1054
18. 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.
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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
23. Jankauskiene A., Drustė- Kurilavičienė S., Puzinas A. Nephrectomy to children (in lithuanian) // Medicinos teorija ir praktika, 2009; 71-75.
24. 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

25. Juszkievicz P., Tuziak T., Zbislawski 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
26. Krasts J. Biežākās bērnu onkoloģiskās slimības // Bērnu ķirurģija / A. Pētersona red.- Rīga: Nacionālais apgāds, 2005.- 562-591 lpp
27. Lawler W., Marsden H. B., Palmer M. K. Histopathological study of the first medical research council nephroblastoma trial // Cancer, 1977; 40 (4): 1519-1525.
28. 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
29. 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.
30. Natrajan R., Warren W., Messhael B., et al. Complex patterns of chromosome 9 alterations including the p16INK4a locus in Wilms tumours // Journal of Clinical Pathology, 2008; 61 (1): 95-102
31. Perlman E. J. Paediatric renal tumours: practical updates for the pathologist // Pediatric and Developmental Pathology, 2005; 8 (3): 320-338.
32. 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
33. 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.
34. 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
35. 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.
36. 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.
37. Safford S. D., Freemerman 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

38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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
42. 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.
43. 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
44. 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.
45. Whittle S., Gosain A., Brown P. Y. S., et al. Regression of a congenital mesoblastic nephroma // Pediatric Blood & Cancer, 2010; 55 (2): 364-368.
46. 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

8. 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.

9. 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-diferenciāldiagnostiskās 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 2010. gads
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.

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 maniemi kolēģiem patoloģiem un histoloģijas laborantiem Bērnū klīniskās universitātes slimnīcas Bērnū 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 (projekts „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē”; vienošanās Nr.2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009) par dāvāto iespēju veltīt kādu laiku zinātniskajam darbam, nedomājot par materiālajām grūtībām.