

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Marina M. Đurišić

HETEROGENOST STATUSA MYCN ONKOGENA I
PRISUSTVO DELECIJE 1p KOD BOLESNIKA SA
NEUROBLASTOMOM U SRBIJI

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marina M. Đurišić

HETEROGENITY OF MYCN ONKOGENE STATUS
AND 1p DELETION IN SERBIAN
NEUROBLASTOMA PATIENTS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

MENTORI:

Profesor dr Marija Guć-Šćekić

Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Profesor dr Sofija Pavković-Lučić

Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Docent dr Dragana Vujić

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Naučni saradnik dr Nasta Tanić

Institut za nuklearne nauke Vinča, Beograd

DATUM ODBRANE:

28.03.2014.

Naslov

„HETEROGENOST STATUSA *MYCN* ONKOGENA I PRISUSTVO DELECije 1p KOD BOLESNIKA SA NEUROBLASTOMOM U SRBIJI “.

Rezime

Neuroblastom je najčešći ekstrakranijalni solidni tumor u dečjem uzrastu. Klinički tok neuroblastoma je veoma varijabilan i zavisi od uzrasta u kome se dijagnostikuje, stadijuma, histologije i genetičkih promena kao što su amplifikacija *MYCN* onkogen (MNA), aberacije na hromozomima 1p, 11q i ploidija . Ovako različit klinički tok ukazuje na genetičku heterogenost tumora sa mnogim genima-kandidatima koji su se izdvojili nakon više godina proučavanja.

Predmet ove doktorske disertacije je utvrđivanje *MYCN* statusa na uzorcima tumora bolesnika sa neuroblastomom. *MYCN* status je određivan fluorescentnom in situ hibridizacijom (FISH) i detekcijom broja signala na nivou ćelije na uzorku tumora, a taj broj se prezentuje kao:

- normalan status,
- višak *MYCN* (*MYCN* umnožen do 4 puta) i
- amplifikacija *MYCN* (*MYCN* umnožen preko 4 puta)

Predmet disertacije je i utvrđivanje prisutva ili odsustva delecije na kratkom kraku hromozoma 1 (1p36.3) takođe na tumorskim uzorcima. Delecija 1p36.3 je detektovana FISH metodom ili poređenjem DNK markera tumorskog tkiva i periferne krvi bolesnika nakon PCR reakcije.

Istraživanje je obuhvatilo grupu od 72 bolesnika sa neuroblastomom lečenih na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ između 1997.godine i 2012.godine.

Ispitivanje *MYCN* statusa je imalo za cilj poređenje bioloških i kliničkih karakteristika tumora koji imaju MNA sa onim tumorima koji imaju višak *MYCN* onkogen. Cilj istraživanja je bio i određivanje uticaja različitog statusa *MYCN* na tok i ishod bolesti, kao i utvrđivanje korelacije MNA i viška *MYCN* sa prisustvom delecije

1p36.3 i procene rizika nakon udruživanja ovih parametara. Utvrđeno je da je MNA udružena sa ostalim nepovoljnim prognostičkim karakteristikama – uzrastom iznad 19 meseci, višim stadijumima bolesti i prisustvom delecije 1p36.3 ima za posledicu lošiju prognozu i ishod bolesti. Višak *MYCN* onkogen je udružen sa višim stadijumima bolesti, ali je ravnomerno prisutan i u povoljnom i u nepovoljnom uzrastu, kao i među grupama bolesnika sa del 1p36.3 i bez del 1p36.3 pa je njegov uticaj na tok i ishod bolesti vezan za ostale prognostičke parametre. Delecija 1p36.3, iako češće udružena sa nepovoljnim prognostičkim karakteristikama (nepovoljnim uzrastom, MNA, višim stadijumima bolesti), kao ni višak *MYCN* onkogen, nisu izdvojeni kao nezavisni prognostički parametri u istraživanjima u ovom radu.

Ključne reči: neuroblastom, višak *MYCN* onkogen, amplifikacija *MYCN* onkogen, delecija 1p36.3, prognostički faktori

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Medicinska genetika

UDK broj:

Title

„HETEROGENITY OF MYCN ONKOGENE STATUS AND 1p DELETION IN SERBIAN NEUROBLASTOMA PATIENTS“

Summary

Neuroblastoma is the most common extra cranial solid tumour in childhood. The clinical course of neuroblastoma is variable and it depends of the age at the time of diagnosis, stadium, histology and genetic aberrations such as amplification of *MYCN* oncogene (MNA), aberrations of chromosomes 1p, 11q and ploidy. This variable clinical course also points at genetic heterogeneity of neuroblastoma with numerous genes-candidates that were detected over the past years.

The aim of this doctoral dissertation was detection of *MYCN* status in tumour samples of neuroblastoma. *MYCN* status was detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) counting the number of signals at the single cell level and it was presented as:

- normal status,
- *MYCN* gain (*MYCN* amplified ≥ 4 -fold) and
- amplification of *MYCN* (*MYCN* amplified > 4 -fold)

Also, the aim of this work was detection of presence or absence of 1p36.3 deletion in tumour samples. 1p36.3 deletion was detected either by FISH or by comparison of DNA markers in tumour tissue and peripheral blood samples after PCR reaction.

This investigation included a group of 72 patients diagnosed with neuroblastoma at the Mother and Child Health Institute of Serbia „Dr Vukan Čupić“ between years 1997 and 2012.

The goal of *MYCN* status evaluation was comparison of biologic and clinical characteristics between neuroblastoma with MNA compared to tumours with *MYCN* oncogene gain and its significance to clinical course and the outcome. Also, we determined correlation of MNA and *MYCN* gain with presence of 1p36.3 deletion evaluating the risk on multivariate analysis. It has been confirmed that MNA associated with the other poor

prognostic markers (age > 19 months, higher clinical stage, 1p36.3 deletion) leads to poorer prognosis and the outcome.

MYCN oncogene gain is associated with a higher clinical stage, but is evenly distributed within a favourable and a non-favourable age groups, as well as, among the groups with or without 1p36.3 deletion, so that its influence on the course and the outcome is connected with the other prognostic parameters.

1p36.3 deletion, although is more commonly associated with a non-favourable prognostic parameters (age, higher clinical stages, MNA) is not, similar to *MYCN* gain, independent prognostic parameter.

Key words: neuroblastoma, *MYCN* gain, *MYCN* amplification, 1p36.3 deletion, prognostic factors

Scientific field: Biology / Medical genetics

UDK number:

Zahvaljujem se svima koji su na različite načine doprineli istom cilju – izradi doktorske disertacije pod nazivom „Heterogenost statusa MYCN onkogeni i prisustvo delecije 1p kod bolesnika sa neuroblastomom u Srbiji“:

- Mentoru, prof. dr Mariji Guć-Šćekić na angažovanju tokom eksperimentalnog dela rada, kao i na korisnim smernicama i sugestijama tokom pisanja disertacije.
- Mentoru, prof. dr Sofiji Pavković-Lučić na konstantnoj podršci i pomoći u stručnom i logističkom delu izrade disertacije.
- Naučnom saradniku dr Nasti Tanić, na prijateljskom, ali visoko profesionalnom pristupu obavezama vezanim za izradu disertacije.
- Doc. dr sci med. dr Dragani Vujić na vremenu koje je izdvojila da bi se ovaj rad realizovao, a takođe i na neverovatnoj snazi i upornosti da se uvedu novine u dijagnostici i lečenju bolesnika sa neuroblastomom u Srbiji.
- Službi za hematologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ u Beogradu - načelniku dr sci med. dr Dragomiru Đokiću, lekarima dr Danki Redžić, dr sci med. dr Dragani Aleksić, dr sci med. dr Dragani Jevtić i, posebno Emiri Milićević, administrativnom asistentu, na spremnosti da mi pruže neophodne kliničke podatke o bolesnicima sa neuroblastomom, ali i objasne mnogobrojne pojmove i pojave iz oblasti medicine.
- Službi za kliničku patologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ u Beogradu – načelniku prim. dr sci med. dr Slaviši Đuričiću, višem naučnom saradniku i mr sci med. dr Gordani Samardžiji kao i svim tehničarima ove službe na izuzetnoj saradnji i kolegijalnom i prijateljskom odnosu.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. ISTORIJAT	2
1.2. EMBRIONALNI RAZVOJ NEURALNE KRESTE	3
1.2.1. Putevi migracije ćelija neuralne kreste i njeni derivati.....	5
1.2.2. Postganglijski simpatički neuroni i sinteza kateholamina	7
1.3. KLINIČKA SLIKA NEUROBLASTOMA	8
1.3.1. Lokalizovani tumor.....	11
1.3.2. Tumor sa metastazama.....	11
1.3.3. 4S tumor	11
1.4. DIJAGNOSTIKA NEUROBLASTOMA	12
1.4.1. Fizikalni pregled	12
1.4.2. Laboratorijske analize	12
1.4.3. Radiološka ispitivanja.....	12
1.4.4. Histopatološka analiza	13
1.4.5. Genetička ispitivanja.....	14
1.5. KLINIČKI STADIJUMI NEUROBLASTOMA.....	16
1.6. PROGNOСТИČKI FAKTORI I GRUPE RIZIKA.....	19
1.7. NAJČEŠĆE GENETIČKE PROMENE KOD NEUROBLASTOMA.....	23
1.7.1. Amplifikacija <i>MYCN</i> onkogeni	24
1.7.2. Delecija 1p i 11q.....	25
1.7.3. Poliploidija	26
2. CILJEVI.....	28
3. MATERIJAL I METODE	29
3.1. MATERIJAL	29
3.2. METODE	30
3.2.1. Molekularno-citogenetička analiza.....	30
3.2.2. Molekularno-genetička analiza	35
3.2.3. Citogenetička analiza	40
3.2.4. Statistička analiza	43
4. REZULTATI	46

4.1. UTICAJ POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB	49
4.1.1. Analiza uzrasta bolesnika pri postavljanju dijagnoze.....	49
4.1.2. Analiza kliničkih stadijuma bolesti	53
4.1.3. Analiza delecije 1p36.3.....	54
4.1.4. Analiza <i>MYCN</i> statusa	57
4.1.5. Analiza kariotipa.....	60
4.1.6. Analiza po grupama rizika	63
4.2. POREĐENJE UTICAJA <i>MYCN</i> STATUSA I OSTALIH POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB	65
4.2.1. <i>MYCN</i> status i uzrast pri postavljanju dijagnoze	65
4.2.2. <i>MYCN</i> status i stadijumi bolesti	68
4.2.3. <i>MYCN</i> status i delecija 1p36.3	69
4.2.4. <i>MYCN</i> status i kariotip	71
4.2.5. <i>MYCN</i> status i grupe rizika	72
4.2.6. <i>MYCN</i> status i ishod bolesti	73
4.3. POREĐENJE UTICAJA DELECije 1p36.3 I OSTALIH POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB	74
4.3.1. Delecija 1p36.3 i uzrast pri postavljanju dijagnoze.....	74
4.3.2. Delecija 1p36.3 i stadijumi bolesti	77
4.3.3. Delecija 1p36.3 i <i>MYCN</i> status.....	78
4.3.4. Delecija 1p36.3 i kariotip	79
4.3.5. Delecija 1p36.3 i grupe rizika	80
4.3.6. Delecija 1p36.3 i ishod bolesti	82
5. DISKUSIJA	83
5.1. UTICAJ POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB	83
5.1.1. Analiza uzrasta bolesnika pri postavljanju dijagnoze.....	83
5.1.2. Analiza kliničkih stadijuma bolesti	84
5.1.3. Analiza delecije 1p36.3.....	86
5.1.4. Analiza <i>MYCN</i> statusa	87
5.1.5. Analiza kariotipa.....	88
5.1.6. Analiza po grupama rizika	89

5.2.	POREĐENJE UTICAJA <i>MYCN</i> STATUSA I OSTALIH POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB	90
5.2.1.	<i>MYCN</i> status i uzrast pri postavljanju dijagnoze	90
5.2.2.	<i>MYCN</i> status i stadijumi bolesti	91
5.2.3.	<i>MYCN</i> status i delecija 1p36.3	92
5.2.4.	<i>MYCN</i> status i kariotip	93
5.2.5.	<i>MYCN</i> status i grupe rizika	93
5.3.	POREĐENJE UTICAJA DELECIJE 1p36.3 I OSTALIH POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB	94
5.3.1.	Delecija 1p36.3 i uzrast pri postavljanju dijagnoze	94
5.3.2.	Delecija 1p36.3 i stadijumi bolesti	95
5.3.3.	Delecija 1p36.3 i <i>MYCN</i> status	95
5.3.4.	Delecija 1p36.3 i kariotip	96
5.3.5.	Delecija 1p36.3 i grupe rizika	96
6.	ZAKLJUČCI	98
7.	LITERATURA	101
8.	BIOGRAFSKI PODACI AUTORA	113

1. UVOD

Embrionalni kanceri su heterogena grupa kancera čije su ćelije nediferentovane i slične su ćelijama embriona u razvoju. Osnovne forme embrionalnih kancera su neuroblastom (uključujući ganglioneuroblastom), nefroblastom (Wilmsov tumor), retinoblastom i hepatoblastom. Ovo su tipični tumori u dečjem uzrastu i njihove kliničke i biološke karakteristike su uglavnom dobro poznate zahvaljujući kooperativnim grupama čija se saznanja iz kliničkih studija sabiraju i rezultuju u primeni efektivne terapije. Učestalost ovih tumora je retka i u odnosu na sve dečje kancere iznosi 7.6% za neuroblastom, 5.5% za nefroblastom i 2.1% za retinoblastom [1]. Neuroblastom (NB) je solidni tumor čije ćelije vode poreklo od ćelija neuralne kreste, pa je lokalizacija ovog tumora karakteristična za mesta migracije ovih ćelija, a to su srž nadbubrežne žlezde i paraspinalna mesta gde je prisutno tkivo simpatičkog nervnog sistema. Približno 40% neuroblastoma se dijagnostikuje u toku prve godine života, 75% se dijagnostikuje do četvrte godine života, dok se do 10. godine dijagnostikuje 98% neuroblastoma [2]. Incidenca neuroblastoma se uglavnom izražava kao broj novodijagnostikovanih slučajeva za godinu dana i godišnja incidenca iznosi 1/70.000 kod dece ispod 15 godina [3]. Prevalenca se kreće od 1-5 / 10.000, odnosno 1/7.000 živorođene dece [2,3]. Smrtnost od neuroblastoma iznosi 15% od ukupne smrtnosti izazvane malignim tumorima kod dece [4]. Po učestalosti malignih bolesti, neuroblastom je na četvrtom mestu, a prethode mu leukemije, kranijalni tumori i limfomi.

Klinički tok kod neuroblastoma varira od spontane regresije nekih tumora do neizlečive bolesti uprkos primeni multimodalne terapije. Tok bolesti i ishod najviše zavise od uzrasta, stadijuma, histologije i određenih genetičkih promena. U zavisnosti od kombinacije ovih parametara su formirane i grupe rizika (mali, srednji i visok rizik), a na osnovu procenjenog rizika primenjuje se i adekvatan terapijski protokol [2].

Neke genetičke promene, kao što su ploidijska, amplifikacija onkogeni ili alelski gubitak (engl. allelic loss), koje su identifikovane kod neuroblastoma stoje u asocijaciji sa

kliničkim tokom. Na primer, „near“ triploidija je asocirana sa povoljnim ishodom bolesti dok je *MYCN* amplifikacija ili gubitak heterozigotnosti na hromozomu 1p udružen sa agresivnim tumorima i lošim ishodom [2]. Ova i mnoga druga zapažanja vezana za biološku osnovu neuroblastoma daju uvid u mehanizme maligne transformacije i progresije, kao i spontane diferencijacije i regresije. Neke od ovih genetičkih promena, kao što je amplifikacija *MYCN* onkogen, predstavljaju značajan parametar u predviđanju odgovora na terapiju i ishoda bolesti i kao takve su postale esencijalna komponenta u karakterizaciji tumora prilikom postavljanja dijagnoze.

1.1. ISTORIJAT



Slika 1. Rudolf Virchow (preuzeto sa <http://en.wikipedia.org/wiki/Neuroblastoma>)

Nemački lekar Rudolf Virchow je 1864. godine prvi opisao neuroblastom kao abdominalni tumor kod dece označivši ga kao “gliom” (*glioma*) (slika 1) [5].

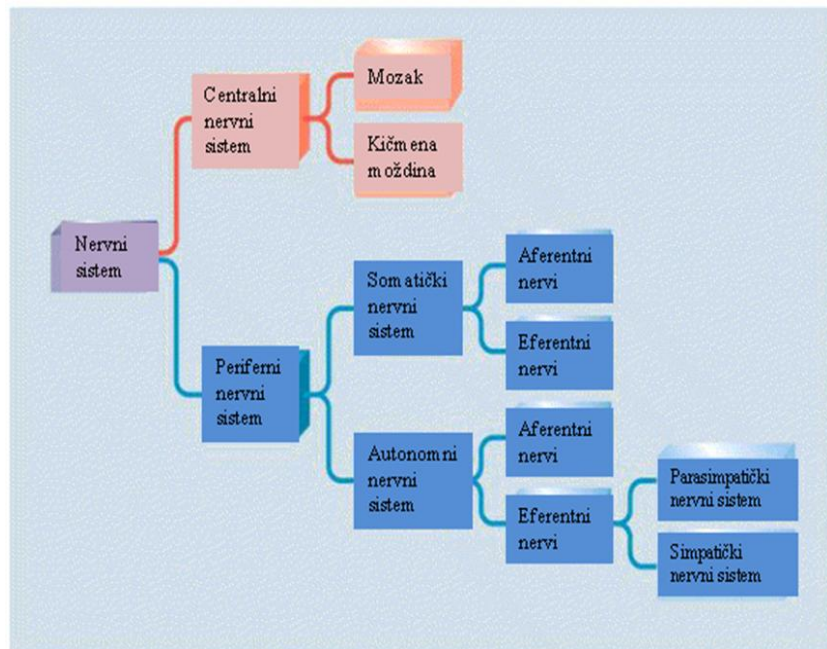
Na početku 20. veka tri lekara, James Homer Wright, William Pepper i Robert Grieve Hutchison, su imala značajnu ulogu u definisanju patologije neuroblastoma i definisanju načina metastaziranja vezano za uzrast pacijenata. Ova otkrića su dovela do poboljšanja terapije i smanjenja morbiditeta danas. James Homer Wright je 1910. godine objavio rad „Neurocytoma or neuroblastoma: a kind of tumor not generally recognized“

gde je izneo svoje neslaganje sa patološkim dijagnozama ovog tumora prethodno opisanog kao sarkom, sarkom okruglih ćelija ili limfosarkom [6]. Neki bolesnici su imali diseminaciju u jetri, neki su imali metastaze u kostima, ali su svi bolesnici imali adrenalni tumor sa cirkularnim grupicama ćelija koje je on nazvao rozete. Zbog toga što su te ćelije bile identične ćelijama fetalnog adrenalnog tkiva on je ovaj tumor nazvao *neuroblastom*. Wright je prvi uočio da se ovaj tumor sastoji od primitivnih neuralnih ćelija. Druga dva lekara su u svojim prethodnim radovima opisali dva različita načina širenja tumora. William Pepper je 1901. godine objavio rad o grupi odojčadi sa adrenalnim tumorom i masivnom infiltracijom jetre bez širenja u kosti što bi, po danas važećoj klasifikaciji odgovaralo stadijumu 4S, a 1907. godine je Robert Grieve Hutchison publikovao svoje iskustvo sa sličnom patologijom kod starije dece koja su imala metastaze na lobanji i orbitama [7, 8].

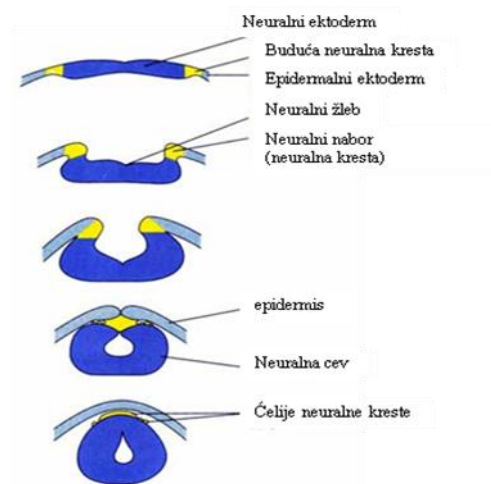
1.2. EMBRIONALNI RAZVOJ NEURALNE KRESTE

Nervni sistem se deli na centralni i periferni nervni sistem. Centralni nervni sistem (CNS) obuhvata mozak i kičmenu moždinu, dok se periferni nervni sistem (PNS) deli na somatski i autonomni nervni sistem. I somatski i autonomni sistem se sastoje od aferentnih (ushodnih) i eferentnih (nishodnih) vlakana (slika 2). Eferentna vlakna nervnog sistema imaju svoj simpatički i parasimpatički deo koji se razlikuju po svojim funkcijama, odnosno, obično izazivaju suprotne reakcije.

Svi delovi nervnog sistema nastaju od zadebljanja ektodermalnog dela dorzalne strane embriona koje se naziva neuralna ploča. Postavljanje neuralne ploče i epidermalnog ektoderma u položaj jedan pored drugog indukuje formiranje neuralne kreste (slika 3).



Slika 2. Podela nervnog sistema (preuzeto sa <http://wwwserver.medfak.ni.ac.rs/PREDAVANJA/3.%20FARMACIJA/ANATOMIJA/11.%20predavanje%20Pavlovic.pdf> uz modifikaciju)



Slika 3. Formiranje neuralne cevi i neuralne kreste (preuzeto sa <http://www.biog1105-1106.org/demos/106/unit03/media/neuralcrestdev.jpg> uz modifikaciju)

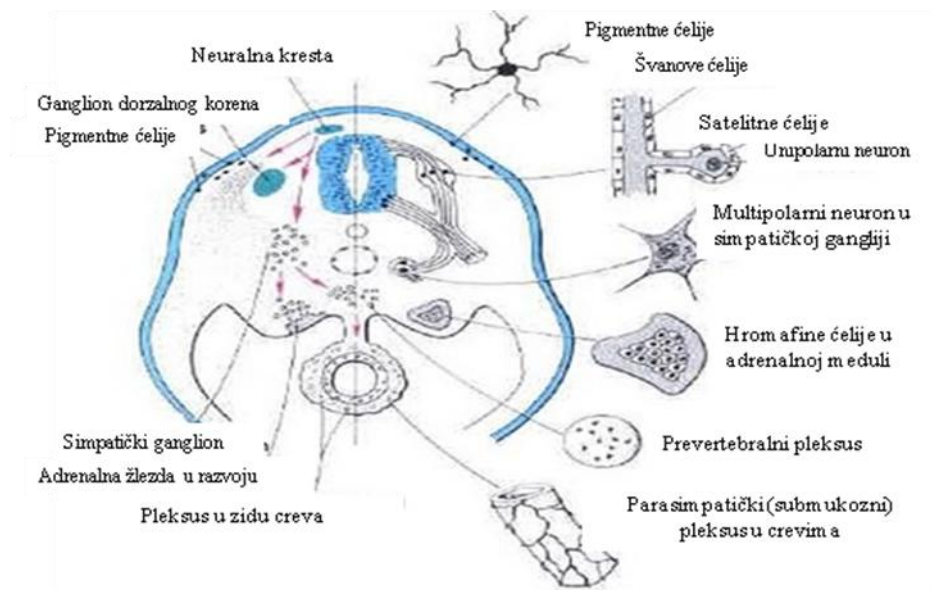
1.2.1. Putevi migracije ćelija neuralne kreste i njeni derivati

Nervna cev daje centralni nervni sistem, neuralna kresta daje periferni nervni sistem, a somiti daju tela pršljenova. Iako je derivat ektoderma, neuralna kresta se ponekad naziva četvrti germinativni sloj zbog svog značaja. Ćelije neuralne kreste migriraju i generišu veliki broj različitih tipova ćelija u koje spadaju i

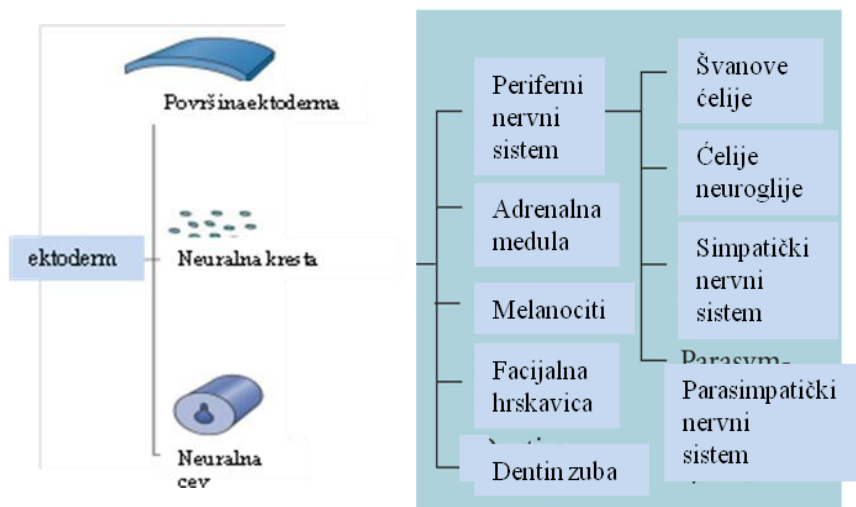
- [1] neuroni i ćelije glije senzornog, simpatičkog i parasimpatičkog nervnog sistema,
- [2] ćelije srži nadbubrežne žlezde
- [3] pigmentne ćelije epidermisa i
- [4] mnoge ćelije skeletnog i vezivnog dela glave.

Sudbina ćelija neuralne kreste u velikom delu zavisi od toga gde migriraju i gde se pozicioniraju (slika 4).

Neuralna kresta se deli na funkcionalne regione (regioni se preklapaju): kranijalni, kardijalni, vagalni i sakralni i trunkusni. Trunkusne ćelije neuralne kreste migriraju u dva glavna pravca: 1) *dorzolateralno* i tada formiraju melanocyte i 2) *ventrolateralno* kada formiraju senzorne (dorzalne korenove) i simpatičke neurone, srž nadbubrežne žlezde i Švanove ćelije (slika 5).



Slika 4. Putevi migracije ćelija neuralne kreste i derivati (preuzeto sa http://2.bp.blogspot.com/_EMVbNZzbRa8/S1NB8Dx4eoI/AAAAAAAAACs/nLG9Cw1r8pg/s1600-h/neuralcrest.jpg uz modifikaciju)



Slika5. Diferenciranje ćelija neuralne kreste (preuzeto sa http://www.d.umn.edu/~pschoff/documents/NeuralCrest_000.pdf uz modifikaciju)

1.2.2. Postganglijski simpatički neuroni i sinteza kateholamina

Postganglijski simpatički neuroni leže u simpatičkim ganglijama i njihovi aksoni se pridružuju perifernim spinalnim nervima i dolaze do ciljnih organa. Jedini izuzetak od ovakve inervacije jeste srž nadbubrežne žlezde (adrenalne medule). Preganglijski, a ne postganglijski simpatički neuroni inervišu srž nabubrega, tj. njene hromafine ćelije koje luče kateholamine adrenalin i noradrenalin. *Parasimpatički postganglijski neuroni* se nalaze u samom zidu ciljnih organa ili u ganglijama vrlo blizu njih, i vrlo su kratka, dok su kod simpatičkog sistema preganglijska vlakna kratka, a postganglijska dugačka.

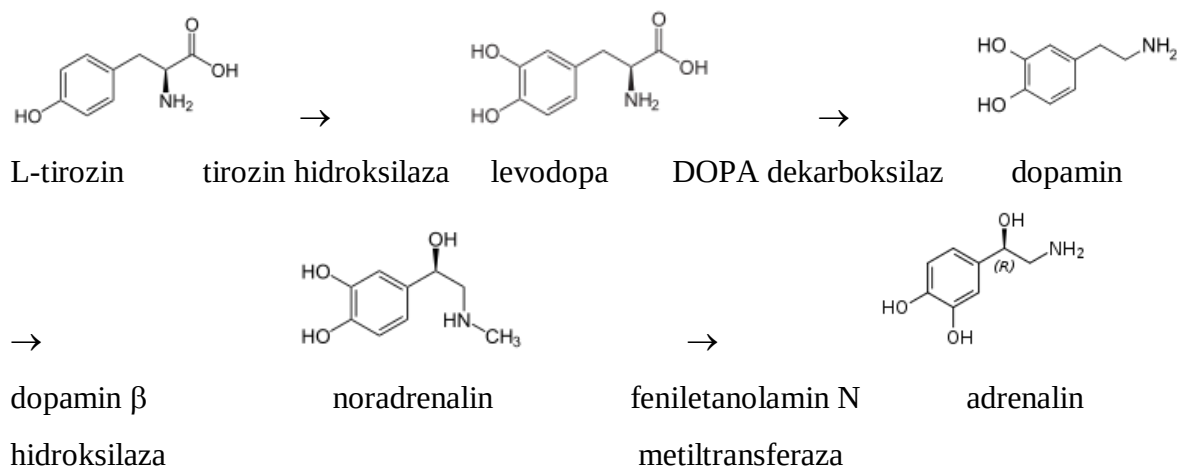
Adrenergička transmisija predstavlja vrstu nervne transmisije koja se odvija putem kateholamina. Ovakav vid transmisije se odvija na postganglijskim neuronima simpatičkog sistema, dok se na preganglijskim završecima odvija holinergička transmisija (nervna transmisija koja se obavlja putem acetilholina). Ova transmisije se, takođe, odvija i u CNS-u. Kateholamini su jedinjenja koja sadrže katehol (aromatični prsten sa dve hidroksilne grupe) i aminski bočni lanac različite dužine. Najznačajniji kateholamini su:

- *noradrenalin (norepinefrin)* – oslobađa se na krajevima simpatičkih nervnih završetaka i u CNS-u, a izlučuje ga i srž nadbubrežne žlezde;
- *adrenalin (epinefrin)* – hormon koji sekretuje srž nadbubrežne žlezde; takođe je i neurotransmiter u CNS-u;
- *dopamin* – neurotransmiter u CNS-u i u pojedinim organima na periferiji.

Put sinteze kateholamina (shema 1):

- iz aminokiseline tirozina pod dejstvom tirozin-hidroksilaze se sintetise dihidroksifenilalanin (DOPA) u citosolu nervnog završetka. Ovo je selektivan enzim i kontrolni enzim u sintezi.
- DOPA pod dejstvom dopa-dekarboksilaze prelazi u dopamin, takođe u citosolu. Ovaj enzim nije specifičan za DOPA. Dopamin prelazi u sinaptičke vezikule aktivnim transportom.
- pod dejstvom dopamin- β -hidroksilaze dopamin prelazi u noradrenalin. Ovaj enzim se nalazi vezan za membranu vezikula. Sintaza se ovde završava u noradrenergičkim neuronima.

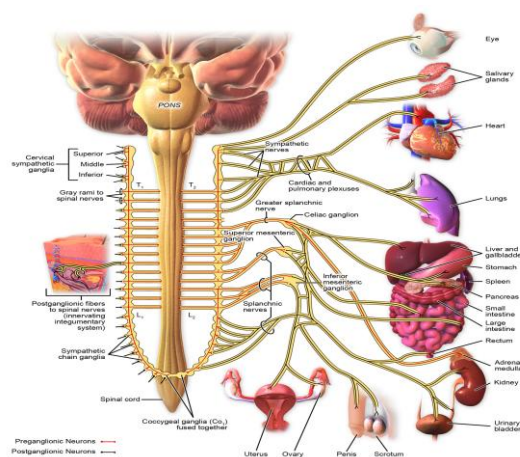
- enzim feniletanolamin-N-metiltransferaza katališe prelaz noradrenalina u adrenalin. Ovaj enzim se u najvećoj meri nalazi u adrenalnoj meduli, a mnogo manje i u CNS-u.



Shema 1. Put sinteze kateholamina (preuzeto sa <http://sr.wikipedia.org/sr/Kateholamin> uz modifikaciju)

1.3. KLINIČKA SLIKA NEUROBLASTOMA

Primarni tumor se najčešće javlja u abdomenu (65%), a polovina od ovih tumora nastaje u srži nadbubrega [9]. Trideset pet procenata se dijagnostikuje u paraspinalnim ganglijama, 20% u posteriornom delu mediastinuma, 5% u karlici i 5% na vratu [10].

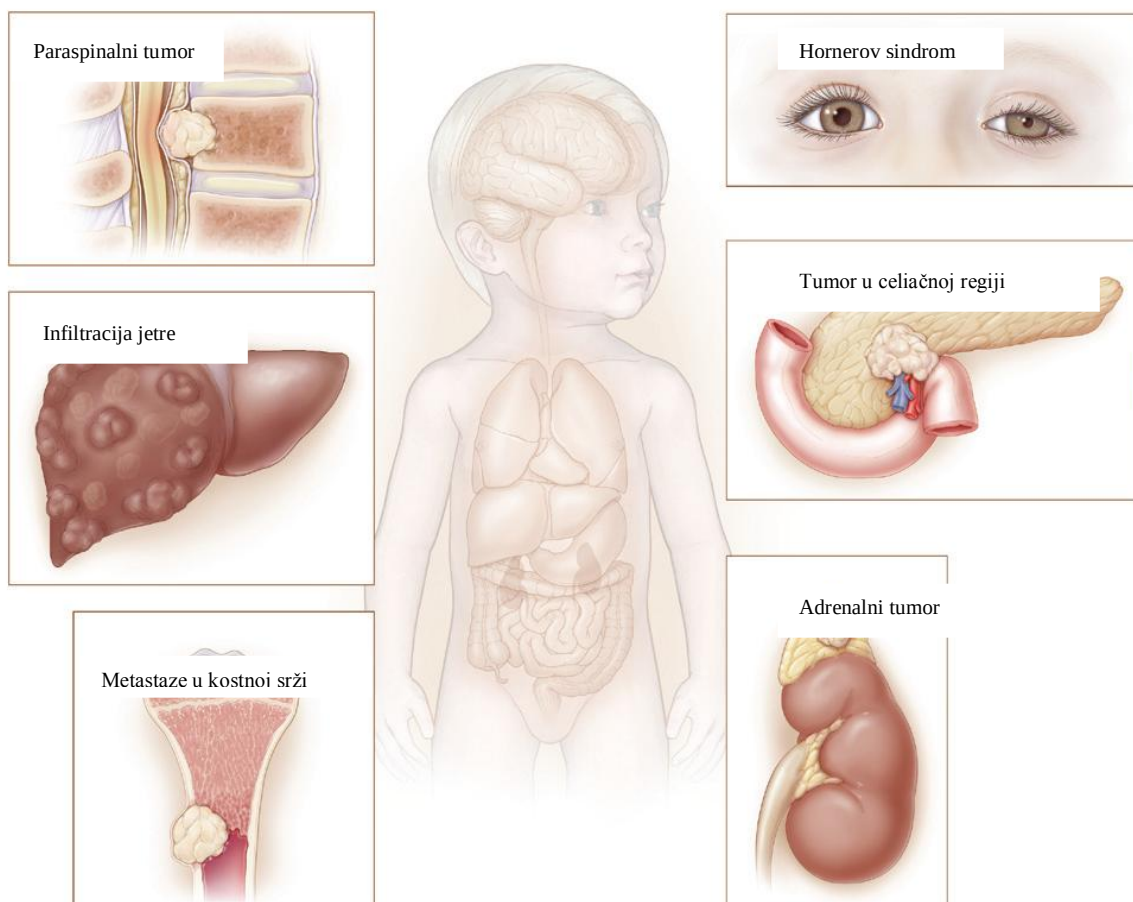


Simpatička inervacija

Slika 6. Simpatička inervacija (preuzeto sa http://en.wikipedia.org/wiki/File:Blausen_0838_Sympathetic_Innervation.png)

Simptomi variraju u zavisnosti od lokalizacije i veličine primarnog tumora kao i od postojanja metastaza i njihove lokacije. Najčešći simptomi su bol (u 34% slučajeva), povišena telesna temperatura (28%) i gubitak težine (21%) [11]. Kod nekih neuroblastoma, uglavnom u nižem stadijumu, nema simptoma i oni se dijagnostikuju slučajno. Postoje i simptomi koji su retki, ali karakteristični za neuroblastom i to su:

- pareza donjih ekstremiteta zbog intraspinalne ekspanzije primarnog paraspinalnog tumora (4%)
- teška dijareja zbog produkcije vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP) od strane tumorskih ćelija (4%)
- akutna cerebelarna encefalopatija koja se odlikuje ataksijom, munjevitim trzajima očnih jabučica (opsoclonus) i trzajima mišića (mioklonusom) koji su posledica nepoznatog metaboličkog poremećaja (2-8%)
 - Hornerov sindrom može biti prisutan kod bolesnika sa neuroblastomom koji je lokalizovan u regionu cervikalnih ili gornjih torakalnih simpatičkih ganglija (1-7%)
 - hipertenzija, crvenilo lica ili ekstenzivno znojenje zbog povećanih koncentracija kateholamina (0-2%) [9].



Slika 7. Klinička prezentacija neuroblastoma (Maris i sar., Lancet 2007)

Veliki broj neuroblastoma koji su u nižem stadijumu su inkapsulirani i mogu se odstraniti hirurški bez većih komplikacija, ukoliko lokalizacija to dozvoljava. Tumori u višim stadijumima infiltrišu okolne organe i mogu obuhvatiti važne nerve ili krvne sudove, što ih svrstava u neoperativne u vreme postavljanja dijagnoze. Neuroblastom obično metastazira u regionalne limfne čvorove i koštanu srž, a iz srži u korteks kosti. Takođe, često odredište diseminovanih tumorskih ćelija je jetra. Na osnovu ovih podataka dobijene su tri osnovne kliničke manifestacije neuroblastoma:

- lokalizovani tumor,
- tumor sa metastazama i
- 4S tumor [9].

1.3.1. Lokalizovani tumor

Lokalizovani tumori se otkriju kod približno 40% bolesnika sa neuroblastomom i mogu biti otkriveni slučajno, kao posledica medicinskih ispitivanja iz drugih razloga (pad, saobraćajna nezgoda) ili zbog pojave nekih simptoma koji su posledica pritiska tumora na okolna tkiva [9]. Obično se primarni torakalni tumori otkrivaju slučajno radiografski, dok cervikalni i paraspinalni tumori mogu dati već navedene simptome (Hornerov sindrom, simptomi vezani za kompresiju nerava i kičmene moždine) [9]. Ipak, najveći broj lokalizovanih tumora ima neupadljive simptome i ukoliko imaju povoljne biološke karakteristike, uspešno se leče hirurški [12-16].

1.3.2. Tumor sa metastazama

Oko 55% bolesnika starijih od jedne godine imaju metastaze u vreme postavljanja dijagnoze. Prvi korak u metastaziranju je lokalna invazija okolnog tkiva, kada maligne ćelije gube sposobnost ćelijske adhezije i postaju mobilne. Metastatsko širenje NB se može odvijati i limfnim i hematogenim putem. Najčešća mesta širenja ovog tumora su koštana srž, kosti, jetra, limfni čvorovi i koža. Metastaze u ostalim organima, kao što su mozak i pluća su retke, ali se viđaju i to češće u relapsu. Za razliku od bolesnika sa lokalizovanim tumorom, bolesnici sa NB koji imaju metastaze obično imaju izražene simptome bolesti kada se jave prvi put lekaru.

1.3.3. 4S tumor

Klinički najinteresantniji stadijum neuroblastoma označen je kao 4S gde oznaka S predstavlja skraćenicu za „specijalni“. Prvi ga je opisao D'Angio sa saradnicima 1971. godine [17]. Ova forma diseminovanog NB se javlja kod neonatusa i u prvim mesecima života, pa do 12 meseci starosti. To je mali i lokalizovani tumor, ali sa metastazama u jetri i/ili koži što rezultuje pojavom hepatomegalije i subkutanih nodula. Infiltracija koštane srži nije retka u ovom stadijumu, i iznosi do 10% ćelija. Kod stadijuma 4S često se javlja fenomen spontane regresije, što predstavlja pojavu nestanka kako primarnog tumora, tako i

metastaza bez ikakvog tretmana. Iako je pojava spontane regresije tumora viđena i kod drugih humanih kancera, kod neuroblastoma je incidenca ovog događaja veća 10 do 100 puta u odnosu na druge tumore [11].

1.4. DIJAGNOSTIKA NEUROBLASTOMA

Postavljanje dijagnoze NB obuhvata fizikalni pregled i različite laboratorijske analize.

1.4.1. Fizikalni pregled

Dijagnostička procedura počinje kompletnim pregledom bolesnika sa posebnim fokusom na abdomen, kao i palpacijom kostiju i procenom njihove osetljivosti i znakova deformiteta. Neophodno je utvrditi da li postoji hipertenzija, pregledati kožu i uraditi pregled očiju.

1.4.2. Laboratorijske analize

Osnovne laboratorijske analize, kao što su krvna slika i biohemijska analiza krvi, su neophodne jer se kod ovih bolesnika često sreću anemija, trombocitoza i niske vrednosti albumina. Laktat dehidrogenaza, feritin i neuron specifična enolaza, iako nespecifični markeri, često su povećani kod bolesnika sa neuroblastomom, naročito u odmaklom stadijumu i kod agresivnih tumora. Biohemijska analiza urina kojom se meri koncentracija kateholamina i njihovih produkata (dopamin, vanilmandelična i homovanilična kiselina) je od izuzetne važnosti s obzirom na to da su vrednosti ovih markera povećane kod 90-95% bolesnika [18].

1.4.3. Radiološka ispitivanja

Ultrazvučnim pregledom (UZ) se tumorska masa neuroblastoma u abdomenu obično vidi kao heterogena, solidna lezija. Dalja radiološka ispitivanja podrazumevaju kompjuterizovanu tomografiju (engl. computerised tomography, CT) na osnovu koje se

procenjuje kompozicija tumora, kalcifikacija, njegova veličina i finija lokalizacija, kao i postojanje regionalne invazije, zahvaćenost krvnih sudova i limfadenopatija. CT predstavlja zlatni standard u radiološkim ispitivanjima neuroblastoma i od izuzetnog je značaja kod tumorske mase u abdomenu, pelvisu i mediastinumu. Ni UZ ni CT ne zahtevaju primenu anesthetika.

Pregled celog tela korišćenjem 123Jod-metajodobenzilguanidina (123I-MIBG) ima visoku specifičnost i senzitivnost i otkriva tumorsku masu, metastaze i infiltraciju koštane srži u preko 90% neuroblastoma. Od velikog je značaja u proceni stadijuma i praćenju odgovora na terapiju, pogotovo kod bolesnika sa visokim rizikom kod kojih je MIBG pozitivna rezidualna bolest značajno nepovoljan prognostički faktor [19, 20]. U onim slučajevima kada je MIBG negativan (oko 10%) preporučuje se korišćenje tehnecijum 99m metilendifosfonata (MDP).

Magnetna rezonanca (MR) se koristi kod paraspinalne lokalizacije tumora za procenu involviranosti kičmene moždine, a takođe dobro ocrta abdominalnu tumorsku masu bez izlaganja bolesnika radioaktivnim supstancama. Međutim, s obzirom na uzrast bolesnika, najčešće je neophodna opšta anaestezija da bi se sproveda ova dijagnostička procedura.

X-zračenje se koristi kao dopunska dijagnostička procedura.

1.4.4. Histopatološka analiza

Definitivna dijagnoza se postavlja nakon patohistološkog pregleda tumorskog tkiva dobijenog biopsijom ili kompletnom hirurgijom. Procena stepena ćelijske diferencijacije unutar tumora predstavlja glavnu osnovu histološke analize. Termin „neuroblastom“ se koristi za sve tipove neuroblastičnih tumora koji se međusobno razlikuju po stepenu diferencijacije ćelija i po prisutnosti Švanove strome. Postoje četiri kategorije perifernih neuroblastičnih tumora:

1.neuroblastom (nediferentovani, slabo diferentovani ili diferencirajući je bogat neuroblastima sa malo Švanove strome),

2.intermiksni ganglioneuroblastom (bogat Švanovom stromom),

3.nodularni ganglioneuroblastom (mešovita zastupljenost neuroblastoma sa bogatom ili predominirajućom stromom i neuroblastoma sa siromašnom stromom).

Intermiksni i nodularni ganglioneuroblastom pripadaju središnjoj kategoriji jer poseduju osobine i nediferenciranog neuroblastoma i diferentovanog ganglioneuroma.

4.ganglioneurom (sazrevajući ili zreli je dobro diferentovan benigni tumor sa zrelim ganglioznim ćelijama, sa dosta Švanove strome i oskudnim neuroblastima) [21-24].

Shimada i saradnici su 1999. godine uveli u internacionalni klasifikacioni sistem neuroblastoma povoljnu i nepovoljnu histološku grupu koja se bazira na uzrastu bolesnika i na mitotskom i karioreksnom indeksu (engl. mitosis-karyorrhexis index MKI, broj mitoza i karioreksi na 5000 ćelija) [22, 23].

1.4.5. Genetička ispitivanja

Genetička ispitivanja kod neuroblastoma mogu da se vrše na uzorku tumorskog tkiva i/ili na uzorku koštane srži.

1.4.5.1. Tumorsko tkivo

Detekcija prisustva ili odsustva amplifikovanog *MYCN* onkogeni u tumorskom tkivu je prvi i najvažniji korak u genetičkim ispitivanjima neuroblastoma. Amplifikacija *MYCN* onkogeni predstavlja nezavisan prognostički parametar, uz uzrast i stadijum bolesnika. Preporuka Biološkog komiteta Internacionalne grupe za procenu rizika kod neuroblastoma (engl. International Neuroblastoma Risk Group - INRG Biology Committee) je da se određivanje *MYCN* statusa vrši fluorescentnom *in situ* hibridizacijom na interfaznim jedrima tumora (engl. Interphase fluorescence in situ hybridization, I-FISH). U tabeli 1. su dati genetički markeri koje treba analizirati po preporuci INRG (2009) [25].

Tabela 1. Genetički markeri koji se analiziraju i koriste u terapijskoj stratifikaciji

Genetički markeri definisani od strane INRG	Preporučene tehnike	Preporučene DNK probe i komentar
Markeri koje je neophodno analizirati		
<i>MYCN</i>	I-FISH,PCR, aCGH, MLPA	Dvobojni I-FISH:BAC ili drugi veliki DNK-insertovani klon za <i>MYCN</i> gen i klon slične veličine za gen/lokus na dugom kraku hr.2 (pr.LAF na 2q11).
11q23	PCR; aCGH MLPA	Treba koristiti komercijalne probe kad god je to moguće
Ploidija	Protočna ili statična citometrija	Normalne ćelije istog bolesnika treba da se koriste kao standard
Genetički markeri koje treba prospektivno analizirati		Komercijalno dostupne platforme
1p	aCGH, SNP , MLPA	
2p		
<i>DDX1</i>		
<i>NAG</i>		
<i>ALK</i>		
3p		
4p		
7q		
9p		
12p		
14q		
17q		
Ostali markeri	aCGH, SNP	

aCGH-komparativna genomska hibridizacija, BAC-bakterijski arteficialni hromozomi, I-FISH- interfazna fluorescentna in situ hibridizacija, MLPA-multipleks ligaza zavisna amplifikacija, PCR-reakcija lančanog umnožavanja DNK, SNP-polimorfizam jednog nukleotida

1.4.5.2. Koštana srž

Kod bolesnika sa NB kod kojih postoji infiltracija radi se analiza kariotipa iz uzorka koštane srži. Najčešće detektovane citogenetičke promene su delecija 1p36.3, 17q višak (17q gain), „double“ minutni hromozomi (dmin) i homogeno obojeni regioni (homogeneously staining regions-hsr).

Na aspiratu iz koštane srži ili na uzorku biopsije koštane srži I-FISH za *MYCN* onkogen može pouzdano da se interpretira jedino u slučaju amplifikacije [25].

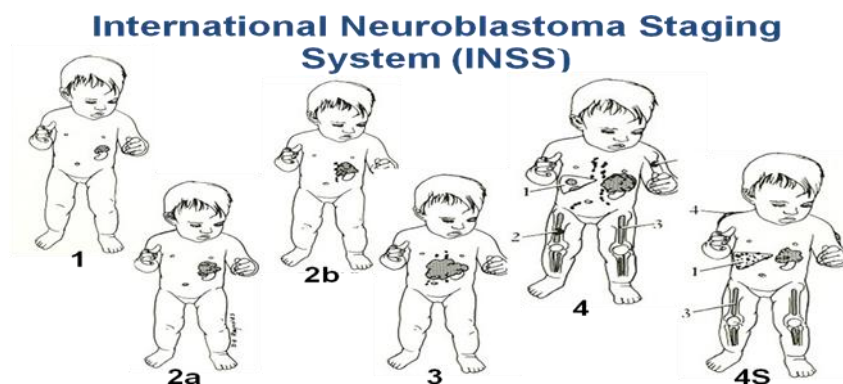
Određivanje prisustva enzima *tirozin hidroksilaze* (TH) se koristi za detekciju ćelija neuroblastoma u koštanoj srži ukoliko postoji infiltracija. TH je prvi enzim u sintezi kateholamina koja se odigrava u ćelijama neuroblastoma. Ćelije koštane srži nemaju aktivnu tirozin hidroksilazu i ukoliko se dokaže prisustvo ovog enzima, znači da infiltracija postoji. Analiza se sprovodi iz svežeg uzorka koštane srži, bilo da je u pitanju aspirat ili biopsija. Dokazivanje prisustva aktivnosti TH se radi putem detekcije prisustva informacione RNK (iRNK). Iz mononuklearnih ćelija se nakon ekstrakcije RNK sintetiše komplementarna DNK (engl.-complementary DNA, cDNA), a zatim sledi reakcija lančanog umnožavanja DNK korišćenjem enzima reverzne transkriptaze (engl.-reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR). Nakon ove reakcije moguće je detektovati prisustvo jedne ćelije neuroblastoma u 10^5 negativnih ćelija [26].

1.5. KLINIČKI STADIJUMI NEUROBLASTOMA

Postoji nekoliko klasifikacija neuroblastoma u zavisnosti od izabranih kriterijuma. Prvu klasifikaciju je dao Evans sa saradnicima 1971.godine i ona se bazira na preoperativnom izgledu tumora dobijenog na osnovu radioloških ispitivanja [27]. Za obeležavanje stadijuma su korišćeni rimski brojevi u cilju razlikovanja lokalizovanih od metastatskih tumora (I-III vs. IV) i specijalnog stadijuma kod infanata (IV-S) (tabela 2).

Tabela 2. Podela neuroblastoma na stadijume – Evans, 1971	
Stadijum	Opis
I	Tumor ograničen na mesto nastanka
II	Tumor se širi od mesta nastanka, ali ne prelazi sedišnju liniju tela; limfni čvorovi sa iste strane tela mogu biti zahvaćeni
III	Tumor se širi na suprotnu stranu tela; limfni čvorovi na obe strane tela mogu biti zahvaćeni
IV	Udaljene metastaze (kosti, drugi organi, udaljeni limfni čvorovi)
IV-S	Tumor kao u stadijumu I i II, ali sa udaljenim metastazama ograničenim na jetru, kožu ili koštanu srž, ali ne zahvata kosti

Podela na stadijume kod neuroblastoma koja je najduže u upotrebi koristi arapske brojeve 1, 2 (A i B), 3, 4 i 4S. Ova podela je usvojena internacionalnim konsenzusom 1988. godine od strane Internacionalne grupe za podelu neuroblastoma na stadijume (International Neuroblastoma Staging System, INSS), a zatim je i revidirana 1993. godine [28, 29]. INSS određivanje stadijuma neuroblastoma se zasniva na postoperativnom izgledu tumora i okolnih organa i zavisi od procene hirurga (tabela 3) (slika 8).



Slika 8. Stadijumi neuroblastoma po INSS (preuzeto od: C. Patrick Reynolds, MD PhD, Childrens Hospital Los Angeles www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/slides/3756s1_07_REYNOL)

Tabela 3.

INSS podela neuroblastoma na stadijume (Brodeur, 1993)

STADIJUM 1:	Lokalizovani tumor koji je ograničen na područje porekla; kompletna makroskopska ekscizija sa ili bez mikroskopskih ostataka tumora, limfni čvorovi sa iste ili suprotne strane tumora nisu zahvaćeni tumorom mikroskopski
STADIJUM 2A:	Jednostrani tumor sa nekompletnom hiruškom (makroskopskom) ekscizijom; pregledani limfni čvorovi sa iste ili suprotne strane tumora nemaju mikroskopske metastaze
STADIJUM 2B:	Jednostrani tumor sa kompletnom ili nekompletnom hirurškom ekscizijom; sa metastazama u istostranim regionalnim limfnim čvorovima; limfni čvorovi sa suprotne strane tumora nemaju mikroskopske metastaze
STADIJUM 3:	Tumor infiltriše preko središnje linije sa ili bez zahvatanja regionalnih limfnih čvorova; ili jednostani tumor sa metastazama u regionalnim limfnim čvorovima sa suprotne strane tumora; ili tumor u središnjem delu tela sa obostranim metastazama u limfnim čvorovima
STADIJUM 4:	Širenje tumora u udaljene limfne čvorove, kostnu srž, jetru i/ili druge organe (izuzev onih koji su definisani u stadijumu 4S)
STADIJUM 4S:	Lokalizovan tumor, onako kako je definisan u stadijumu 1, 2A i 2B sa diseminacijom ograničenim na jetru, kožu i/ili kostnu srž (<10% malignih ćelija)

S obzirom na to da ovakvo svrstavanje u stadijume ima neka ograničenja, pogotovo kod procene stadijuma lokalizovanih tumora, Monclair i saradnici su 2008. godine predložili nove kriterijume za stratifikaciju koji kombinuju Evansovu podelu sa faktorima rizika definisanim radiološkim nalazima i ta podela je prihvaćena od strane Internacionalne grupe za procenu rizika kod neuroblastoma, svrstavanje u stadijume (engl. International Neuroblastoma Risk Group Staging System, INRGSS) (tabela 4) [30].

Tabela 4.

INRGSS podela na stadijume (Monclair, 2008)

STADIJUM L1:	Lokalizovani tumor ne zahvata vitalne strukture definisane IDRFa i ograničen je na jedan region
STADIJUM L2:	Lokalizovani tumor uz prisustvo jednog ili više IDRFa
STADIJUM M:	Udaljene metastaze (izuzev onih koji se javljaju u MS stadijumu)
STADIJUM MS:	Postojanje metastaza kod dece mlađe od 18 meseci i to u jetri, koži i/ili koštanoj srži. Primarni tumor može biti L1 ili L2

* IDRF, engl. Image-Defined Risk Factors - radiološki definisani faktori rizika kod neuroblastoma [30]

1.6. PROGNOŠTIČKI FAKTORI I GRUPE RIZIKA

Zbog varijabilnog ponašanja neuroblastoma, moderna strategija lečenja zahteva procenu rizika od lošeg ishoda kod ovih bolesnika, a on se procenjuje na osnovu kliničkih i bioloških karakteristika. Brojne studije su pokazale validnost terapija baziranih na grupama rizika i prognostički značaj bioloških varijabli. Tokom proteklih decenija su formirane grupe rizika kod bolesnika sa neuroblastomom, ali su se parametri razlikovali u Severnoj Americi, Evropi, Japanu i Australiji, tako da nije bilo moguće vršiti poređenja delotvornosti terapija. Svi istraživači koji su usvojili različite parametre za procenu rizika kod bolesnika sa NB, imali su 3 grupe rizika: nizak, srednji i visok rizik [31-33]. U tabeli 5. su dati parametri od značaja i njihov uticaj na rizik bolesnika koji je dala Grupa za dečju onkologiju (engl. Children Oncology Group, COG) koja je aktuelna u Severnoj Americi i Australiji [31, 32].

Tabela 5.

Prognostički faktori Grupe za dečju onkologiju (COG)

INSS stadijum	Uzrast	<i>MYCN</i> status	Shimada	DNK indeks	Grupa rizika
1	0-21god	bilo koji	bilo koja	bilo koji	niska
2A/2B	<365d	bilo koji	bilo koja	bilo koji	niska
	>365d- 21god	normalan	bilo koja	-	niska
	>365d- 21god	amplifikovan	povoljna	-	niska
	>365d- 21god	amplifikovan	nepovoljna	-	visoka
3	<365d	normalan	bilo koja	bilo koji	srednja
	<365d	amplifikovan	bilo koja	bilo koji	visoka
	>365d- 21god	normalan	povoljna	-	srednja
	>365d- 21god	normalan	nepovoljna	-	visoka
	>365d- 21god	amplifikovan	bilo koja	-	visoka
4	<365d	normalan	bilo koja	bilo koji	srednja
	<365d	amplifikovan	bilo koja	-	visoka
	>365d- 21god	bilo koji	bilo koja	-	visoka
4S	<365d	normalan	povoljna	> 1	niska
	<365d	normalan	bilo koja	= 1	srednja
	<365d	normalan	nepovoljna	bilo koji	visoka
	<365d	amplifikovan	bilo koja	bilo koji	visoka

U Evropi je oformljeno Međunarodno udruženje pedijatrijske onkologije Evrope za neuroblastom (engl. International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma, ESIOPEN) koje je formiralo svoju listu prognostičkih faktora i grupa rizika (tabela 6) [32].

Tabela 6. Prognostički faktori Međunarodnog udruženja pedijatrijske onkologije Evrope za neuroblastom (ESIOPEN)

ESIOP stadijum	Uzrast	MYCN status	Grupa rizika	Protokol	Hemoterapija
1	0-18g	bilo koji	niska	LNESG 2	ne
2O i 3O	0-11m	normalan	niska	LNESG 2	ne
	0-11m	amplifikovan	visoka	99.4	intenzivna
	> 12m-18g	normalan	niska	LNESG 2	ne
2N i 3N	> 12m-18g	amplifikovan	visoka	HR-NBL-1	veoma intenzivna
	0-11m	normalan	srednja	99.1	niska doza
	0-11m	amplifikovan	visoka	99.4	intenzivna
4	> 12m-18g	normalan	srednja	Neoperabilan	niska doza
	> 12m-18g	amplifikovan	visoka	HR-NBL-1	veoma intenzivna
	0-11m bez meta u k [^]	normalan	niska	99.2	ne*
	0-11m sa meta u k	normalan	srednja	99.3	niska doza
4S	0-11m	amplifikovan	visoka	99.4	intenzivna
	> 12m-18g	bilo koji	visoka	HR-NBL-1	veoma intenzivna
	0-11m	normalan	niska	99.3	ne*
	0-11m	amplifikovan	visoka	99.4	intenzivna

O-operabilan; N-neoperabilan; meta u k - metastaze u kostima [^] - definisane kao mIBG pozitivna mesta sa abnormalnim rentgen i/ili CT nalazom; * - u odsustvu simptoma koji ugrožavaju život

Tokom godina se ukazala potreba za objedinjavanjem podataka i uniformisanjem grupa rizika i terapija kako bi se poboljšali protokoli i povećala uspešnost lečenja. U prvoj deceniji 21. veka je pokrenuta inicijativa za formiranje međunarodne grupe koja bi spojila znanja vodećih svetskih centara za lečenje NB. Godine 2004. su se sastali vodeći istraživači velikih kooperativnih grupa, Grupe za dečju onkologiju (engl. Children Oncology Group COG, iz Severne Amerike i Australije), Nemačke pedijatrijske grupe za onkologiju i hematologiju (engl. German Pediatric Oncology and Hematology Group GPOH), Japanske

studijske grupe za uznapredovali neuroblastom (engl. Japanese Advanced Neuroblastoma Study Group JANB), Japanske kooperativne studijske grupe za neuroblastome kod odojčadi (engl. The Japanese Infantile Neuroblastoma Co-operative Study Group JINCS), Međunarodnog udruženja pedijatrijske onkologije Evrope za neuroblastom (SIOPEN) i eksperti za NB iz Kine radi dogovora o formiranju klasifikacionog sistema pre tretmana Internacionalne grupe za procenu rizika kod neuroblastoma (engl. International Neuroblastoma Risk Group INRG). Od 2009. godine usvojena je zajednička klasifikaciona shema koja je data u tabeli 7 [33].

Tabela 7. Klasifikaciona shema Internacionalne grupe za procenu rizika kod neuroblastoma pre tretmana usvojena konsenzusom

INRG stadijum	Uzrast (meseci)	Histološka kategorija	Stepen diferencijacije tumora	MYCN	11q aberacije	Ploidija	Grupa rizika pre tretmana
L1/L2		GN sazrev. GNB intermik.					A veoma nizak
L1		Bilo koji osim GN sazrev. GNB intermik		NA			B veoma nizak
				amp			K visok
L2	< 18	Bilo koji osim GN sazrev. GNB intermik		NA	Ne		D nizak
					Da		G srednji
	≥ 18	GNB nodul.; neuroblastom	diferencirajući	NA	Ne		E nizak
					Da		
			slabo dif.ili nediferetovan	NA			H srednji
				amp			N visok
M	< 18			NA		hiperdiploid	F nizak
	< 12			NA		diploid	I srednji
	12do< 18			NA		diploid	J srednji
	< 18			amp			O visok
	≥ 18						P visok
MS	< 18			NA	Ne		C veoma nizak
					Da		Q visok
				amp			R visok

GN - ganglioneurom, GNB - ganglioneuroblastom, GNB nodul.- nodularni ganglioneuroblastom, intermik.- intermiksni, dif.- diferenciran, sazrev.- sazrevajući, NA - nije amplifikovan, amp.- amplifikovan

INRG je pratila prognostički efekat 13 parametara kod 8800 NB bolesnika i vreme do pojave relapsa (engl.-event free survival, EFS). Sedam parametara je imalo visok statistički značaj i oni su izdvojeni i dati u tabeli 7. Kao i kod prethodnih stratifikacija, i INRG na prvo mesto stavlja stadijum i uzrast bolesnika. U ovoj studiji je utvrđeno da je granični uzrast između povoljnog i nepovoljnog ishoda između 15 i 19 meseci, pa je iz tog razloga uzeta granična vrednost od 18 meseci, za razliku od prethodnih klasifikacionih sistema gde je to bio uzrast od 12 meseci. Nekoliko genetičkih aberacija je u visokoj korelaciji sa ishodom bolesti. *MYCN* amplifikacija ima nepovoljan prognostički značaj i u INRG klasifikacionom sistemu *MYCN* status je taj koji opredeljuje bolesnike za različite grupe rizika pre tretmana. Takođe je pokazano da je aberacija 11q hromozoma u vezi sa lošijim ishodom kod bolesnika u L2 i MS stadijumu bez *MYC* amplifikacije. Slično kao i u prethodnim studijama i sada je pokazano da je DNK ploidijska od značaja kod bolesnika starosti ispod 18 meseci, u 4 stadijumu i bez *MYCN* amplifikacije. Kako nedavna istraživanja pokazuju da su NB tumori sa niskim rizikom definisani odsustvom *MYCN* amplifikacije, ali i drugih karakterističnih strukturnih aberacija (uključujući 11q i/ili 1p aberacije i/ili 17q višak), optimalno bi bilo da se genetički materijal NB analizira metodama pretrage celog genoma (engl. genome-wide tehnologijom). S obzirom na to da se radi o metodama koje nisu rutinske, ostaje da se ispituju mogućnosti jeftinijih i pristupačnijih genetičkih metoda.

1.7. NAJČEŠĆE GENETIČKE PROMENE KOD NEUROBLASTOMA

U poslednjih 20 godina mnoga istraživanja su rađena u cilju pronalaženja genetičke osnove nastanka NB i zaključeno je da su genetičke promene koje su od najvećeg značaja za razvoj i progresiju bolesti:

- *MYCN* amplifikacija,
- delecija hromozoma 1p i 11q i
- poliploidija [25, 34-36].

1.7.1. Amplifikacija *MYCN* onkogenena

Amplifikacija gena se odnosi na lokalizovanu genomsku promenu koja rezultuje povećanjem broja kopija jednog ili više gena. Amplifikacija *MYCN* protoonkogenena kod NB je tipičan primer kako se molekularnim putem aktivira onkogeni potencijal proto-onkogenena. *MYCN* onkogen (engl. v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)) lokalizovan je na kratkom kraku hromozoma 2 u regionu 2p24. Njegova amplifikacija se citogenetički prezentuje uočljivim hromozomskim aberacijama koje se detektuju ili kao homogeno obojeni regioni (hsr) ili kao tzv. „double“ minutni hromozomi (dmin). „Double“ minutni hromozomi predstavljaju ekstrahromozomalnu manifestaciju amplifikacije, a homogeno obojeni regioni su lokalizovani na različitim hromozomima, ali nikada na uobičajenoj lokalizaciji *MYCN* onkogenena, na 2p24 [34, 35]. Amplifikacija *MYCN* onkogenena se definiše kao prisustvo *MYCN* onkogenena u više od 10 kopija gena po ćeliji, a može iznositi i do 500 kopija iako je najčešći broj koji se sreće u tumorima između 50 i 100 kopija po ćeliji [36]. Veličina DNK koja se amplifikuje zajedno sa *MYCN* onkogenom varira i može biti od 1kb do više od 1Mb i ta DNK nije uključena u druge rearanžmane odnosno zadržava normalnu genomsku organizaciju [37]. S obzirom na veličinu amplifikovanog DNK segmenta postoji mogućnost da su, osim *MYCN* onkogenena, još neki geni amplifikovani. Utvrđeno je da je *DDX1* gen, koji je mapiran 400kb od 5' kraja *MYCN* onkogenena, amplifikovan u 50-70% slučajeva u kojima je amplifikovan i *MYCN* [38, 39], ali je pokazano da je, za sada, jedini gen koji je konstantno amplifikovan *MYCN* protoonkogen. Analiza DNK sekvence *MYCN* nije pokazala postojanje mutacija unutar kodirajućih regiona [40,41]. Iako nije poznat tačan mehanizam nastanka NB, pretpostavka je da amplifikacija dovodi do povećane ekspresije „wild type“ proteina i da to dovodi do tumorigeneze [36]. Eksperimenti su pokazali da je nemutiran *MYCN* protein transformišući faktor kod ćelijskih linija glodara i ljudi. Takođe, pokazano je da su sve kopije amplifikovanog gena transkripciono aktivne [42] što objašnjava visok nivo *MYCN* iRNK u ćelijama gde je ovaj gen amplifikovan [43].

Kod nekih NB, iako nema amplifikacije, *MYCN* status je ipak promenjen. FISH metodom je uočena duplikacija *MYCN* onkogeni i to na mestu gde se normalno mapira jedna kopija ovog protoonkogeni, u regionu 2p24 [44]. Ne zna se da li ova duplikacija prethodi amplifikaciji ili nezavisno od toga dovodi do tumorigeneze [36]. Takođe, jedan broj tumora (oko 6-8%) ima tzv. višak *MYCN* onkogeni kada je on prisutan u rasponu od jedne do osam kopija više od normalnog broja u ćeliji [25]. Smatra se da višak *MYCN* onkogeni nastaje kao posledica hromozomskih rearanžmana pr. nastankom izohromozoma 2p ili nebalansiranim translokacijama koje uključuju kratak krak hromozoma 2 [45].

Utvrđeno je da oko 25% primarnih NB imaju *MYCN* amplifikaciju [46]. Od tog broja, *MYCN* amplifikacija je prisutna kod 40% bolesnika sa uznapredovalim stadijumom, dok je 5 do 10% bolesnika sa *MYCN* amplifikacijom u nižem stadijumu. Amplifikacija *MYCN* onkogeni je u korelaciji sa odmaklim stadijumom bolesti, brzom progresijom tumora i lošim ishodom. Iz ovih razloga *MYCN* onkogen predstavlja nezavisan prognostički parametar [47] i ima veoma važnu ulogu kod određivanja terapijskog protokola.

1.7.2. Delecija 1p i 11q

Parcijalna monozomija kratkog kraka hromozoma 1 (1p) je jedna od najčešće viđenih hromozomskih aberacija u kariotipu primarnog tumora, a takođe i u ćelijskim linijama neuroblastoma. Danas se zna da je delecija 1p prisutna kod 30-35% NB tumora [48].

SRO (engl. smallest region of overlapping deletion) je mapiran citogenetički u regionu 1p34-p36 [49]. Delecija genetičkog materijala u tumorskom tkivu sugeriše prisustvo (a zatim i gubitak) tumor supresor gena. Još jedan posredni dokaz da se radi o tumor supresor genu na 1p je i taj što se prilikom transfera genetičkog materijala sa 1p u NB ćelijsku liniju suprimira tumorigeneza i indukuje diferencijacija [50]. Veliki broj molekularnih analiza na primarnim tumorima je redefinisao SRO uglavnom detekcijom gubitka heterozigotnosti za polimorfne DNK markere koji se nalaze na 1p i taj region se suzio na region 1p36.3. Potraga za tumor supresor genom je bazirana na „two-hit“ hipotezi koja kaže da oba alela jednog gena moraju biti van funkcije. Prototip ove hipoteze je gen za retinoblastom. Pretpostavka je da se delecijom eliminiše jedan alel, a drugi, normalan alel, se inaktivise

drugom genetičkom (mutacijom) ili epigenetičkom promenom (imprintingom). Kako još uvek nije otkriven tip mutacije koji dovodi do inaktivacije drugog alela pretpostavljenog tumor supresor gena, javila se mogućnost postojanja više tumor supresor gena u različitim regionima 1p. Takođe, moguće je da se tumor supresor gen ne inaktivira na način kako to pretpostavlja „two-hit“ hipoteza već da se u ovom slučaju radi o haploinsuficijenciji [11]. Smanjena doza jednog određenog ili, možda, više gena (engl. gene-dosage efekat) u regionu 1p36 nakon delecije može imati za posledicu nastanak NB. Nedavna istraživanja su pokazala prisustvo CHD5 gena u regionu 1p36 kao najznačajnijeg kandidata za ovu ulogu [51]. CHD5 gen se eksprimira u ćelijama nervnog sistema i kontroliše ćelijsku proliferaciju, starenje i apoptozu. Istraživanja su potvrdila da je ekspresija CHD5 niska u ćelijama NB sa 1p delecijom, a nakon transfekcije sa CHD5 rast tumora se smanjuje [51]. Još uvek se ne zna da li je uticaj ovog gena od prognostičkog značaja.

Delecija dugog kraka hromozoma 11 (11q) u regionu 11q23 je poslednjih godina dobila na značaju i 2009. godine je svrstana u jedan od 7 statistički značajnih prognostičkih parametara za klasifikovanje NB bolesnika u određenu grupu rizika [25]. Gubitak heterozigotnosti može da se odnosi na parcijalni gubitak samo dugog ili dela dugog kraka hromozoma 11 (nebalansirani LOH 11q), ili na gubitak celog hromozoma 11 (LOH 11) [52]. Nedostatak celog hromozoma 11 je detektovan kod 19% primarnih NB i on je u korelaciji sa tumorima koji su u nižem stadijumu, dok je nebalansirani LOH 11q detektovan kod 22% primarnih tumora i u korelaciji je sa višim stadijumima bolesti i tumorima bez *MYCN* amplifikacije [36].

1.7.3. Poliploidija

Poliploidija u ćelijama NB se može detektovati citogenetičkom analizom ili protočnom citometrijom (engl. flow cytometry). Oko 55% primarnih NB ima triploidiju ili „near“ triploidiju i sadrži 58-80 hromozoma. Preostalih 45% su ili „near“ diploidni tumori (35-57 hromozoma) ili „near“ tetraploidni tumori (81-103 hromozoma) [53]. DNK indeks predstavlja odnos detektovanog broja hromozoma u odnosu na očekivani broj (46 hromozoma). Diploidne ćelije imaju DNK indeks 1.0, dok „near“ triploidne ćelije imaju

DNK indeks u opsegu od 1.26 do 1.76. Bolesnici sa NB koji imaju detektovanu „near“ triploidiju u tumoru imaju povoljne kliničke i biološke prognostičke faktore i visoku stopu preživljavanja za razliku od bolesnika sa „near“ diploidijom ili „near“ tetraploidijom u tumoru. Ova asocijacija tumorske ploidije sa kliničkim parametrima i stopom preživljavanja ima najveći značaj kod odojčadi u odmaklom stadijumu NB [46].

2. CILJEVI RADA

Ciljevi istraživačkog rada u ovoj doktorskoj disertaciji su :

1. Utvrđivanje uticaja pojedinačnih parametara na preživljavanje bolesnika sa NB.
Ispitivani su sledeći parametri:
 - Uzrast bolesnika pri postavljanju dijagnoze
 - Klinički stadijumi bolesti
 - Delecija 1p36.3
 - *MYCN* status
 - Kariotip
 - Grupe rizika
2. Poređenje uticaja *MYCN* statusa i ostalih pojedinačnih parametara na preživljavanje bolesnika sa NB
3. Poređenje uticaja delecije 1p36.3 i ostalih pojedinačnih parametara na preživljavanje bolesnika sa NB

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

Istraživanja su obuhvatila grupu od 72 NB bolesnika kod kojih je rađena detekcija genetičkih parametara za koje se danas smatra da dovode do nastanka i progresije tumora, i analiziran je njihov uticaj na tok i ishod bolesti. Svi bolesnici uključeni u ovu studiju dijagnostikovani su i/ili lečeni u periodu od marta 1997. godine do septembra 2012. godine u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „dr Vukan Čupić“.

U grupi od 72 analizirana bolesnika sa NB bilo je 29 devojčica i 43 dečaka, uzrasta u rasponu od 1 mesec do 207 meseci. U ovoj grupi bolesnika su bili zastupljeni svi stadijumi po Evansovoj klasifikaciji (I, II, III, IV i IV-S), a samim tim i sve tri grupe rizika: nizak, srednji i visok rizik.

Genetički parametri koji su analizirani kod NB bolesnika bili su: status *MYCN* onkogen, određivanje prisustva ili odsustva del 1p36.3 i kariotip. Za potrebe ovih analiza korišćeni su sledeći uzorci: tumorski otisak, tumorsko tkivo, koštana srž i periferna krv bolesnika.

Materijal za analizu *MYCN* statusa i određivanje prisustva ili odsustva del 1p36.3 FISH metodom je dobijen neposredno nakon operacije pravljenjem tumorskog otiska na prethodno posebno tretiranim mikroskopskim pločicama (engl. polyprep, Sigma Adrich). Otisak je uzimao patolog i to sa dva različita mesta na tumoru zbog moguće genetičke heterogenosti tumora.

Određivanje prisustva ili odsustva del 1p36.3 je rađeno i PCR metodom praćenjem informativnih DNK markera u ovom regionu. DNK izolovana iz tumora je upoređivana sa DNK istog bolesnika koja je izolovana iz njegove periferne krvi. Dva uzorka tumorskog tkiva iz kojih je izolovana DNK uzimana su sterilno odmah nakon operacije, uporedo sa uzimanjem tumorskog otiska. Tumorsko tkivo je, takođe, uzimao patolog sa dva različita mesta na tumoru. Za izolovanje konstitutivne DNK uzimano je do 3ml periferne krvi sa

EDTA (etilendiamintetraacetatna kiselina) koja sprečava razgradnju DNK. Vreme dopremanja uzorka do laboratorije je iznosilo 10 min.

Za citogenetičku analizu je korišćen uzorak koštane srži od 0,5 do 2ml sa heparinom kao antikoagulansom, koji je stizao u laboratoriju obično posle 5 do 10 min.

3.2. METODE

3.2.1. Molekularno-citogenetička analiza [54]

3.2.1.1. Uzimanje i tretman tumorskog otiska i tumorskog tkiva

Tumorski otisak i tumorsko tkivo su uzimani za genetičku analizu neposredno nakon operacije, po sledećoj proceduri:

- „Polyprep-slide“ pločice obeležiti od 1 do 6 običnom olovkom i napisati ime i prezime bolesnika; spremiti 1 sterilnu epruvetu sa zatvaračem od 1,5 ml.
- Patolog uzima otiske (imprinte), a u epruvetu ubaciti deo tumora i na nju zalepiti nalepnicu sa imenom i prezimenom bolesnika.
- Pločice staviti u kivetu i naliti 70% etanolom, i tako držati 20 min, a epruvetu sa tumorom čuvati u zamrzivaču na -20°C .
- Nakon 20 min u etanolu pločice sušiti na vazduhu i odložiti u kivetu na -20°C . Sutradan raditi pretretman preparata.
- Sa donje strane pločice obeležiti dijamantskom iglom polje na kojem je otisak (pre početka pretretmana).
- Sve neophodne podatke o bolesniku uneti u protokol.

3.2.1.2. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) [54]

Status *MYCN* onkogen je određivan FISH metodom. Prema podacima Biološkog komiteta međunarodne grupe za procenu rizika kod neuroblastoma (engl. International Neuroblastoma Risk Group INRG, Biology Committee), *MYCN* status se klasifikuje na sledeći način:

- odsustvo amplifikacije *MYCN* onkogen (normalan status *MYCN*) je definisano kao balansirani odnos između broja *MYCN* specifičnog signala i broja kontrolnog signala na dugom kraku hromozoma 2 (2q).
- višak *MYCN* onkogen predstavlja povećan broj *MYCN* specifičnog signala do 4 puta u odnosu na referentni signal na dugom kraku hromozoma 2 (2q).
- amplifikacija *MYCN* onkogen je definisana kao povećan broj *MYCN* specifičnog signala više od 4 puta u odnosu na broj kontrolnog signala na dugom kraku hromozoma 2 (2q).

Status 1p36.3 je klasifikovan u 2 grupe:

- bez del1p36.3 (normalan status) - je definisan balansiranim odnosom signala posmatranog regiona i referentnog signala na suprotnom kraku hromozoma
- sa del1p36.3 - je definisan nebalansiranim odnosom signala posmatranog regiona i referentnog signala na suprotnom kraku hromozoma, s tim što je prisutan samo jedan signal posmatranog regiona

Pretretman preparata:

FISH je rađen na svežim tumorskim otiscima po sledećoj proceduri:

- tumorske otiske fiksirati 3 min u metanolu u kivetu na sobnoj temperaturi. Osušiti na vazduhu.
- inkubirati sa Rnazom (100µl Rnaze po preparatu), pokriti pokrovnim staklom i držati 1 sat na 37°C u vlažnoj posudi.
- ispirati 3x5 min sa 2xSSC na mešalici na sobnoj temperaturi
- inkubirati 10 min u rastvoru sa pepsinom/0,01M HCL na 37°C
- ispirati 2x5 min sa 1xPBS na mešalici na sobnoj temperaturi
- ispirati 1x5 min sa 1xPBS/50mM MgCl₂ na mešalici na sobnoj temperaturi
- postfiksacija 10 min sa 1xPBS/50mM MgCl₂/1% formaldehid na sobnoj temperaturi
- ispirati 5 min sa 1xPBS na sobnoj temperaturi

- dehidratacija u seriji etanola (na -20°C): 70% (3 min), 90% (3 min), 100% (3 min) osušiti na vazduhu i čuvati na sobnoj temperaturi
- posle pretretmana proveriti na faznom mikroskopu da li ima materijala na preparatima.

Rastvori koji su korišćeni u opisanoj proceduri su pravljani na sledeći način:

**RNase A* (koncentrovani rastvor, čuva se na -20°C): 10mgRNaze rastvoriti u 1ml 2xSSC. Od koncentrovanog rastvora uzeti 10μl i rastvoriti u 990μl 2xSSC.

**HCl 0,01M*: 166μl 37% HCl u 200ml vode

**Pepsin* (koncentrovani rastvor, čuva se na -20°C): 100 mg pepsina rastvoriti u 1 ml destilovane vode. Od koncentrovanog rastvora uzeti 50μl i rastvoriti u 100ml 0,01M HCL

**1xPBS* (za 1000 ml):

0,2 gr KCl + 0,2gr KH₂PO₄ + 8gr NaCl + 1,15gr Na₂HPO₄ - vodu dodati do 800ml, doterati PH=7,2 sa 1N HCl i dopuniti vodom do 1l.

**20xSSC* (za 1000ml):

175,32gr NaCl + 88,23gr Na-citrata - vodu dodati do 800ml, doterati PH=7,1 sa 1N HCl i dopuniti vodom do 1l.

**1xPBS/50mM MgCl₂*: 5ml 1M MgCl₂ + 95ml1xPBS

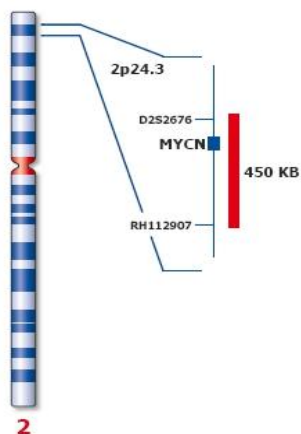
**1xPBS/MgCl₂ 50mM/ 1% formaldehid*:

94ml 1xPBS + 5ml 1M MgCl₂ + 1ml formaldehida

**1M MgCl₂* (MgCl₂ x 6H₂O, 99%, Mw=203,31): za 100ml rastvora odmeriti 20,331gr i rastvoriti u vodi.

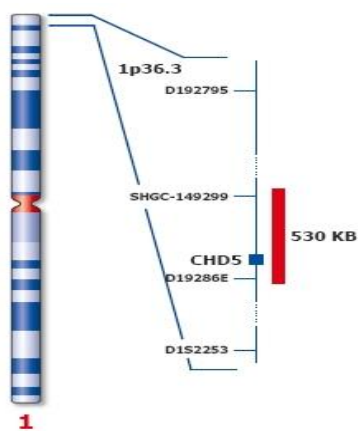
Hibridizacija:

Za analizu statusa *MYCN* onkogeno korišćena je fluorescentno obeležena DNK proba ON *MYCN* 2p24/LAF 2q11, (proizvođač: KREATECH DIAGNOSTIC). *MYCN* fluorescerntna proba je obeležena crvenom bojom. DNK proba za LAF gen na 2q11 omogućava identifikaciju hromozoma 2 i obeležena je zelenom bojom.



Shema 2. Lokalizacija MYCN i LAF probe na hromozomu 2. (preuzeto sa <http://www.kreatech.com/rest/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/solid-tumors/on-mycn-2p24-laf-2q11.html>)

Za analizu statusa 1p36.3 korišćena je fluorescentno obeležena DNK proba ON SRD (1p36)/SE1(1qh) (proizvođač KREATECH DIAGNOSTIC). Specifična DNK proba za 1p36 je dizajnirana tako da pokriva najmanji region konzistentne delecije (engl. smallest region of consistent deletion, SRD) između markera D1S2795 i D1S253i obeležena je crvenom bojom. DNK proba SE1 omogućava identifikaciju hromozoma 1 i obeležena je zelenom bojom.



Shema 3. Lokalizacija SRD 1p36 i SE1 (1qh) probe na hromozomu 1. (preuzeto sa <http://www.kreatech.com/rest/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/solid-tumors/srd-1p36.html>)

Kohibridizacija je rađena po protokolu proizvođača probe (u ovom slučaju KREATECH DIAGNOSTIC):

- naneti 10μl probe ili mešavine proba na preparat na površinu 22x22mm (to znači da bi pokrili celu površinu mikroskopske pločice naneti 2 x 10μl probe) pokriti pokrovnim staklom koje je prethodno oprano u rastvoru etar:etanol (1:1) i zalepiti fiksogumom. Paziti da se ne naprave mehurići!
 - denaturisati ovako pripremljen preparat na toploj ploči (ili u sterilizatoru) na 75°C između 5 i 10 min
 - prebaciti preparat u vlažnu komoru i ostaviti na 37°C preko noći
- ***vlažna komora se pravi tako što se u plastičnu kutiju za preparate stavi papirni ubrus koji se dobro navlaži rastvorom 2x SSC

Posthibridizacija:

Posthibridizacija je rađena po protokolu proizvođača probe (u ovom slučaju KREATECH DIAGNOSTIC):

- skinuti pokrovno staklo i spustiti preparate u 1x pufer za ispiranje I 2 min na 72°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) u vodenom kupatilu.
- prebaciti preparate u 1x pufer za ispiranje II 1 min u kivetu koja je obložena alu folijom, na sobnoj temperaturi.
- sledi dehidratacija u seriji etanola 70%, 85%, 100% (u svakom držati po 1 minut).
- sušiti preparate na sobnoj temperaturi, u zatvorenoj kutiji, van domašaja svetla
- nastaviti sa bojenjem jedara i hromozoma DAPI fluorescentnom bojom

Rastvori koji su korišćeni u opisanoj proceduri su pravljani na sledeći način:

**pufer za ispiranje I* : 0,4xSSC / 0,3% igepala

(standardni protokol je izmenjen i umesto igepala je korišćen TRITON X-100)

2ml 20xSSC + 98ml destilovane vode, zatim oduzeti 300μl pripremljenog rastvora, a dodati 300μl TRITON X-100

**pufer za ispiranje II* : 2xSSC / 0,1% igepal tj. TRITON X-100

10ml 20xSSC + 90ml destilovane vode, zatim oduzeti 100µl pripremljenog rastvora,
a dodati 100µl TRITON X-100

Bojenje jedara i hromozoma:

*na svaki preparat naneti 15µl DAPI/antifade, pokriti pokrovnim staklom i
posle 10 min gledati na mikroskopu sa fluorescencijom

3.2.2. Molekularno-genetička analiza

3.2.2.1. Izolacija DNK [54]

Izolacija DNK iz tumorskog tkiva

- Tumor iseckati u Petri šolji skalpelom.
- Isprati uzorak u RPMI medijumu i centrifugirati na 2000 rpm, 10 min.
- Odbaciti supernatant, dodati 5 ml pufera za ispiranje horiona, centrifugirati 10 min, 2000 rpm.
- Prosuti pufer za ispiranje horiona i talogu dodati 1 ml STE, 50 µl 10% SDS i 70 µl proteinaze K.
- Inkubirati u vodenom kupatilu sa šejkerom 2h, 55⁰ C.
- Podeliti u nove ependorfe po 250 µl (sa drugih 200 µl redestilovane vode isprati epruvetu i raspodeliti po 50 µl u svaku ependorficu).
- Dodati jednu zapreminu fenola (300 µl), promućkati dok ne pobeli.
- Centrifugirati, max rpm, 10 min.
- Supernatant prebaciti u nove ependorfe i dodati polovinu zapremine amonijum acetata i dve zapremine hladnog 96% etanola; blago okretati ependorficu.
- Staviti u frižider na -20⁰ C, 15 min, a zatim centrifugirati na 10 000 rpm 10 min.
- Prosuti etanol, osušiti talog i rastvoriti u odgovarajućoj količini vode.

Izolacija DNK iz periferne krvi

- Pripremiti epruvete od 2 ml.
- 1 ml periferne krvi sa EDTA sipati u epruvetu i dodati jednaku količinu Lysis I.
- Polako promućkati i tarirati.
- Centrifugirati 15 min na 5000 rpm (+4⁰ C).
- Polako odbaciti supernatant.
- Dodati 1 ml Lysis, resuspendovati talog i tarirati; centrifugirati 15 min na 5000 rpm (+4⁰ C)..
- Još jednom ponoviti ispiranje.
- Dodati 1,2 ml Lysis II.
- Resuspendovati, pa dodati 15 µl proteinaze K i 80 µl 10% SDS-a.
- Obmotati parafilm oko epruvete, staviti epruvetu u držač i ubaciti u vodeno kupatilo na 37⁰
- Nakon 2h, prebaciti epruvetu u drugo vodeno kupatilo koje je zagrejano na 56⁰ C i inkubirati 6 min.
- Dodati 400 µl 6M NaCl.
- Tarirati, pa zatim jako promućkati do pojave pene.
- Centrifugirati 15 min na 5000 rpm (4⁰ C).
- Prebaciti supernatant u novu epruvetu.
- Tarirati, pa zatim centrifugirati (pod istim uslovima).
- Raspodeliti supernatant u dve nove epruvete od 1,5 ml i dodati 96% etanola prethodno ohlađenog na -20⁰ C.
- Zatvoriti epruvete, a zatim ih lagano okretati do pojave niti DNK.
- Centrifugirati na 10 000 rpm, 5 min
- Odliti supernatant, okrenuti epruvete na papirnu vatu da se dobro ocede.
- Dodati destilovanu vodu u zavisnosti od količine taloga (obično 30- 50 µl).
- Čuvati u frižideru.

Rastvori koji su korišćeni u opisanoj proceduri su pravljeni na sledeći način:

**LYSIS I:* izmereni su sledeći reagensi i rastvoreni u destilovanoj vodi:

155 mM NH_4Cl

10 mM KHCO_3 pH 7,4

1 mM EDTA

Za jedan litar LYSIS I meriti: 8,3 g NH_4Cl , 1g KHCO_3 i 0,37 g EDTA.

pH doterati sa NaOH ili HCl na mešalici bez grejanja. Sterilizacija se vrši 15 min na 120-140⁰ C; čuvati na +4⁰ C do dva meseca.

**LYSIS II:* izmereni su sledeći reagensi i rastvoreni u destilovanoj vodi:

10 mM TRIS-HCl

400 mM NaCl pH 8,0

2 mM EDTA

Za jedan litar LYSIS II meriti: 1,21 g TRIS-HCl, 23,2 g NaCl i 0,74 g EDTA.

pH doterati sa NaOH ili HCl na mešalici bez grejanja. Sterilizacija se vrši 15 min na 120-140⁰ C, čuvati na +4⁰ C do dva meseca.

**10% SDS:* izmeren je sledeći reagens i rastvoren u destilovanoj vodi:

Rastvoriti 10 g SDS u 100 ml destilovanoj vodi (rastvoriti u manjoj količini, zagrejati, pa dopuniti do 100 ml)

Zagrejati na 68⁰ C da bi se pospešilo rastvaranje

Podesiti pH na 7,2 dodavanjem nekoliko kapi koncentrovane ili 1N HCl

U toku merenja nositi masku i očistiti vagicu; sterilizacija nije potrebna.

**6M NaCl :* izmeren je sledeći reagens i rastvoren u destilovanoj vodi:

350,7 g/l ili 175,37 g/0,5 l ili 87,675 g/250 ml

Rastvor je prezasićen (sa talogom).

Praviti dan pre korišćenja (sloj iznad taloga).

Čuvati na sobnoj temperaturi.

**PUFER ZA ISPIRANJE HORIONA:* izmereni su sledeći reagensi i rastvoreni u destilovanoj vodi:

50 mM TRIS

100 mM NaCl

1 mM EDTA

Za 100 ml pufera: 5 ml 1M TRIS, 3,33 ml 1M NaCl i 0,2 ml 0,5M EDTA rastvoriti u 100 ml destilovane vode .

Čuvati u frižideru na +4⁰ C.

**STE*: izmereni su sledeći reagensi i rastvoreni u 1l destilovane vode:

0,1 M NaCl

10 mM TRIS-Cl (pH 8)

1 mM EDTA (ph 8)

**PROTEINAZA K*: izmeren je sledeći reagens i rastvoren u destilovanoj vodi:

10 mg proteinaze K rastvoriti u 1 ml destilovane vode, podeliti u manje zapremine i čuvati na -20⁰ C.

3.2.2.2. PCR za detekciju D1S80 [55]

D1S80 je polimorfni lokus koji se nalazi na distalnom kraju kratkog kraka hromozoma 1, u regionu 1p36.3. To je midisatelit i zbog svoje visoke polimorfnosti se koristi u detekciji LOH 1p36. Do danas je poznato da na ovom lokusu postoje 32 alela koja variraju u veličini između 354bp i 850bp. Ukoliko je bolesnik sa NB heterozigot u konstitutivnoj DNK (DNK izolovana iz periferne krvi), nakon PCR reakcije i vizuelizacije PCR produkata na gelu, u koloni sa konstitutivnom DNK biće vidljive dve trake, a u koloni sa tumorskom DNK jedna traka ukoliko je došlo do delecije. Ako nema delecije 1p36.3 pojaviće se dve trake u koloni sa tumorskom DNK (shema 4).

Visina trake u baznim parovima(bp)	DNK iz periferne krvi	DNK iz tumora	DNK iz tumora	blank	DNK marker
Alel 1 (354- 850bp)					  
Alel 2 (354- 850bp)					 

Shema 4. Prikaz produkata PCR reakcije za polimorfni marker D1S80 sa DNK iz periferne krvi i iz tumora (neuroblastoma) na gelu od agaroze. Kolone 1 i 3 su heterozigoti, kolona 2 je homozigot za analizirani DNK marker

➤ PCR reakciona smeša se sastojala od sledećih komponenti:

10xkoncentrovani reakcioni pufer	2,50 µl
dNTPs (1,5 mM)	1,50 µl
D1S80a (10pmol)	1,00 µl
D1S80b (10pmol)	1,00 µl
Taq DNA polym. (5U/µl)	0,20 µl
H ₂ O	15,55 µl
MgCl ₂ (50mM)	1,25 µl
Uzorak DNK (100 ngr/µl)	<u>1,00 µl</u>
	25,00 µl

➤ Sekvenca prajmera za D1S80 je sledeća [55]:

D1S80a	TgCgTgTgAATgACCCAggAgCgTAT
D1S80b	TCTggCTTgTTTATTTgTCTTgTTggAg

➤ PCR uslovi su bili sledeći:

prePCR	94 ⁰ C	2 min
	94 ⁰ C	30 sec
30 ciklusa	60 ⁰ C	1 min
	72 ⁰ C	2.5 min
postPCR	72 ⁰ C	7 min

➤ Analiza PCR produkata:

Analiza PCR produkata se vrši na 2% agaroznom gelu, na horizontalnoj elektroforezi (45 min, 85V). Vizuelizacija traka se vrši uz pomoć etidijum bromida na UV transiluminatoru.

3.2.3. Citogenetička analiza

Citogenetička analiza je rađena iz uzoraka koštane srži bolesika sa NB koji je kultivisan u in vitro uslovima po sledećoj proceduri:

3.2.3.1. Kultura ćelija iz uzorka koštane srži-24h i preparacija hromozoma [54]

3.2.3.1.1. Postavljanje ćelijskih kultura iz uzorka koštane srži:

- Uzorak koštane srži stiže u epruveti u kojoj se nalazi 0,5ml heparina. U tako dobijenu koštanu srž dodati do 10ml podloge za ispiranje i prebaciti u graduisane epruvete za centrifugiranje.
- Centrifugirati 10 min na 1600 obrtaja i nakon toga dekantirati supernatant. Prema broju dobijenih leukocita praviti razblaženje u epruveti. Jedan deo uzeti u melanžer i puniti komoru za brojanje leukocita (obično se sadi $1,5 \times 10^6$ /ml). Na osnovu broja leukocita zasaditi uzorak koštane srži u odgovarajuću količinu podloge (15×10^6 ćelija u 10 ml podloge za sađenje) i držati na 37⁰C, 24^h.

- Posle 24^h u koštanu srž sa podlogom staviti kolhicin i nakon 1h raditi preparaciju.

3.2.3.1.2. *Preparacija hromozoma iz kulture ćelija koštane srži:*

Dva časa od ubacivanja kolhicina počinje preparacija hromozoma.

- Staklenom pipetom resuspendovati podlogu u epruveti.
- Centrifugirati na 2500 rpm 10 min
- Supernatant dekantirati i čistom pipetom sipati malo hipotonije, talog resuspendovati, a zatim doliti do 10 ml hipotonije i ostaviti u vodenom kupatilu 20 min na 37⁰C.
- Posle toga u svaku epruvetu dodati po 5 kapi tritona i centrifugirati na 2500 rpm 10 min
- Supernatant odliti, a talogu dodati malo fikstiva i resuspendovati. Epruvetu dopuniti fiksativom do 10 ml i ostaviti da stoji na sobnoj temperaturi 20 min
- Nakon toga centrifugirati na 2500 rpm 10 min
- Supernatant odliti, a talogu dodati 1ml fiksativa, resuspendovati i pipetom prebaciti u drugu epruvetu.
- Tako spojen materijal ponovo centrifugirati na 2500 rpm 10 min
- Zatim odliti supernatant, a talogu, u zavisnosti koliko ga ima, dodati 3-4 kapi fiksativa i 3-4 kapi 60%-tne sirćetne kiseline
- Na čistu pločicu nakapati 2-3 kapi materijala i sušiti preko plamena.
- Dobijeni preparati se boje rastvorom Giemsa boje 7-10 min

Na dobijenim preparatima je rađena klasična citogenetička analiza, a nakon toga i analiza G traka. G trake su dobijene sledećom procedurom:

3.2.3.1.3. Tehnika G traka

- Preliti preparate rastvorom tripsina, zatim preparat isprati puferom pH 6,8, nakon čega se boji rastvorom Giemsa boje 7-10 min

Tehnika G traka je rađena kako na neobojenim, tako i na obezbojenim preparatima.

Rastvori koji su korišćeni u opisanim procedurama su pravljani na sledeći način:

**Podloga za kultivisanje ćelija:*

RPMI 1640 (1X koncentrovan) za 100ml kompletne podlog: 80 ml podloge + 20 ml seruma engl.-(Fetal BovineSerum) +1 ml penicilina

**Penicilin (1000000i.j.):*

1000000i.j. u 10ml podloge $\Rightarrow$ 100000i.j./ml; uzeti 1ml i razblažiti sa 9ml podloge (10000i.j./ml); 1ml dodati na 100ml podloge finalne koncentracije 100i.j./ml

**Kolhicin:*

0,5mg (500 μ g) rastvoriti u 20ml podloge. Sipati 0,5ml rastvora kolhicina (12,5 μ g/ml) na 5ml podloge (finalna koncentracija 2,5 μ g/ml).

**Hipotonični rastvor:*

5,6% KCl + 3,8% Na-citrat u odnosu 1:1. Za jednu dozu od 120ml potrebno je napraviti dva rastvora: 60ml KCl u odnosu 1:10 (6ml 5,6% KCl i do 60ml destilovane vode) i 60ml Na-citrata u odnosu 1:6 (10ml 3,8% Na-citrata i do 60ml destilovane vode).

**Triton X-100:*

U 5ml 40%-tne sirćetne kiseline dodati 0,3ml TRITONa X-100.

**Sirćetna kiselina (60%):*

Za 5ml potrebno je 3ml CH₃COOH i 2ml destilovane vode

**Fiksativ:*

Za fiksativ je potrebna glacijalna sirćetna kiselina i metanol (CH₃COOH i CH₃OH). Fiksativ praviti u odnosu 1:3

100ml: 25ml CH₃COOH + 75ml CH₃OH

**Rastvor za bojenje po Giemsi za klasičnu hromozomsku analizu:*

1ml Giemsa boje rastvoriti u 9ml pufera pH7,6 koji se pravi na sledeći način:

2,7g Na₂HPO₄ + 0,18g KH₂PO₄ rastvoriti u 0,25 litra destilovane vode

**Rastvor za bojenje po Giemsi za analizu G-traka na hromozomima:*

1ml Giemsa boje rastvoriti u 9ml pufera pH6,8 koji se pravi na sledeći način:

2,78g Na_2HPO_4 + 0,48g acid. citricum rastvoriti u 0,5 litra destilovane vode

**GKN (10x koncentrovan):*

NaCl 8g / KCl 0,4g/ glukoza 1g rastvoriti u 100ml 0,25% tripsin

**GKN (1x koncentrovani):* 1ml 10x konc. GKN-a rastvoriti sa 9ml destilovane vode.

**Trypsin:*

Trypsin 0,25% rastvoriti sa 1x koncentrovanim rastvorom GKN-a u odnosu 1:1

3.2.4. Statistička analiza

U obradi i analizi dobijenih podataka, korišćene su sledeće statističke metode:

3.2.4.1. Metode univarijantne statističke analize

- Deskriptivna statistika za opis podataka. Deskriptivna statistika se sastoji od metoda prikupljanja, sređivanja, prikazivanja i opisivanja podataka pomoću tabela, grafikona i sumarnih pokazatelja.
- Eksploratorna analiza za međugrupnu analizu. Eksploratorna analiza podataka predstavlja pristup u analizi podataka koji su obično dati tabelarno i ima za cilj da sumira osnovne karakteristike i često ih prikazuje vizuelno. Služi za istraživanje podataka i daje mogućnost da se na osnovu tih podataka formuliše hipoteza.
- Kolmogorov-Smirnov test za testiranje postojanja normalne raspodele. Kolmogorov-Smirnov test je test utvrđivanja slaganja raspodele uzorka sa teorijskom raspodelom.
- Pirsonov Hi kvadrat test za utvrđivanje postojanja asocijacije između parametara. Pirsonov Hi kvadrat test ispituje hipotezu da li je distribucija vrednosti po redovima i kolonama nezavisna. Ako je statistička značajnost mala ($p < 0.05$), to ukazuje da je

moguće da postoji izvesna veza između varijabli. Ako je pak $p > 0.05$ onda se može reći da ne postoji veza između varijabli.

- Hi kvadrat Likelihood Ratio test za utvrđivanje postojanja veze između parametara. Pozitivan "likelihood ratio" (+LR) se definiše kao odnos između verovatnoće pojave poznatog rezultata testa koji izražava da je bolest prisutna i verovatnoće pojave istog rezultata ako je bolest odsutna.
- Cochran test za Odds Ratio i Relativni Rizik
- Kaplan Majerova (KM) analiza za utvrđivanje faktora preživljavanja. Da bi se uradila Kaplan Majerova procena funkcije preživljavanja neophodno je konstruisati niz vremenskih intervala. Svaki od ovih intervala je konstruisan tako da sadrži vreme smrti koje se desilo na samom početku perioda (intervala).
- Log Rank test za utvrđivanje međugrupne razlike preživljavanja. Kada se posmatraju podaci za više grupa pacijenata, od velike važnosti je da mogu da se uporede. Najpopularniji test-metod za ocenu da li su ili ne KM krive za dve ili više grupa statistički ekvivalentne je takozvani log-rank test. U cilju konstruisanja log-rank testa, polazi se od razmatranja vremena smrti za dve grupe podataka preživljavanja.
- Breslow i Tarone-Var test za utvrđivanje međugrupne razlike preživljavanja između stratuma.

3.2.4.2. Metode multivarijacione analize

- Logistička regresija za procenu značajnosti parametara. Regresione metode su sastavni deo svake analize podataka koja se bavi opisivanjem veze između zavisnih i nezavisnih promenljivih. Logistička regresija se koristi za:
 - predviđanje zavisne promenljive na osnovu vrednosti nezavisnih promenljivih
 - rangiranje nezavisnih promenljivih po važnosti
 - procenu efekta interakcije.

- Koksova regresija za procenu značajnosti parametara preživljavanja. Koksova regresija je metod za ispitivanje efekata nekoliko varijabli na određeni događaj koji će se desiti u nekom vremenu. Ako je događaj u kontekstu ishoda bolesti smrt, metod se naziva akoksova regresija za procenu preživljavanja.

U cilju obrade podataka korišćen je statistički paket SPSS. Analize su rađene sa verovatnoćom od 95% ($p \leq 0.05$). Obradeni podaci i dobijeni rezultati su prikazani grafički i tabelarno.

4. REZULTATI

U grupi od 72 bolesnika sa NB urađene su sledeće genetičke analize: *MYCN* status, određivanje prisustva/odsustva del 1p36.3 i kariotip. Dobijeni rezultati su upoređivani sa kliničkim podacima koji imaju prognostički značaj, a to su: uzrast bolesnika pri postavljanju dijagnoze, stadijum bolesti i grupa rizika. Statističkom obradom rezultata genetičkih analiza i kliničkih podataka pokazan je značaj pojedinačnih parametara kao i njihov međusobni uticaj na ishod bolesti.

Kod svih bolesnika (100%) je urađen *MYCN* status, kod 50/72 (69.4%) bolesnika je urađena analiza prisustva del1p36.3, a kod 59/72 (81.9%) je urađen kariotip. Prilikom postavljanja dijagnoze, uzeti su podaci o uzrastu, određen je klinički stadijum bolesti po klasifikaciji Evansa i saradnika, i bolesnici su svrstani u odgovarajuću grupu rizika po ESIOP NB sistemu klasifikacije.

Za svakog bolesnika registrovan je ishod bolesti (živ ili nije živ), kao i dužina preživljavanja do smrtnog ishoda ili do poslednje kontrole tzv. ukupno preživljavanje (tabela 8). Od ukupno 72 bolesnika, 30/72 (41.7%) je umrlo, a 42/72 (58.3%) je živo.

Tabela 8. Rezultati genetičkih analiza i relevantni klinički parametri u grupi od 72 bolesnika sa NB

Bole-snik	Uzrast pri Dg. u mes	Stad.	Del 1p36	<i>MYCN</i> status	KARIOTIP	Grupe rizika	ISHOD	Ukupno preži-vljavanje u mes
Nb1	32	III	da	NA	46,XX	visok	nije živ	9
Nb2	71	III	ne	NA	46,XY	visok	nije živ	18
Nb3	71	III	da	A		visok	nije živ	19
Nb4	42	IV	da	NA		visok	nije živ	67
Nb5	32	IV	ne	NA	46,XY/ 47-51hr	visok	nije živ	8
Nb6	58	IV		NA	46,XX/ 81-90hr	visok	nije živ	4
Nb7	0,5	I	ne	NA	46,XX	nizak	živ	173
Nb8	50	III		A		visok	nije živ	13

Nb9	49	IV	da	A	46,XY	visok	nije živ	10
Nb10	190	III	ne	NA	46,XY	srednji	živ	162
Nb11	20	I	da	NA	46,XY/ 92XXYY	visok	nije živ	14
Nb12	3	I	ne	NA	46,XY	nizak	živ	157
Nb13	24	II	ne	NA	46,XX	nizak	živ	156
Nb14	8	III	da	A	46,XY, hsr,dmin	visok	nije živ	16
Nb15	1	I	ne	NA	46,XY	nizak	živ	144
Nb16	1	IV-S	ne	NA	46,XY	srednji	nije živ	1
Nb17	11	III	da	VIŠAK		srednji	živ	132
Nb18	74	IV	da	NA	46,XY/ 44,XY,-6,-7,- 18,-22,+mar 1, +mar 2	visok	nije živ	11
Nb19	13	III	ne	NA		srednji	nije živ	51
Nb20	6	III	ne	NA	46,XY	srednji	živ	132
Nb21	12	II		NA	46,XX	nizak	živ	126
Nb22	20	IV	ne	NA	46,XY	visok	nije živ	12
Nb23	26	IV	da	A	46,XY	visok	nije živ	1
Nb24	105	IV	ne	NA	46,XX/ 70-80hr	visok	nije živ	36
Nb25	3	IV-S	da	A		visok	nije živ	9
Nb26	38	IV	da	A	46,XY/ 46,XY, del 1p36	visok	nije živ	36
Nb27	4	II	ne	NA	46,XX/ 70-80hr	nizak	živ	142
Nb28	7	IV-S	ne	NA	46,XY	nizak	živ	138
Nb29	57	III	ne	VIŠAK	46,XX	visok	nije živ	96
Nb30	38	IV		A	47,XY,del(1) (p34),+del(1) (p34),+2,hsr(8) (q13),-17 /92XXYY /46,XY	visok	nije živ	12
Nb31	40	IV	da	A	46,XX,dmin	visok	nije živ	24
Nb32	44	Ila		NA	46,XY	nizak	živ	97
Nb33	11	III	ne	NA	46,XY	srednji	živ	96
Nb34	2	IV-S	ne	A	46,XX	visok	živ	95

Nb35	6	III		NA		nizak	živ	94
Nb36	11	III	ne	NA	46,XY	nizak	živ	92
Nb37	18	III	ne	NA		srednji	živ	92
Nb38	13	III	da	NA	46,XX	srednji	živ	86
Nb39	1	II	ne	NA		nizak	živ	60
Nb40	42	IV	da	A	94-96hr	visok	živ	78
Nb41	11	IV-S	ne	NA		nizak	živ	77
Nb42	26	IV		A	115hr,23~25 dmin /63- 65hr,25~27 dmin	visok	živ	75
Nb43	96	IV	da	A	46,XX	visok	živ	74
Nb44	25	III	ne	NA	46,XX	visok	nije živ	29
Nb45	11	III	ne	NA	46,XX	srednji	živ	67
Nb46	6	IV-S	da	NA	46,XY	nizak	živ	66
Nb47	14	III	ne	NA	46,XY	srednji	živ	66
Nb48	17	IV	ne	A		visok	živ	53
Nb49	10	IV	ne	NA	46,XY	visok	nije živ	30
Nb50	38	III	ne	NA	46,XX	srednji	živ	48
Nb51	2,5	I	ne	NA	46,XX	srednji	živ	45
Nb52	16	III	ne	NA	46,XX	srednji	živ	43
Nb53	19	I	ne	NA	46,XY	nizak	živ	43
Nb54	19	IV		A	46,XY	visok	nije živ	12
Nb55	11	III	ne	NA	46,XX	srednji	živ	38
Nb56	207	IV		NA	88~92 hr	visok	nije živ	24
Nb57	8	IV-S		NA	46,XY	nizak	živ	30
Nb58	21	IV		A	81~91 hr.	visok	nije živ	15
Nb59	2	IV-S		NA	46,XX	nizak	nije živ	1
Nb60	35	IV		VIŠAK		visok	nije živ	18
Nb61	19	IV		A	46,XY	visok	živ	25
Nb62	17	IV		A	46,XY	visok	nije živ	8 dana
Nb63	22	IV	da	A	48 hr.	visok	nije živ	13
Nb64	2	IV-S	ne	NA	46,XY	nizak	živ	20
Nb65	72	III		NA	46,XX	visok	živ	18
Nb66	50	IV	da	A	46,XY	visok	živ	16
Nb67	36	III		NA	46,XY	srednji	živ	14
Nb68	6	IV-S		NA		nizak	živ	13
Nb69	19	III		NA	46,XX	srednji	živ	12
Nb70	4	IV-S		NA	46,XX	nizak	živ	12

Nb71	6	IV		VIŠAK	46,XX	visok	živ	9
Nb72	120	IV		NA	49,XY,+7,+9, +10, del(14)(q24) /46,XY	visok	živ	6

* mes.-meseci; dg.-dijagnoza; stad.-stadijum; NA-nema amplifikaciju; A-amplifikacija

4.1.1. UTICAJ POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB

4.1.2. Analiza uzrasta bolesnika pri postavljanju dijagnoze

Jedan od prvih podataka prilikom uzimanja anamneze je uzrast bolesnika. Kod bolesnika sa NB taj podatak ima i važan prognostički značaj [33]. Prosečan uzrast pri postavljanju dijagnoze je iznosio 30 meseci.

Bolesnici su bili podeljeni u dve starosne grupe:

- I. ispod 18 meseci i
- II. jednako ili više od 18 meseci

U tabeli 9. je prikazan broj NB bolesnika i ishod bolesti u ove dve starosne grupe, iz koje se jasno vidi da je u ispitivanom uzorku NB bolesnika preživljavanje u starosnoj grupi ispod 18 meseci bilo veće i iznosilo je 79.4%, dok je u grupi bolesnika uzrasta 18 ili više od 18 meseci preživljavanje iznosilo 39.5%.

Tabela 9. Broj bolesnika sa NB u dve starosne grupe: ispod 18 meseci i jednako ili više od 18 meseci i ishod bolesti u prikazanim grupama

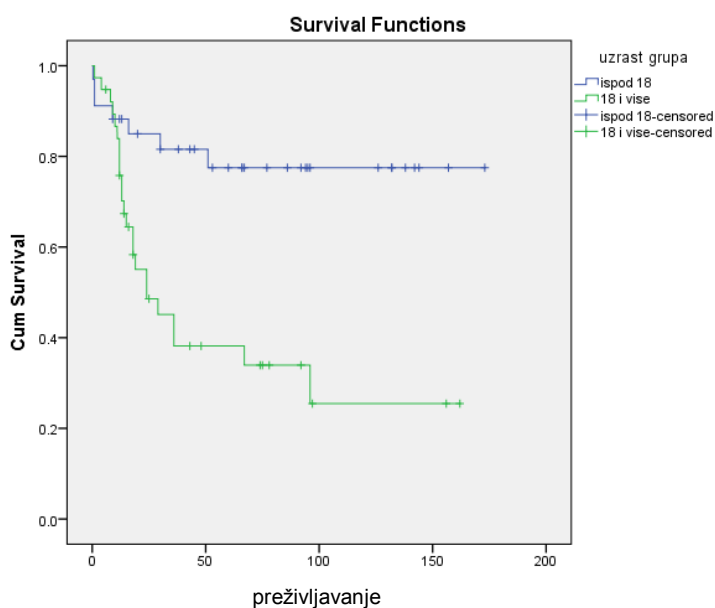
Uzrast bolesnika	Broj bolesnika	Broj umrlih	Broj živih
< 18m	34 (47.2%)	7 (20.6%)	27 (79.4%)
≥ 18m	38 (52.8%)	23 (60.5%)	15 (39.5%)
Ukupno	72 (100.0%)	30 (41.7%)	42 (58.3%)

Za izračunavanje razlike u preživljavanju između ove dve starosne grupe NB bolesnika korišćena je Kaplan-Meierova analiza čiji su rezultati prikazani u Tabeli 10.

Tabela 10. Preživljavanje izraženo u mesecima po starosnim grupama nakon Kaplan-Meier analize

Uzrast bolesnika	Srednja dužina preživljavanja u mesecima	Standardna greška
ispod 18m	138.013	11.737
18m i više	62.690	11.784
ukupno	100.372	9.871

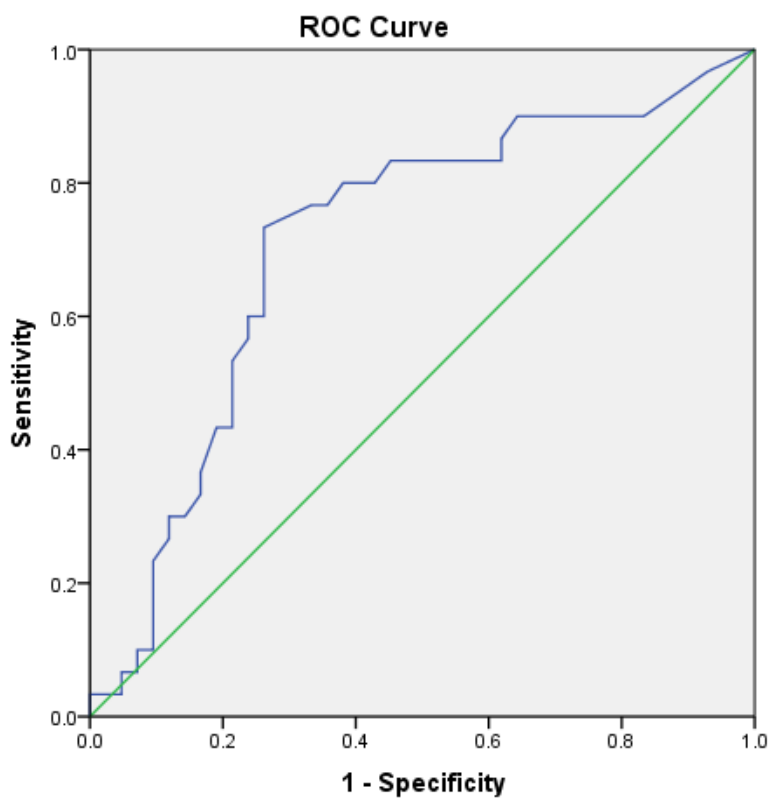
Razlika u preživljavanju između starosne grupe I i II je statistički značajna ($p=0.001$) (tabela 10, grafikon 1).



Grafikon 1. Preživljavanje bolesnika sa NB uzrasta ispod 18 meseci i uzrasta jednako ili više od 18 meseci

Analizom podataka o uzrastu bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze dobijen je grafički prikaz odnosa osetljivosti i specifičnosti pri različitim nivoima odlučivanja, tzv. ROC kriva (grafikon 2). U ovom slučaju ROC kriva pokazuje da je uzrast od 19 meseci mesto na kome se seku osetljivost i specifičnost, a to znači da je u ovom uzorku od 72 NB

bolesnika tačka preseka (engl. cut off) na kome se dele starosne grupe ne 18 već 19 meseci (tabela 11).



Grafikon 2. Odnos osetljivosti i specifičnosti

Tabela 11. Koordinate ROC krive iz koje je dobijena tačka preseka od 19 meseci

Koordinate krive		
uzrast u vreme postavljanja dijagnoze		
Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
.00	1.000	1.000
1.50	.967	.929
2.50	.933	.881
3.50	.900	.833
5.00	.900	.786
6.50	.900	.667
7.50	.900	.643
9.00	.867	.619

10.50	.833	.619
11.50	.833	.476
12.50	.833	.452
13.50	.800	.429
15.00	.800	.405
16.50	.800	.381
17.50	.767	.357
18.50	.767	.333
19.50	.733	.262
20.50	.667	.262
21.50	.633	.262
23.00	.600	.262
24.50	.600	.238
25.50	.567	.238
29.00	.533	.214
33.50	.467	.214
35.50	.433	.214
37.00	.433	.190
39.00	.367	.167
41.00	.333	.167
43.00	.300	.143
46.50	.300	.119
49.50	.267	.119
53.50	.233	.095
57.50	.200	.095
64.50	.167	.095
71.50	.100	.095
73.00	.100	.071
85.00	.067	.071
100.50	.067	.048
112.50	.033	.048
155.00	.033	.024
198.50	.033	.000
208.00	.000	.000

P/N Ratio = 19

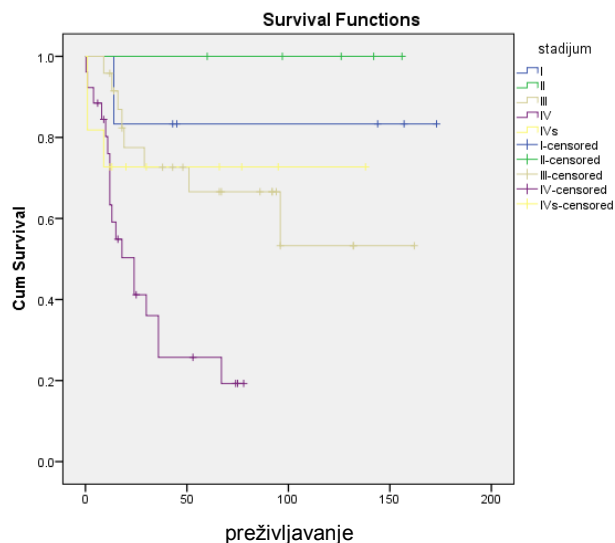
4.1.3. Analiza kliničkih stadijuma bolesti

Zastupljenost kliničkih stadijuma kod 72 bolesnika sa NB i njihov ishod po stadijumima prikazan je u tabeli 12. Najveći broj NB bolesnika je, u vreme postavljanja dijagnoze, bio u stadijumu III (33.3%) i IV (36.1%). Takođe je i broj umrlih najveći u ovim kliničkim stadijumima (stadijum III-33.3% i stadijum IV-69.2%), dok je broj umrlih u nižim stadijumima upadljivo manji (u stadijumu I-16.7%, a u stadijumu II nema umrlih-0.0%).

Tabela 12. Zastupljenost kliničkih stadijuma kod 72 bolesnika sa NB i njihov ishod

Stadijumi (Evans, 1971)		Broj bolesnika	Broj umrlih	Broj živih
stadijum	I	6 (8.3%)	1 (16.7%)	5 (83.3%)
	II	5 (6.9%)	0 (0.0%)	5 (100.0%)
	III	24 (33.3%)	8 (33.3%)	16 (66.7%)
	IV	26 (36.1%)	18 (69.2%)	8 (30.8%)
	IV-S	11 (15.3%)	3 (27.3%)	8 (72.7%)
	ukupno	72 (100.0%)	30 (41.7%)	42 (58.3%)

Primenom Kaplan-Meierove analize pokazano je da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju bolesnika sa NB u različitim stadijumima ($p=0.001$), što je i grafički prikazano na grafikonu 3.



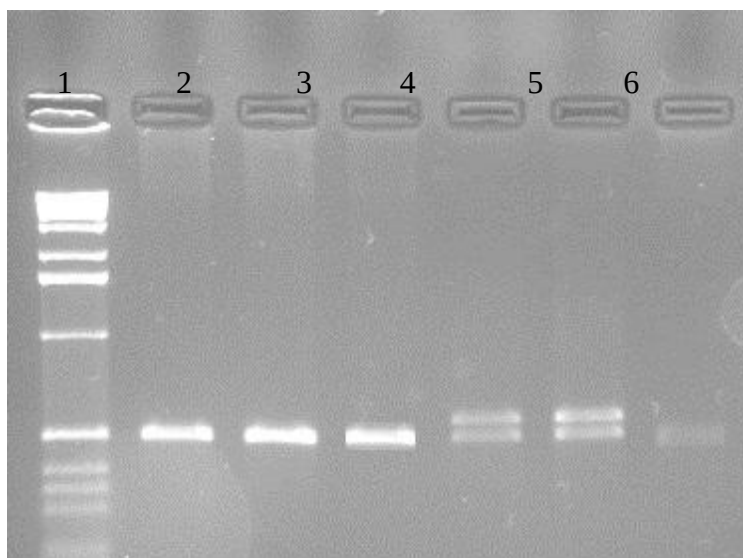
Grafikon 3. Preživljavanje NB bolesnika u zavisnosti od stadijuma bolesti

4.1.4. Analiza delecije 1p36.3

Analiza prisustva delecije 1p36.3 primenom fluorescentne hibridizacije ili PCR metodom urađena je kod 50 (69.4%) od ukupno 72 NB bolesnika. Odsustvo del1p36.3 je detektovano kod 32/50 (64%) bolesnika, a del1p36.3 je bila prisutna kod 18/50 (36%) bolesnika (tabela 13). Delecija 1p36.3 detektovana FISH metodom prikazana je na slici 9. Na slici 10. su prikazani rezultati PCR reakcije kojom je na molekularnom nivou pokazana delecija 1p36.3.



Slika 9. Delecija 1p36.3: dva zelena, referentna signala hromozoma (SE1qh), i jedan crveni, telomerni signal za 1p36.3 (SRD1p36)



Slika 10. Produkti PCR reakcije za marker D1S80 na 2% agaroznom gelu, 45 min, 85V: u kolonama 1, 2 i 3 su uzorci DNK bolesnika sa NB koji nije informativan za ispitivani marker (homozigot), a u kolonama 5, 6 i 7 su uzorci DNK bolesnika sa NB koji je informativan za D1S80 (heterozigot) i ima deleciju 1p36.3 u tumoru (kolona 1-DNK marker, kolone 2 i 3 DNK iz periferne krvi, kolona 4 DNK iz tumora, kolona 5 i 6 DNK iz periferne krvi, kolona 7 DNK iz tumora)

Tabela 13. Broj NB bolesnika sa i bez del1p36.3 u analiziranoj grupi od 50 bolesnika i njihov ishod

Analiza 1p36.3		Broj bolesnika	Broj umrlih	Broj živih
Detektovan status	bez delecije	32 (64%)	9 (28.1%)	23 (71.9%)
	sa delecijom	18 (36%)	12 (66.7%)	6 (33.3%)
	ukupno	50 (100%)	21 (42%)	29 (58%)

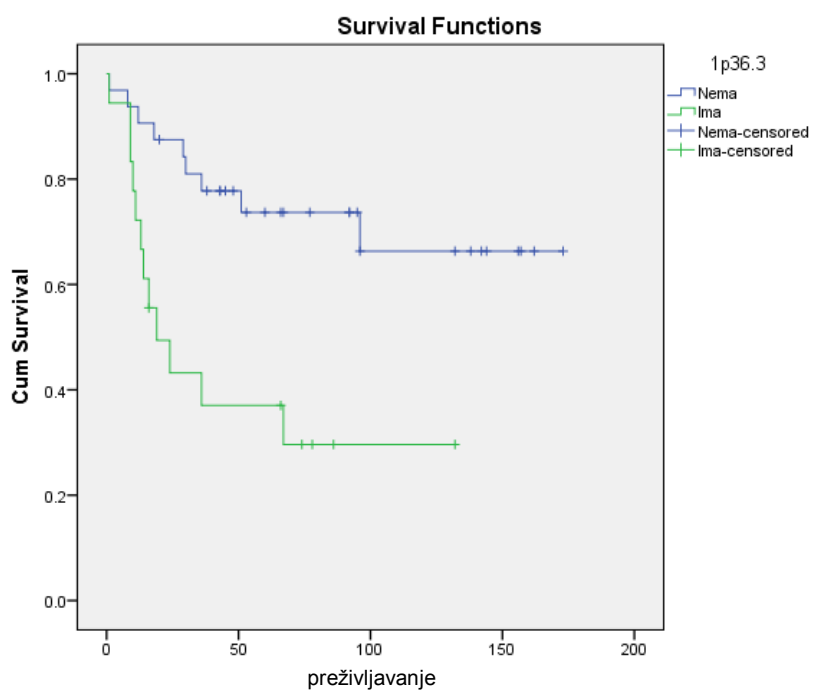
Preživljavanje bolesnika sa NB u grupi bolesnika bez del1p36.3 je bilo znatno veće u odnosu na grupu bolesnika sa delecijom i iznosilo je 71.9% u odnosu na 33.3% koliko je bilo u grupi sa delecijom 1p36.3.

Za izračunavanje srednje dužine preživljavanja kod NB bolesnika sa i bez del1p36.3 korišćena je Kaplan-Meierova analiza (tabela 14).

Tabela 14. Preživljavanje izraženo u mesecima kod 50/72 NB bolesnika sa del1p36.3 i bez del1p36.3 nakon Kaplan-Meierove analize

Analiza 1p36.3	Srednja dužina preživljavanja u mesecima	Standardna greška
bez delecije	128.185	12.575
sa delecijom	53.562	12.958
ukupno	105.330	11.163

Rezultati ove analize pokazuju da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između grupe NB bolesnika sa delecijom i bez del1p36.3 ($p=0.002$) što je prikazano na grafikonu 4.



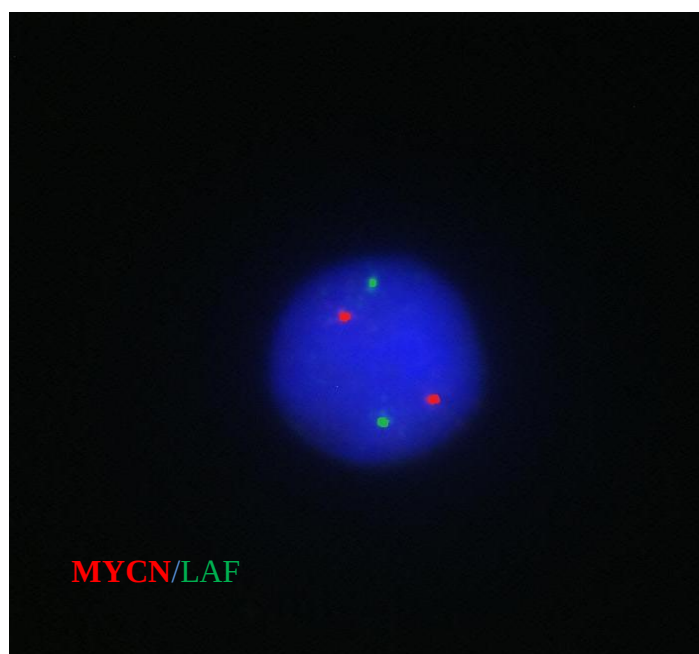
Grafikon 4. Preživljavanje NB bolesnika sa i bez del1p36.3

4.1.5. Analiza *MYCN* statusa

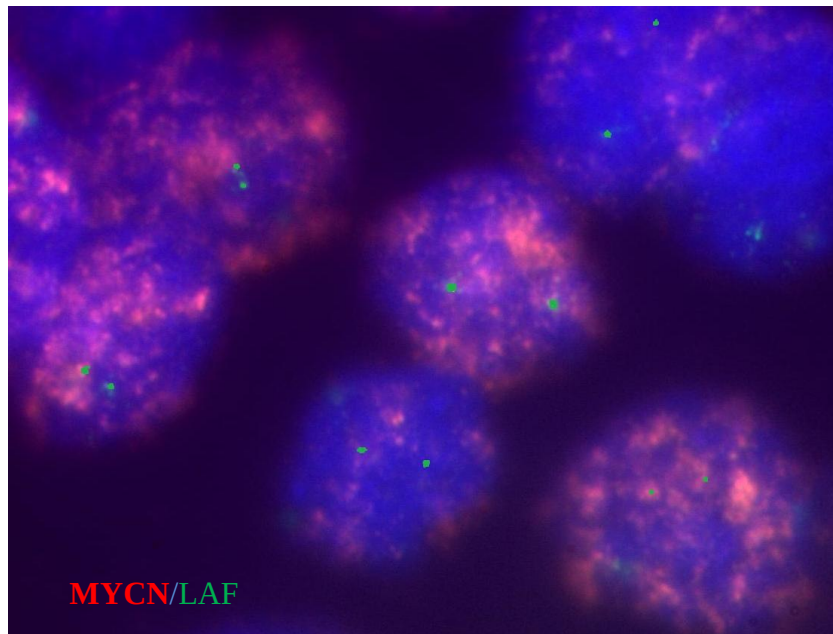
MYCN status je urađen kod svih sedamdesetdvoje bolesnika sa NB (100%). Ovi bolesnici su podeljeni u 3 grupe: bez *MYCN* amplifikacije (slika 11), sa *MYCN* amplifikacijom (slika 12) i sa *MYCN* viškom (slika 13). Broj NB bolesnika u sve tri grupe, kao i njihov ishod, prikazan je u tabeli 15. Najveće preživljavanje je u grupi bez *MYCN* amplifikacije (68.8%), a najmanje u grupi sa *MYCN* amplifikacijom (35.0%)

Tabela 15. *MYCN* status kod 72 bolesnika sa NB i njihov ishod

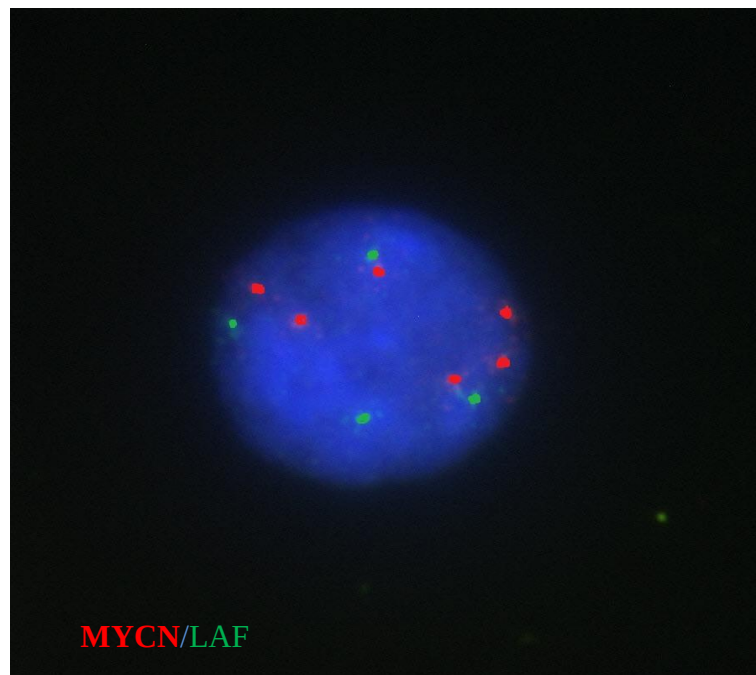
<i>MYCN</i> status	Broj bolesnika	Broj umrlih	Broj živih
bez amplifikacije	48 (66.7%)	15 (31.2%)	33 (68.8%)
sa amplifikacijom	20 (27.8%)	13 (65.0%)	7 (35.0%)
sa viškom	4 (5.6%)	2 (50.0%)	2 (50.0%)
ukupno	72 (100.0%)	30 (41.7)	42 (58.3%)



Slika 11. Normalan broj kopija *MYCN* onkogena u ćeliji: 2 zelena, referentna signala za hromozom 2 (LAF2q11) i 2 crvena signala *MYCN* onkogena



Slika 12. Amplifikacija *MYCN* onkogeni u ćeliji: 2 zelena referentna signala za hromozom 2 (LAF2q11) i preko 50 crvenih signala *MYCN* onkogeni



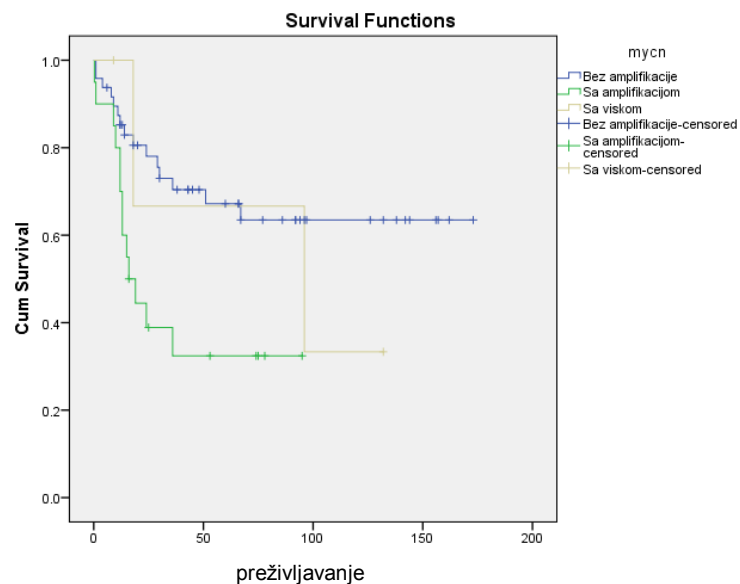
Slika 13. Višak *MYCN* onkogeni u ćeliji: 4 zelena, referentna signala za hromozom 2 (LAF2q11) i 6 crvenih signala *MYCN* onkogeni

Prosečna dužina života NB bolesnika iz ove tri grupe izračunata primenom Kaplan-Meierove analize prikazana je u tabeli br 16.

Tabela 16. Preživljavanje izraženo u mesecima kod 72 NB bolesnika u zavisnosti od *MYCN* statusa izračunato Kaplan-Meierovom analizom

<i>MYCN</i> status	Srednja dužina preživljavanja u mesecima	Standardna greška
bez amplifikacije	118.677	11.426
sa amplifikacijom	40.574	8.871
sa viškom	82.000	27.471
ukupno	100.372	9.871

Poređenjem ovih grupa je pokazano da je statistička razlika značajna samo između grupe bolesnika sa amplifikacijom i bez amplifikacije *MYCN* onkogen (p=0.016). Višak *MYCN* onkogen nije statistički značajan za preživljavanje u grupi od 72 analizirana NB bolesnika (grafikon 5, tabela 17).



Grafikon 5. Preživljavanje NB bolesnika u zavisnosti od *MYCN* status

Tabela 17. Preživljavanje tri grupe NB bolesnika: bez amplifikacije, sa amplifikacijom i sa viškom *MYCN* onkogeni

Statistički test	<i>MYCN</i> status	Bez amplifikacije		Sa amplifikacijom		Sa viškom	
		Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	bez amplif.			7.475	.006	.336	.562
	sa amplif.	7.475	.006			1.280	.258
	sa viškom	.336	.562	1.280	.258		
Breslow (Generalized Wilcoxon)	bez amplif.			7.243	.007	.002	.963
	sa amplif.	7.243	.007			1.524	.217
	sa viškom	.002	.963	1.524	.217		
Tarone-Ware	bez amplif.			7.543	.006	.070	.792
	sa amplif.	7.543	.006			1.428	.232
	sa viškom	.070	.792	1.428	.232		

*amplif.-amplifikacija

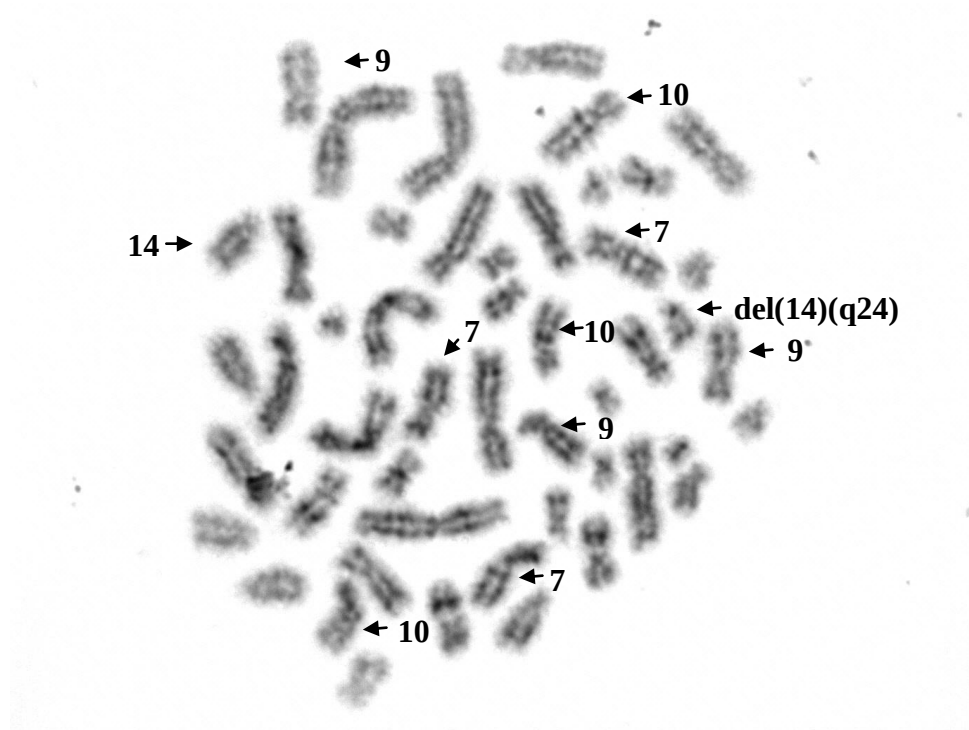
4.1.6. Analiza kariotipa

Analiza kariotipa je urađena kod 59/72 (81.9%) bolesnika sa NB. Ovi bolesnici su podeljeni u dve grupe: bolesnici sa normalnim kariotipom (43/59) i bolesnici sa aberantnim kariotipom (16/59). Broj NB bolesnika sa normalnim i aberantnim kariotipom i njihov ishod dati su u tabeli 18.

Tabela 18. Broj NB bolesnika sa aberantnim i normalnim kariotipom i njihov ishod

Kariotip		Broj bolesnika	Broj umrlih	Broj živih
Detektovan status	normalan	43 (72.9%)	12 (27.9%)	31 (72.1%)
	aberantan	16 (27.1%)	12 (75.0%)	4 (25.0%)
	ukupno	59 (100.0%)	24 (40.7%)	35 (59.3%)

Među aberantnim kariotipovima nađene su euploidije i to: „near“ diploidija, „near“ triploidija, „near“ tetraploidija, tetraploidija i pentaploidija. Od strukturnih aberacija detektovana je delecija kratkog kraka hromozoma 1 i delecija dugog kraka hromozoma 14. Takođe su nađeni dmin i hsovi, a detektovana su i tri kompleksna kariotipa (tabela 8). Na slici 14. prikazan je kompleksan kariotip: 49,XY,+7,+9,+10,del(14)(q24).



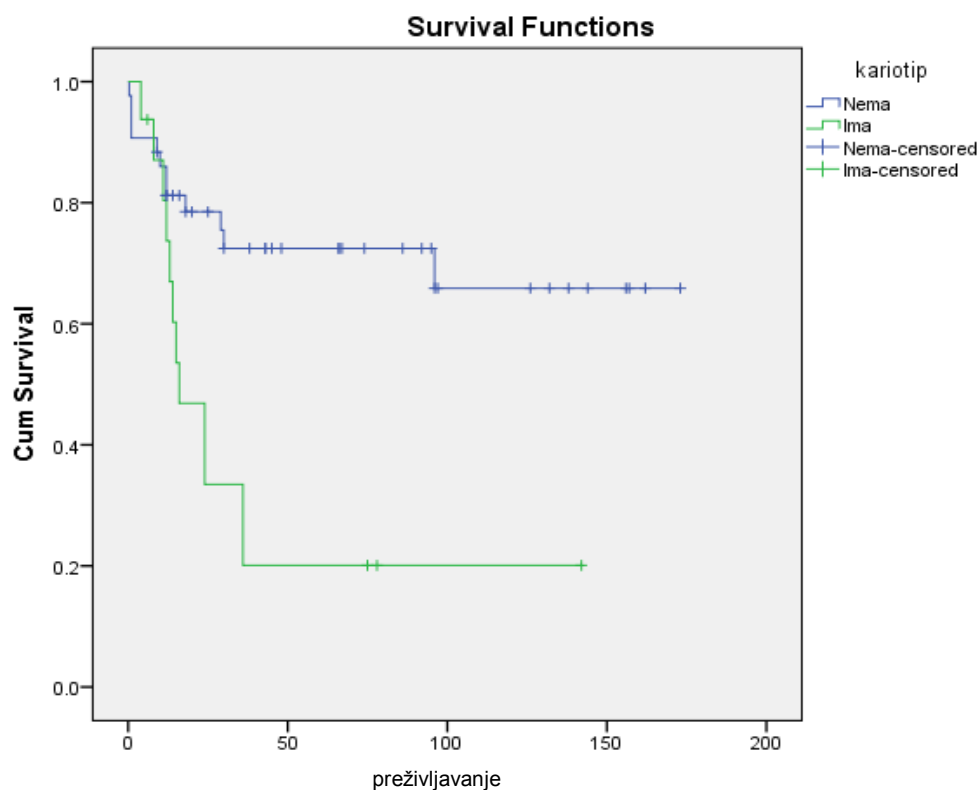
Slika 14. Kompleksan kariotip - aberantan muški kariotip:
49,XY,+7,+9,+10,del(14)(q24)

Preživljavanje u grupi NB bolesnika sa aberantnim kariotipom je bilo manje i iznosilo je 25.0%, dok je u grupi bolesnika bez aberacije u kariotipu iznosilo 72.1%.

Prosečna dužina života NB bolesnika sa normalnim i aberantnim kariotipom izračunata Kaplen-Meierovom analizom prikazana je u tabeli 19.

Tabela 19. Preživljavanje izraženo u mesecima kod 59/72 NB bolesnika u zavisnosti od prisustva normalnog ili aberantnog kariotipa.

Kariotip	Srednja dužina preživljavanja u mesecima	Standardna greška
normalan	123.653	11.990
aberrantan	42.772	13.055
ukupno	101.815	10.936



Grafikon 6. Preživljavanje NB bolesnika sa normalnim i aberantnim kariotipom.

Razlika u preživljavanju ove dve grupe NB bolesnika je statistički značajna ($p=0.001$) i prikazana je na grafikonu 6.

4.1.7. Analiza po grupama rizika

Svi bolesnici sa NB su svrstani u odgovarajuću grupu rizika na osnovu kliničkih i bioloških parametara prema preporuci Međunarodnog udruženja pedijatrijske onkologije Evrope za neuroblastom (ESIOP NB Risk Group classification) [32]. U grupi sa niskim rizikom bilo je 19/72 (26.4%) bolesnika, u grupi sa srednjim rizikom je bilo 16/72 bolesnika (22.2%) i u grupi sa visokim rizikom je bilo 37 bolesnika (51.4%). Broj NB bolesnika u sve tri grupe rizika, kao i njihov ishod prikazani su u tabeli 20. Kao što je i očekivano, najveće preživljavanje je bilo u grupi sa niskim rizikom (94.7%), a najmanje u grupi sa visokim rizikom (27.0%).

Tabela 20. Broj NB bolesnika po grupama rizika i njihov ishod

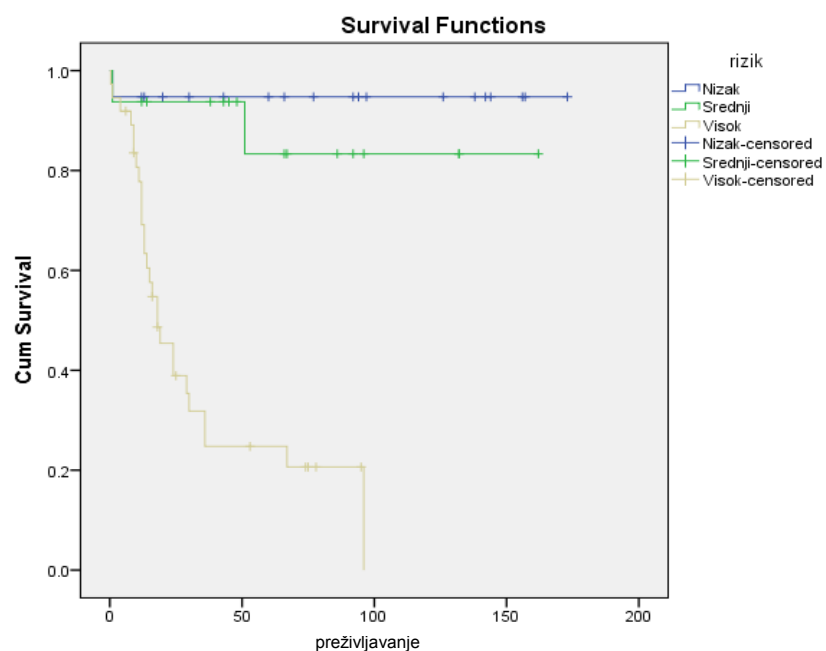
Grupe rizika		Broj bolesnika	Broj umrlih	Broj živih
rizik	nizak	19 (26.4%)	1 (5.3%)	18 (94.7%)
	srednji	16 (22.2%)	2 (12.5%)	14 (87.5%)
	visok	37 (51.4%)	27 (73.0%)	10 (27.0%)
	ukupno	72 (100.0%)	30 (41.7%)	42 (58.3%)

Prosečno vreme preživljavanja u različitim grupama rizika primenom Kaplan-Meirove analize prikazano je u Tabeli 21.

Tabela 21. Preživljavanje izraženo u mesecima kod 72 NB bolesnika u zavisnosti od grupe rizika

Grupa rizika	Srednja dužina preživljavanja u mesecima	Standardna greška
nizak	163.947	8.811
srednji	140.375	14.134
visok	35.037	6.087
ukupno	100.372	9.871

Statističkom obradom podataka je pokazano da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju bolesnika iz niske i visoke grupe rizika ($p=0.000$), kao i između srednje i visoke grupe rizika ($p=0.000$). Takođe je pokazano da nema razlike u preživljavanju između bolesnika iz niske i srednje grupe rizika, što je prikazano na grafikonu 7 i u tabeli 22.



Grafikon 7. Preživljavanje NB bolesnika u zavisnosti od grupe rizika

Tabela 22. Preživljavanje 72 NB bolesnika u zavisnosti grupe rizika

Statistički test	Rizik	Nizak		Srednji		Visok	
		Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	nizak			.633	.426	22.291	.000
	srednji	.633	.426			16.132	.000
	visok	22.291	.000	16.132	.000		
Breslow (Generalized Wilcoxon)	nizak			.362	.547	15.384	.000
	srednji	.362	.547			11.652	.001
	visok	15.384	.000	11.652	.001		
Tarone-Ware	nizak			.485	.486	18.565	.000
	srednji	.485	.486			13.813	.000
	visok	18.565	.000	13.813	.000		

4.2. POREĐENJE UTICAJA *MYCN* STATUSA I OSTALIH POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB

Za poređenje uticaja *MYCN* statusa i ostalih pojedinačnih parametara na preživljavanje NB bolesnika korišćen je Chi-Square test.

4.2.1. *MYCN* status i uzrast pri postavljanju dijagnoze

Prilikom poređenja *MYCN* statusa i uzrasta NB bolesnika utvrđeno je da ne postoji statistički značajna veza između ovih parametara ($p=0.056$) (tabela 23 i 24).

Tabela 23. Poređenje *MYCN* statusa sa starosnim grupama ispod 18 i 18 i više meseci

<i>MYCN</i> status			Starosne grupe		Ukupno
			ispod 18	18 i više	
<i>MYCN</i> status	bez amplifikacije	broj	27	21	48
		% <i>MYCN</i>	56.3%	43.8%	100.0%
	sa amplifikacijom	broj	5	15	20
		% <i>MYCN</i>	25.0%	75.0%	100.0%
	sa viškom	broj	2	2	4
		% <i>MYCN</i>	50.0%	50.0%	100.0%
	ukupno	broj	34	38	72
		% <i>MYCN</i>	47.2%	52.8%	100.0%

Tabela 24. Rezultat Chi-Square testa pri poređenju *MYCN* statusa sa uzrastom NB bolesnika ispod 18 i 18 i više meseci

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5.545 ^a	2	.063
Likelihood Ratio	5.762	2	.056
Linear-by-Linear Association	2.809	1	.094
N of Valid Cases	72		

Međutim, kada se uzrast pri postavljanju dijagnoze podeli na grupe ispod 19 meseci i 19 i više meseci, dobije se statistički značajna razlika u preživljavanju NB bolesnika ($p=0.038$) (tabela 25 i 26).

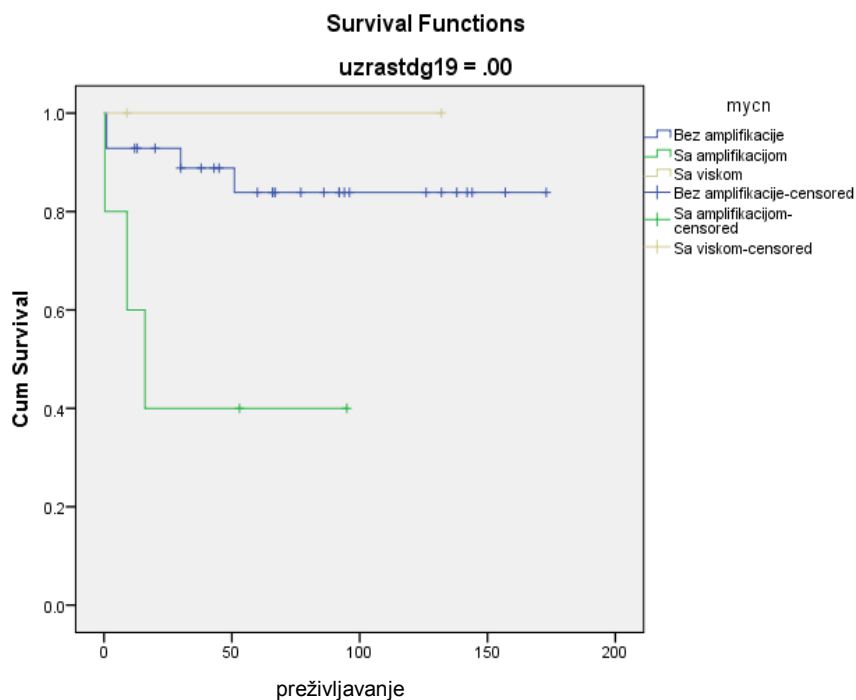
Tabela 25. Poređenje *MYCN* statusa sa starosnim grupama ispod 19 i 19 i više meseci

MYCN status			Starosne grupe		ukupno
			ispod 19	19 i više	
MYCN	bez amplifikacije	broj	28	20	48
		% MYCN	58.3%	41.7%	100.0%
	sa amplifikacijom	broj	5	15	20
		% MYCN	25.0%	75.0%	100.0%
	sa viškom	broj	2	2	4
		% MYCN	50.0%	50.0%	100.0%
ukupno		broj	35	37	72
		% MYCN	48.6%	51.4%	100.0%

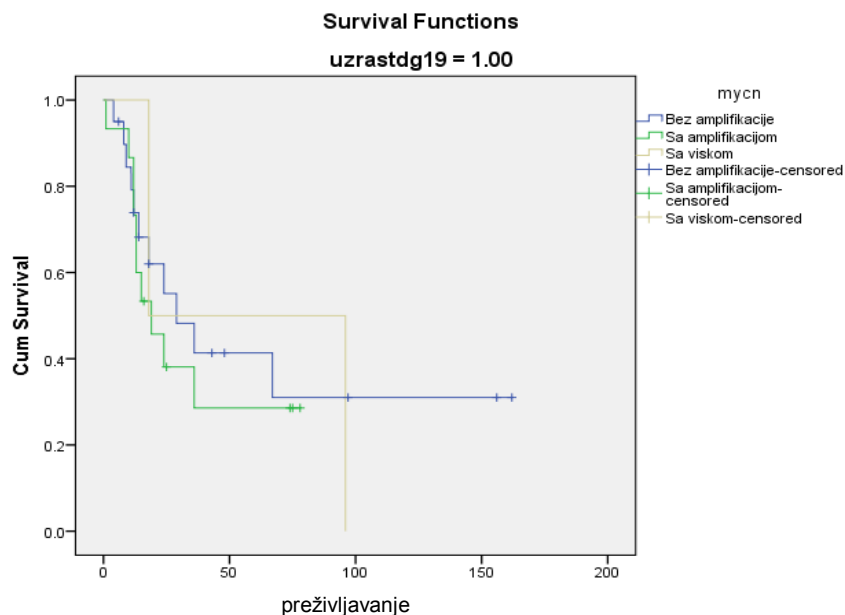
Tabela 26. Rezultat Chi-Square testa pri poređenju *MYCN* statusa sa uzrastom NB bolesnika ispod 19 i 19 i više meseci

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.283 ^a	2	.043
Likelihood Ratio	6.516	2	.038
Linear-by-Linear Association	3.342	1	.068
N of Valid Cases	72		

Unutar starosne grupe ispod 19 meseci postoji razlika u preživljavanju u zavisnosti od *MYCN* statusa. Bolesnici bez *MYCN* amplifikacije i sa *MYCN* viškom imaju bolje preživljavanje u odnosu na bolesnike sa *MYCN* amplifikacijom (grafikon 8). U starosnoj grupi 19 i više meseci ta razlika ne postoji (grafikon 9).



Grafikon 8. Preživljavanje u grupi ispod 19 meseci u zavisnosti od *MYCN* statusa



Grafikon 9. Preživljavanje u grupi 19 i više meseci u zavisnosti od *MYCN* statusa

4.2.2. *MYCN* status i stadijumi bolesti

Amplifikacija *MYCN* onkogen je češća kod tumora koji su svrstani u viši stadijum, i kao što je prikazano u tabeli 27, vidi se da čak 15/20 (75.0%) NB bolesnika sa *MYCN* amplifikacijom pripada IV stadijumu bolesti, dok je procenat bolesnika sa MNA u III i IV stadijumu iznosio 36%.

Tabela 27. Poređenje *MYCN* statusa sa stadijumima bolesti kod NB

MYCN status			Stadijum					Ukupno
			I	II	III	IV	IV-S	
MYCN	bez amplifikacije	broj	6	5	19	9	9	48
		% MYCN	12.5%	10.4%	39.6%	18.8%	18.8%	100.0%
	sa amplifikacijom	broj	0	0	3	15	2	20
		% MYCN	0.0%	0.0%	15.0%	75.0%	10.0%	100.0%
	sa viškom	broj	0	0	2	2	0	4
		% MYCN	0.0%	0.0%	50.0%	50.0%	0.0%	100.0%
ukupno		broj	6	5	24	26	11	72
		% MYCN	8.3%	6.9%	33.3%	36.1%	15.3%	100.0%

Rezultati Chi-Square testa su pokazali da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između grupe bolesnika bez amplifikacije i sa amplifikacijom *MYCN* onkogen (p=0.001, tabela 28).

Tabela 28. Rezultati Chi-Square testa pri poređenju *MYCN* statusa sa stadijumima NB

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	22.363 ^a	8	.004
Likelihood Ratio	25.703	8	.001
Linear-by-Linear Association	3.954	1	.047
N of Valid Cases	72		

4.2.3. *MYCN* status i delecija 1p36.3

Delecija 1p36.3 je česta aberacija koja se detektuje u samom tumoru kod bolesnika sa NB. Ova genetička promena je obično udružena sa *MYCN* amplifikacijom, što se vidi i iz tabele 29, gde je prikazano da 11/13 (84.6%) NB bolesnika sa *MYCN* amplifikacijom ima deleciju 1p36.3.

Tabela 29. Poređenje *MYCN* statusa i prisustva delecije 1p36.3 kod NB bolesnika

MYCN status			1p36.3		Ukupno
			Bez del1p	Sa del 1p	
MYCN	bez amplifikacije	broj	29	6	35
		% MYCN	82.9%	17.1%	100.0%
	sa amplifikacijom	broj	2	11	13
		% MYCN	15.4%	84.6%	100.0%
	sa viškom	broj	1	1	2
		% MYCN	50.0%	50.0%	100.0%
ukupno		broj	32	18	50
		% MYCN	64.0%	36.0%	100.0%

Postoji statistička značajnost u preživljavanju između grupa bez delecije i sa delecijom 1p36.3 i *MYCN* amplifikacijom (tabela 30). Veće preživljavanje je prisutno u grupi bez del1p36.3.

Tabela 30. Rezultati Chi-Square testa pri poređenju *MYCN* statusa i delecije 1p36.3

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	18.907 ^a	2	.000
Likelihood Ratio	19.337	2	.000
Linear-by-Linear Association	13.228	1	.000
N of Valid Cases	50		

4.2.4. *MYCN* status i kariotip

U grupi bolesnika bez amplifikacije *MYCN* onkogen, sa normalnim kariotipom u koštanoj srži bilo je 80,5% NB bolesnika (tabela 31).

Tabela 31. Poređenje *MYCN* statusa sa nalazom kariotipa iz koštane srži NB bolesnika

MYCN status			Kariotip		Ukupno
			Normalan	Aberantan	
MYCN	bez amplifikacije	broj	33	8	41
		% MYCN	80.5%	19.5%	100.0%
	sa amplifikacijom	broj	8	8	16
		% MYCN	50.0%	50.0%	100.0%
	sa viškom	broj	2	0	2
		% MYCN	100.0%	0.0%	100.0%
ukupno		broj	43	16	59
		% MYCN	72.9%	27.1%	100.0%

Između grupe bolesnika sa normalnim kariotipom u koštanoj srži i grupe sa aberantnim kariotipom, u odnosu na odsustvo amplifikacije *MYCN* onkogen, postoji statistički značajna razlika u preživljavanju ($p=0.043$) (tabela 32). Preživljavanje je veće u grupi sa normalnim kariotipom.

Tabela 32. Rezultati Chi-Square testa pri poređenju *MYCN* statusa sa nalazom kariotipa iz koštane srži NB bolesnika

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.183 ^a	2	.045
Likelihood Ratio	6.310	2	.043
Linear-by-Linear Association	1.917	1	.166
N of Valid Cases	59		

4.2.5. *MYCN* status i grupe rizika

Svi NB bolesnici koji su imali amplifikaciju *MYCN* onkogeni su u grupi visokog rizika (tabela 33).

Tabela 33. Poređenje *MYCN* statusa sa grupama rizika NB bolesnika

MYCN status			rizik			ukupno
			Nizak	Srednji	Visok	
MYCN	bez amplifikacije	broj	19	15	14	48
		% MYCN	39.6%	31.3%	29.2%	100.0%
	sa amplifikacijom	broj	0	0	20	20
		% MYCN	0.0%	0.0%	100.0%	100.0%
	sa viškom	broj	0	1	3	4
		% MYCN	0.0%	25.0%	75.0%	100.0%
ukupno		broj	19	16	37	72
		% MYCN	26.4%	22.2%	51.4%	100.0%

Statistička značajnost pri poređenju *MYCN* statusa i grupa rizika kod NB bolesnika je očigledna ($p=0.000$) (tabela 34).

Tabela 34. Rezultati Chi-Square testa pri poređenju *MYCN* statusa sa grupama rizika NB bolesnika

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	29.962 ^a	4	.000
Likelihood Ratio	38.910	4	.000
Linear-by-Linear Association	19.819	1	.000
N of Valid Cases	72		

4.2.6. *MYCN* status i ishod bolesti

Odnos živih i umrlih NB bolesnika bez *MYCN* i sa *MYCN* amplifikacijom je u obrnutoj srazmeri (tabela 35). U grupi NB bolesnika bez amplifikacije 68.8% bolesnika je živo, dok taj procenat u grupi sa MNA iznosi 35.0%. U grupi NB bolesnika sa viškom *MYCN* odnos živih i umrlih je 50:50%.

Tabela 35. Poređenje *MYCN* statusa sa ishodom bolesti kod NB bolesnika

MYCN status			Ishod		Ukupno
			Živ	Umro	
MYCN	bez amplifikacije	broj	33	15	48
		% MYCN	68.8%	31.3%	100.0%
	sa amplifikacijom	broj	7	13	20
		% MYCN	35.0%	65.0%	100.0%
	sa viškom	broj	2	2	4
		% MYCN	50.0%	50.0%	100.0%
ukupno		broj	42	30	72
		% MYCN	58.3%	41.7%	100.0%

Postoji statistički značajna razlika u ishodu bolesti kod grupe bolesnika bez amplifikacije i sa amplifikacijom *MYCN* onkogen (p=0.034) (tabela 36).

Tabela 36. Rezultati Chi-Square testa pri poređenju *MYCN* statusa sa ishodom bolesti kod NB bolesnika

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.737 ^a	2	.034
Likelihood Ratio	6.736	2	.034
Linear-by-Linear Association	4.596	1	.032
N of Valid Cases	72		

4.3. POREĐENJE UTICAJA DELECije 1p36.3 I OSTALIH POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB

Za poređenje uticaja delecije 1p36.3 i ostalih pojedinačnih parametara na preživljavanje NB bolesnika korišćen je Chi-Square test.

4.3.1. Delecija 1p36.3 i uzrast pri postavljanju dijagnoze

U grupi NB bolesnika sa delecijom 1p36.3 upadljivo je veći broj bolesnika uzrasta 18 ili više meseci (72.2%, odnosno 13/18), u odnosu na uzrast ispod 18 meseci (27.8%, odnosno 5/18), dok je u grupi bez delecije 1p36.3 odnos obrnut u korist bolesnika mlađih od 18 meseci (65.6%, odnosno 21/32) u odnosu na grupu od 18 i više meseci (34.4%, odnosno 11/32) (tabela 37). Osim razlike u procentima, postoji i statistički značajna razlika ($p=0.010$) pri poređenju delecije 1p36.3 i uzrasta NB bolesnika ispod 18 i 18 i više meseci (tabela 38).

Tabela 37. Poređenje prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa starosnim grupama: ispod 18 i 18 i više meseci

1p36.3 status			Starosna grupa		Ukupno
			ispod 18m	18m i više	
1p36.3	bez delecije	broj	21	11	32
		% 1p36.3	65.6%	34.4%	100.0%
	sa delecijom	broj	5	13	18
		% 1p36.3	27.8%	72.2%	100.0%
ukupno		broj	26	24	50
		% 1p36.3	52.0%	48.0%	100.0%

Tabela 38. Rezultat Chi-Square testa pri poređenju delecije 1p36.3 sa uzrastom NB bolesnika ispod 18 i 18 i više meseci

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6.611 ^a	1	.010		
Continuity Correction ^b	5.182	1	.023		
Likelihood Ratio	6.781	1	.009		
Fisher's Exact Test				.018	.011
Linear-by-Linear Association	6.479	1	.011		
N of Valid Cases	50				

Ukoliko se starosne grupe podele na uzrast ispod 19 meseci i na uzrast 19 i više meseci, brojčani odnos se menja samo u grupi NB bolesnika bez delecije tako što je 68.8% ovih NB bolesnika (22/32) u grupi ispod 19 meseci, a 31.3% bolesnika (10/32) u grupi od 19 i više meseci (tabela 39). Nakon Chi-Square testa na ovako podeljenom uzorku, statistička značajnost se povećava ($p=0.005$) (tabela 40).

Tabela 39. Poređenje prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa starosnim grupama: ispod 19 i 19 i više meseci

1p36.3 status			Starosna grupa		Ukupno
			ispod 19m	19m i više	
1p36.3	bez delecije	broj	22	10	32
		% 1p36.3	68.8%	31.3%	100.0%
	sa delecijom	broj	5	13	18
		% 1p36.3	27.8%	72.2%	100.0%
ukupno		broj	27	23	50
		% 1p36.3	54.0%	46.0%	100.0%

Tabela 40. Rezultat Chi-Square testa pri poređenju prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa uzrastom NB bolesnika ispod 19 i 19 i više meseci

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7.785 ^a	1	.005		
Continuity Correction ^b	6.223	1	.013		
Likelihood Ratio	7.975	1	.005		
Fisher's Exact Test				.008	.006
Linear-by-Linear Association	7.630	1	.006		
N of Valid Cases	50				

4.3.2. Delecija 1p36.3 i stadijumi bolesti

Kao i u slučaju *MYCN* amplifikacije, prisustvo delecije 1p36.3 je češće u višim stadijumima bolesti – u III (5/18, odnosno 27.8%) i IV stadijumu (10/18, odnosno 55.6%) (tabela 41).

Tabela 41. Poređenje prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa stadijumima bolesti kod NB

1p36.3 status			Stadijum					Ukupno
			I	II	III	IV	IV-S	
1p36.3	bez delecije	broj	5	3	14	5	5	32
		% 1p36.3	15.6%	9.4%	43.8%	15.6%	15.6%	100.0%
	sa delecijom	broj	1	0	5	10	2	18
		% 1p36.3	5.6%	0.0%	27.8%	55.6%	11.1%	100.0%
ukupno		broj	6	3	19	15	7	50
		% 1p36.3	12.0%	6.0%	38.0%	30.0%	14.0%	100.0%

Rezultati Chi-Square testa su pokazali da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između grupe NB bolesnika bez delecije 1p36.3 i sa delecijom 1p36.3 u odnosu na stadijume bolesti ($p=0.032$) (tabela 42).

Tabela 42. Rezultat Chi-Square testa pri poređenju prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa stadijumima bolesti

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	9.725 ^a	4	.045
Likelihood Ratio	10.563	4	.032
Linear-by-Linear Association	3.118	1	.077
N of Valid Cases	50		

4.3.3. Delecija 1p36.3 i *MYCN* status

U analiziranoj grupi NB bolesnika pokazano je da se odsustvo delecije 1p36.3 u velikoj meri poklapa sa odsustvom amplifikacije *MYCN* s obzirom na to da čak 29/32 bolesnika (90.6%) bez delecije 1p36.3 nema *MYCN* amplifikaciju (tabela 43).

Tabela 43. Poređenje prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa *MYCN* statusom

1p36.3 status			MYCN			Ukupno
			Bez amplifikacije	Sa amplifikacijom	Sa viškom	
1p36.3	bez delecije	broj	29	2	1	32
		% 1p36.3	90.6%	6.3%	3.1%	100.0%
	sa delecijom	broj	6	11	1	18
		% 1p36.3	33.3%	61.1%	5.6%	100.0%
ukupno		brojt	35	13	2	50
		% 1p36.3	70.0%	26.0%	4.0%	100.0%

Iako se se iz tabele 43 jasno vidi veza između ova dva parametra, nakon rezultata Chi-Square testa, statistička značajnost između prisutva delecije 1p36.3 i *MYCN* amplifikacije je očigledna i iznosi $p=0.000$ (tabela 44).

Tabela 44. Rezultat Chi-Square testa pri poređenju prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa *MYCN* statusom

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	18.907 ^a	2	.000
Likelihood Ratio	19.337	2	.000
Linear-by-Linear Association	13.228	1	.000
N of Valid Cases	50		

4.3.4. Delecija 1p36.3 i kariotip

Detekcija delecije 1p36.3 je urađena kod 50/72 NB bolesnika, a kariotip je analiziran kod 59/72 NB bolesnika. Kod 41/72 NB bolesnika je urađena i detekcija delecije 1p36.3 i analiza kariotipa. U ovoj grupi NB bolesnika bilo je 27/41 bez delecije 1p36.3, a 88.9% njih (24/27) je imalo normalan kariotip. Sa detektovanom delecijom 1p36.3 bilo je 14/41 NB bolesnika i kod njih je 50% (7/14) bolesnika imalo normalan kariotip (tabela 45).

Tabela 45. Poređenje prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa normalnim i aberantnim kariotipom

1p36.3 status			Kariotip		Ukupno
			Normalan	Aberantan	
1p36.3	bez delecije	broj	24	3	27
		% 1p36.3	88.9%	11.1%	100.0%
	sa delecijom	broj	7	7	14
		% 1p36.3	50.0%	50.0%	100.0%
ukupno		broj	31	10	41
		% 1p36.3	75.6%	24.4%	100.0%

Pokazano je da postoji statistički značajna veza između prisustva i odsustva delecije 1p36.3 i normalnog i aberantnog kariotipa ($p=0.007$) (tabela 46).

Tabela 46. Rezultat Chi-Square testa pri poređenju prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa normalnim i aberantnim kariotipom

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7.561 ^a	1	.006		
Continuity Correction ^b	5.599	1	.018		
Likelihood Ratio	7.309	1	.007		
Fisher's Exact Test				.017	.010
Linear-by-Linear Association	7.376	1	.007		
N of Valid Cases	41				

4.3.5. Delecija 1p36.3 i grupe rizika

Zastupljenost NB bolesnika bez delecije 1p36.3 u grupama sa rizikom označenim kao nizak, srednji i visok, je bila uglavnom ravnomerna i iznosila je: za nizak rizik 34.4% (11/32), za srednji rizik 37.5% (12/32) i za visok rizik 28.1% (9/32). U grupi NB bolesnika sa delecijom 1p36.3 najzastupljeniji su bili bolesnici iz grupe sa visokim rizikom, 83.3% (15/18), zatim sa srednjim rizikom 11.1% (2/18), a najmanje ih je bilo u grupi sa niskim rizikom, svega 5.6% (1/18) (tabela 47).

Tabela 47. Poređenje prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa grupama rizika

1p36.3 status			Rizik			Ukupno
			Nizak	Srednji	Visok	
1p36.3	bez delecije	broj	11	12	9	32
		% 1p36.3	34.4%	37.5%	28.1%	100.0%
	sa delecijom	broj	1	2	15	18
		% 1p36.3	5.6%	11.1%	83.3%	100.0%
ukupno		broj	12	14	24	50
		% 1p36.3	24.0%	28.0%	48.0%	100.0%

Pokazano je da postoji statistički značajna razlika između grupa NB bolesnika bez i sa delecijom 1p36.3 i grupa rizika ($p=0.001$) (tabela 48).

Tabela 48. Rezultat Chi-Square testa pri poređenju prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa grupama rizika

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	14.167 ^a	2	.001
Likelihood Ratio	15.219	2	.000
Linear-by-Linear Association	12.034	1	.001
N of Valid Cases	50		

4.3.6. Delecija 1p36.3 i ishod bolesti

U grupi NB bolesnika bez delecije 1p36.3, 71.9% (23/32) je živo, dok je 28.1% (9/32) umrlo. U grupi NB bolesnika sa delecijom 1p36.3, 33.3% (6/18) je živo, a 66.7% (12/18) je umrlo (tabela 49).

Tabela 49. Poređenje prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa ishodom bolesti

1p36.3 status			Ishod		Ukupno
			Živ	Umrlo	
1p36.3	bez delecije	broj	23	9	32
		% 1p36.3	71.9%	28.1%	100.0%
	sa delecijom	broj	6	12	18
		% 1p36.3	33.3%	66.7%	100.0%
ukupno		broj	29	21	50
		% 1p36.3	58.0%	42.0%	100.0%

Između grupe NB bolesnika sa delecijom i grupe bez delecije 1p36.3 postoji statistički značajna razlika u odnosu na ishod bolesti ($p=0.008$) (tabela 50).

Tabela 50. Rezultat Chi-Square testa pri poređenju prisustva i odsustva delecije 1p36.3 sa ishodom bolesti

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7.025 ^a	1	.008		
Continuity Correction ^b	5.532	1	.019		
Likelihood Ratio	7.090	1	.008		
Fisher's Exact Test				.016	.009
Linear-by-Linear Association	6.884	1	.009		
N of Valid Cases	50				

5. DISKUSIJA

Savremeni pristup lečenja bolesnika sa NB podrazumeva određivanje kliničkih i bioloških markera koji su od značaja za predviđanje pojave relapsa. Detektovanje faktora rizika i odabir protokola lečenja na osnovu tih podataka omogućavaju primenu efektivnije terapije uz smanjenu toksičnost. Među ovim faktorima rizika kod NB važno mesto imaju: uzrast bolesnika, stadijum bolesti i određene genetičke promene kao što su *MYCN* amplifikacija, del1p36.3, del11q i ploidija.

Preživljavanje bolesnika sa NB je značajno povećano poslednjih godina, i to sa 52% između 1975. i 1977. godine, na 74% između 1999. i 2005. godine kod petogodišnjeg praćenja bolesnika. Ovi podaci su dostupni na sajtu za praćenje, epidemiologiju i ishod bolesti [56].

5.1. UTICAJ POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB

5.1.1. Analiza uzrasta bolesnika pri postavljanju dijagnoze

U grupi od 72 analizirana NB bolesnika prosečan uzrast pri postavljanju dijagnoze je iznosio 30 meseci. Ova grupa bolesnika je bila podeljena na dve starosne grupe, pri čemu je granični uzrast iznosio 18 meseci. U grupi ispod 18 meseci je bilo 47.2% NB bolesnika i njihovo preživljavanje je bilo značajno i iznosilo je 79.4%, a srednja dužina preživljavanja izražena u mesecima je iznosila 138 meseci. U grupi bolesnika sa 18 ili više meseci je bilo 52.8% bolesnika i preživljavanje je bilo znatno manje i iznosilo je 39.5%, a srednja dužina preživljavanja je bila 62 meseca.

London i saradnici su 2005. godine objavili veliku studiju o uticaju uzrasta NB bolesnika na preživljavanje i tada su predložili da starosna granica između povoljnog i nepovoljnog uzrasta bude između 15 i 19 meseci [57]. Iz praktičnih razloga INRG klasifikacioni sistem iz 2009. godine je usvojio konsenzusom granični uzrast od 18 meseci (547 dana) [33]. Do 2009. godine starosna granica je iznosila 365 dana (12 meseci) na

osnovu zapažanja Breslowa i McCanna, pre više od 30 godina, da je stariji uzrast bolesnika imao i lošiji ishod [58].

U studiji Londona i saradnika iz 2005. godine retrospektivno je analiziran uticaj uzrasta na preživljavanje kod 3.666 bolesnika sa NB. Kada su za granični uzrast odredili 365 dana (12 meseci), dobili su da je 37% bolesnika bilo mlađe od godinu dana i imalo je preživljavanje od 83%, dok je 64% bilo staro 12 ili više meseci i njihovo preživljavanje je iznosilo 45%. Kada su kao „cut off“ odredili 460 dana, dobili su da je 43% bolesnika bilo mlađe od tog uzrasta, a 57% je bilo starije od 460 dana, a preživljavanje u ove 2 grupe je ostalo skoro isto, odnosno, za one ispod 460 dana je iznosilo 82%, a za grupu jednako ili više od 460 dana 42%. Pomeranjem starosne granice sa 365 na 460 dana dobijeno je da je 5% bolesnika prešlo iz grupe sa višim rizikom u grupu nižeg rizika.

Terapija bolesnika sa NB jako varira, od hirurškog odstranjivanja tumora bez dalje terapije do agresivne terapije sa potencijalno smrtonosnim programom koji uključuje hirurgiju, intenzivnu hemoterapiju, terapiju zračenjem (uključujući zračenje celog tela po nekim protokolima) i transplantaciju koštane srži. Ova terapija ima svoje kratkotrajne i dugotrajne neželjene posledice. Niži uzrast, ispod 18 meseci, je veoma povoljan prognostički faktor i značajan je jer umanjuje rizik bolesnika i opredeljuje ga za manje agresivnu terapiju, što je od velike važnosti kod tako male dece koja su posebno osetljiva na štetne efekte terapije [57, 59, 60].

Analizom ROC krive kod naše grupe bolesnika pokazano je da je uzrast od 19 meseci mesto na kome se seku osetljivost i specifičnost, a to znači da u ovom uzorku od 72 NB bolesnika tačka preseka (tzv. „cut off“) na kojoj se dele starosne grupe iznosi 19, a ne 18 meseci.

5.1.2. Analiza kliničkih stadijuma bolesti

Svih 72 NB bolesnika je klasifikovano u odgovarajući stadijum bolesti (I, II, III, IV i IV-S) po klasifikaciji Evansa i saradnika iz 1971. godine, s obzirom na to da je ta klasifikacija još uvek u najširoj primeni među kliničarima u Srbiji [27].

U prognostički povoljnim stadijumima, I i II, ukupno je bilo svega 15.3% bolesnika i to, od 72 NB bolesnika, u stadijumu I - 8.3% i u stadijumu II - 6.9%. Preživljavanje u stadijumu I je iznosilo 83.3%, a u stadijumu II - 100.0%. Skoro 2/3 NB bolesnika je svrstano u više, nepovoljne stadijume bolesti (III i IV), ukupno njih 50 (69.4%). Od 72 analizirana NB bolesnika, u III stadijumu je bilo 33.3% bolesnika i njihovo preživljavanje je iznosilo 66.7%. U IV stadijumu je bilo 36.1% i preživljavanje u ovoj grupi bolesnika je iznosilo 30.8%. U specijalnom, IV-S stadijumu je bilo 15.3% bolesnika i njihovo preživljavanje je iznosilo 72.7%. Bernstein i saradnici su 1992. godine objavili studiju na 295 NB bolesnika u Severnoj Americi u kojoj su prvi put izračunali incidencu, preživljavanje i mortalitet, a u studiji je korišćena Evansova klasifikacija u stadijume [61]. Desetogodišnje preživljavanje u njihovoj grupi bolesnika sa Evansovim stadijumima I-IV i IV-S je iznosilo 88%, 90%, 63%, 21%, i 81%. Naši podaci (I-IV i IV-S: 83.3%, 100.0%, 66.7%, 30.8% i 72.7%) su u sličnom opsegu, s tim da je u grupi bolesnika u IV stadijumu u našoj grupi NB bolesnika veće preživljavanje (30.8% u odnosu na 21%), ali je zato preživljavanje u IV-S stadijumu za toliko niže u odnosu na populaciju Severne Amerike (72.7% u odnosu na 81%).

Poređenje dobijenih podataka sa savremenim literaturnim podacima je otežano zbog korišćenja različitih sistema za klasifikaciju u stadijume. Tako se INSS klasifikacija, koju su dali Brodeur i saradnici, od Evansove klasifikacije razlikuje u tome što je stadijum 2 podeljen na podstadijume 2A i 2B, iako se i Evansova i Brodeurova klasifikacija zasnivaju na podacima nakon hirurške intervencije [29]. Međutim, treba naglasiti da INSS klasifikacija nije sasvim odgovarajuća za procenu rizika i svrstavanje u odgovarajući stadijum bolesti pre početka tretmana i to iz sledećeg razloga: s obzirom da je hirurško odstranjivanje primarnog tumora preduslov za klasifikovanje bolesnika u stadijum 1 ili 2 po INSS, moguće je u nekim situacijama proceniti niži stadijum tumora nakon hirurškog tretmana nego što on to realno jeste. Upravo iz ovih razloga je i predložen novi sistem za klasifikaciju NB, tzv. INRGSS, koji je tako dizajniran da omogućava svrstavanje bolesnika u stadijum pre hirurškog tretmana. Po INRGSS klasifikaciji lokoregionalni oblik bolesti se svrstava u dva, a ne u tri stadijuma, kao što je inače i bilo u inicijalnoj, Evansovoj podeli. Većina kooperativnih grupa za dijagnostiku i lečenje NB koriste uporedo i INSS i INRGSS

sistem klasifikacije. Monclair i saradnici su uporedili preživljavanje NB bolesnika klasifikovanih po INSS i po INRGSS sistemu i dobili su sledeće podatke: ukupno preživljavanje bolesnika u stadijumu 1, 2 i 3 (po INSS) je iznosilo respektivno $98\pm 2\%$, $95\pm 3\%$, i $84\pm 4\%$. Ukupno preživljavanje bolesnika u L1 stadijumu (po INRGSS) je iznosilo $96\pm 2\%$, a u L2 stadijumu $89\pm 3\%$ [30].

5.1.3. Analiza delecije 1p36.3

Kod 50/72 analizirana bolesnika sa NB, urađena je analiza statusa 1p36. Bez delecije 1p36 je bilo 64% bolesnika i njihovo preživljavanje je iznosilo 71.9%. Delecija 1p36 je detektovana kod 36% bolesnika i njihovo preživljavanje je bilo manje – 33.3%. Sve reprezentativne studije na većem broju NB bolesnika pokazale su da se delecija 1p detektuje kod oko 35% bolesnika [62-65].

Razlika u preživljavanju ove dve grupe bolesnika je statistički značajna ($p=0.002$). Međutim, različite studije preživljavanja NB bolesnika sa i bez delecije 1p36 su pokazale i različite zaključke [62, 66, 67, 68]. Gehring i saradnici naglašavaju da delecija 1p nije u asocijaciji sa smanjenim preživljavanjem, dok su Schleiermacher i saradnici i Caron i saradnici u svojim studijama istakli da je 1pLOH veoma indikativan prognostički parametar lošeg ishoda [69-71]. Westermann i saradnici objašnjavaju ove razlike u rezultatima malim brojem i heterogenom populacijom bolesnika u ovim studijama. Takođe, isti autori ukazuju da postoji razlika u poređenju prisutva delecije 1p36 i vrste ishoda. Naime, jedna grupa autora je računala vreme do pojave relapsa, a druga grupa autora je računala vreme do smrtnog ishoda [36]. Maris i saradnici su 2000. godine objavili rezultate studije na 238 bolesnika sa NB. I u njihovoj grupi bolesnika, kao i u našem uzorku NB bolesnika, je delecija 1p36 detektovana u 35% slučajeva. Ova grupa autora je pokazala da delecija 1p36 ima uticaja na smanjeno vreme do pojave relapsa, ali da nema uticaja na ukupno preživljavanje [72].

5.1.4. Analiza *MYCN* statusa

MYCN status, primenom FISH metode, određen je prema utvrđenim kriterijumima kod svih analiziranih NB bolesnika u ovoj studiji, kojih je bilo ukupno 72. Bez *MYCN* amplifikacije je bilo 66.7% bolesnika, sa *MYCN* amplifikacijom 27.8%, a sa viškom *MYCN* onkogeno bilo je 5.6% NB bolesnika. U većini studija se amplifikovani *MYCN* detektuje u 18 do 25% bolesnika, a procenat viška *MYCN* onkogeno se u literaturi kreće između 6 i 14% [2, 73-78]. Pokazano je da je *MYCN* amplifikacija udružena sa brзом progresijom tumora i lošom prognozom za NB bolesnike nezavisno od uzrasta i stadijuma bolesti [16, 79-82]. Danas se, širom sveta, savremeni pristup lečenja starije dece sa lokoregionalnim i odojčadi sa regionalnom, ali invazivnom ili diseminovanom bolešću zasniva na proceni *MYCN* statusa [83]. Bolesnici sa tumorom bez *MYCN* amplifikacije u okviru ovih grupa bolesnika se tretiraju hirurški bez, ili sa umerenom hemoterapijom. Mnogo intenzivnija multi-modalna terapija, koja uključuje hirurgiju, agresivnu hemoterapiju, radioterapiju i transplantaciju ćelija koštane srži, se koristi u tretmanu bolesnika sa *MYCN* amplifikacijom u cilju poboljšanja ishoda. Kako su ova dva pristupa lečenju veoma različita, jasno je od kolike je važnosti precizno i pouzdano određivanje statusa *MYCN* onkogeno.

Preživljavanje u našem uzorku NB bolesnika, u grupi bez amplifikacije je iznosilo 68.8%, u grupi sa amplifikacijom 35%, a u grupi sa viškom *MYCN* onkogeno 50.0%. Spitz i saradnici su 2004. godine objavili rezultate prvog sistematskog istraživanja na većem uzorku NB bolesnika (659) poredeći kliničke karakteristike tumora bez amplifikacije, sa viškom i sa amplifikacijom *MYCN* onkogeno i izneli su njihov značaj za preživljavanje NB bolesnika [76]. U njihovom uzorku NB bolesnika, amplifikacija je detektovana u 18% tumora, a 6% je imalo *MYCN* višak. Ukupno preživljavanje bolesnika bez amplifikacije je iznosilo 90%, bolesnika sa viškom onkogeno 76%, a bolesnika sa amplifikacijom 44%. Period praćenja bolesnika je bio kratak, svega 3 godine. Pokazalo se da je razlika u preživljavanju bolesnika bez i sa amplifikacijom statistički značajna, dok razlika u preživljavanju bolesnika bez amplifikacije i sa viškom *MYCN* onkogeno nije statistički značajna. Iako je u ovoj studiji primećeno da bolesnici sa *MYCN* viškom imaju kraće vreme do pojave relapsa, nije potvrđen prognostički značaj viška *MYCN* onkogeno. Jeison i

saradnici su 2010. godine u svojoj studiji izneli rezultate na manjem broju NB bolesnika u odnosu na Spitzu i saradnike i u njihovom uzorku (177) je procenat bolesnika bez amplifikacije iznosio 68%, sa *MYCN* viškom 14% i sa amplifikacijom 18%, a preživljavanje se kretalo u rasponu od $85\% \pm 4\%$, $34\% \pm 10\%$ i $51\% \pm 14\%$, respektivno. Njihovi rezultati preživljavanja bolesnika u ove tri grupe takođe ukazuju na to da je višak *MYCN* onkogen u korelaciji sa bržom pojavom relapsa, ali ni ova grupa istraživača nije potvrdila postojanje korelacije sa lošijim ukupnim preživljavanjem ovih bolesnika [78]. Souzaki i saradnici 2011. godine u svome radu iznose zaključke po kojima se prognoza NB bolesnika sa *MYCN* viškom ne razlikuje značajno od onih bez *MYCN* amplifikacije i sugerišu da na prognozu bolesnika sa viškom *MYCN* onkogen verovatno utiče više faktora, koji su udruženi sa ostalim genetičkim aberacijama [84].

5.1.5. Analiza kariotipa

Citogenetička analiza omogućava da se razlikuju nivoi ploidije kod NB kao što su „near“ diploidija, „near“ triploidija, „near“ tetraploidija i „near“ pentaploidija. Analizom kariotipa iz ćelija koštane srži 59 od ukupno 72 NB bolesnika, kod 27% je nađen aberantan kariotip. Najčešći tip aberacija su bile euploidije i to upravo „near“ diploidija, „near“ triploidija, „near“ tetraploidija, tetraploidija i pentaploidija. Od strukturnih aberacija detektovana je delecija kratkog kraka hromozoma 1 i delecija dugog kraka hromozoma 14. Takođe su nađeni dmin i hrovi, a detektovana su i tri kompleksna kariotipa sa kombinacijom aneuploidije i strukturnih aberacija.

Preživljavanje NB bolesnika sa aberantnim kariotipom je veoma nisko u našem uzorku i iznosilo je svega 25%. Neophodno je uzeti u obzir činjenicu da je citogenetička analiza rađena iz uzorka koštane srži NB bolesnika i da postojanje aberantnog kariotipa dokazuje da su oni bili u nepovoljnom, IV stadijumu bolesti. Takođe, svi NB bolesnici sa aberantnim kariotipom su bili stariji od godinu dana što je, takođe, nepovoljan prognostički parametar.

Westermann i saradnici su 2002. godine izneli podatke da je kod odojčadi hiperdiploidija, a posebno „near“ triploidija najčešće u asocijaciji sa nižim stadijumima bolesti i dugotrajnim preživljavanjem, dok je diploidija usko vezana sa uznapredovalim

stadijumom bolesti i lošim odgovorom na terapiju [36]. „Near“ diploidni i „near“ tetraploidni tumori su obično detektovani kod bolesnika starijih od 1 godine, u višim stadijumima bolesti i imali su loš prognostički značaj. Bolesnici sa „near“ pentaploidijom su, slično onima sa „near“ triploidijom, imali duže preživljavanje. Janoueix-Lerosey i saradnici su 2009. godine objavili rad o tzv. segmentalnim aberacijama kod NB u kome su pokazali da bolesnici kod kojih su detektovane i numeričke i strukturne aberacije imaju lošiju prognozu, što su dokazali i Scliermacher i saradnici 2010. godine [85, 86].

5.1.6. Analiza po grupama rizika

Lečenje bolesnika sa NB se sprovodi u zavisnosti od grupe rizika kojoj bolesnik pripada, a grupa može biti niskog, srednjeg ili visokog rizika. U našem uzorku od 72 NB bolesnika, 26.4% bolesnika je bilo u grupi niskog, 22.2% u grupi srednjeg i 51.4% u grupi visokog rizika. U literaturi se ne sreće često egzaktna procena NB bolesnika u određenim grupama rizika, ali Oberthuer i saradnici 2006. u svom radu daju približne procenat i oni iznose: za nizak rizik približno 50%, za srednji rizik približno 10% i za visok rizik približno 40% bolesnika [87]. Skoro dva puta veća razlika u procentu NB bolesnika u niskom stadijumu rizika u njihovom uzorku može se delimično objasniti postojanjem skrininga na NB u nekim zemljama (Nemačka, Japan). NB bolesnici koji se detektuju skriningom su skoro uvek u I stadijumu bolesti i povoljnog uzrasta, što ih automatski svrstava u grupu sa niskim rizikom. S obzirom na to da se u Srbiji ne radi skrining na NB, mi nismo u mogućnosti da na vreme detektujemo deo populacije koji će nama biti prezentovan tek sa pojavom simptoma bolesti, a to su obično i viši stadijumi bolesti.

U našem radu preživljavanje bolesnika u grupi sa niskim rizikom iznosilo je 94.7%, u grupi sa srednjim rizikom 87.5% i u grupi sa visokim rizikom svega 27%. Weinstein i saradnici 2003. godine daju podatke o preživljavanju bolesnika u stadijumu I od > 95%, a za stadijum II, uz povoljne biološke karakteristike koje ih svrstavaju u nizak rizik, preživljavanje se kreće između 96-98% [88]. Kod bolesnika sa visokim rizikom, više od 50% njih će imati relaps, a od vremena postavljanja dijagnoze do pojave relapsa zavisi i ukupno preživljavanje. Dugogodišnje preživljavanje NB bolesnika u visokom riziku je

ispod 40% [89, 90]. Grupu NB bolesnika u srednjem riziku je najteže uporediti sa sličnim publikovanim rezultatima u savremenoj literaturi, pre svega zbog činjenice što su za ove bolesnike korišćene različite klasifikacije i različiti protokoli lečenja, tako da o njima ne postoji uniformni zaključak. Uglavnom su bolesnici iz ove grupe rizika podeljeni na podgrupe na osnovu kombinacije različitih prognostičkih faktora i terapije koju su primili. Preživljavanje se, kod ove grupe bolesnika, najčešće poredi u odnosu na primenjeni terapijski protokol.

5.2. POREĐENJE UTICAJA *MYCN* STATUSA I OSTALIH POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB

5.2.1. *MYCN* status i uzrast pri postavljanju dijagnoze

U odnosu na uzrast pri postavljanju dijagnoze, procenat NB bolesnika različitog *MYCN* statusa je, u našem radu, bio sledeći: bez *MYCN* amplifikacije u grupi ispod 18 meseci je bilo 56.3% bolesnika, a sa 18 ili više meseci 43.8%. Sa *MYCN* amplifikacijom je u grupi ispod 18 meseci bilo 25%, a u grupi 18 i više meseci 75% bolesnika. Sa viškom *MYCN* onkogenom je u obe grupe bilo po 50% bolesnika. Statistička analiza je pokazala da razlika u preživljavanju unutar ove tri grupe nije statistički značajna, međutim, kada se granica povoljnog uzrasta pomeri na 19 meseci, situacija se menja. Pomeranjem uzrastne granice sa 18 na 19 meseci se menja procenat bolesnika jedino unutar grupe bolesnika bez amplifikacije i to tako što procenat bolesnika bez *MYCN* amplifikacije koji su mlađi od 19 meseci raste sa 56.3% na 58.3%. U ovom slučaju razlika u preživljavanju postaje statistički značajna. Preživljavanje NB bolesnika mlađih od 19 meseci bez *MYCN* amplifikacije i onih sa viškom *MYCN* je značajno veće u odnosu na bolesnike sa amplifikacijom (grafikon 8). U uzrastu iznad 19 meseci ova razlika se gubi. Spitz i saradnici su 2004. godine prikazali rezultate opsežne studije o karakteristikama NB bez *MYCN* amplifikacije, sa *MYCN* viškom i sa *MYCN* amplifikacijom [76]. Oni su pokazali da je preživljavanje bolesnika mlađeg uzrasta sa *MYCN* amplifikacijom neuporedivo bolje u poređenju sa bolesnicima starijeg uzrasta (njihova uzrastna granica je bila 12 meseci) [76]. Postoje literaturni podaci o visokom mortalitetu kod odojčadi sa amplifikovanim *MYCN* onkogenom [91]. Spitz i

saradnici ovu razliku objašnjavaju svrstavanjem pomenute grupe bolesnika, po nemačkom protokolu, u stadijum sa visokim rizikom i primenom agresivnije terapije. Ovakav pristup ima za posledicu poboljšano preživljavanje, što je bio slučaj i kod grupe NB bolesnika analizirane u ovom radu.

5.2.2. *MYCN* status i stadijumi bolesti

Rezultati dobijeni u ovoj studiji su pokazali da je prisustvo amplifikacije *MYCN* onkogeni u korelaciji sa višim stadijumima bolesti kod analiziranih NB bolesnika. Od ukupno 20 bolesnika (27.8%) sa *MYCN* amplifikacijom, 90% je bilo u III i IV stadijumu bolesti (18/20). U našem uzorku od 72 NB bolesnika nijedan bolesnik sa *MYCN* amplifikacijom nije bio u stadijumu I i II, iako se taj procenat u literaturi kreće oko 4% [2]. Takođe, u ovim stadijumima nije detektovan nijedan bolesnik sa viškom *MYCN* onkogeni. U stadijumima III i IV je ukupno bilo 36% bolesnika sa amplifikovanim *MYCN* onkogenom (18/50), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima - 31%, 30-40% do 30% samo u IV stadijumu [2, 11, 31]. Procenat bolesnika sa *MYCN* amplifikacijom u IV-S stadijumu u našem uzorku analiziranih bolesnika je iznosio 18% (2/11) što je više nego što je opisano u literaturi – 8%, 5% [2, 31, 76]. Zastupljenost amplifikovanog *MYC* onkogeni u različitim stadijumima bolesti u radu Spitz i saradnika je sledeća: stadijum (po INSS) 1: 4%, 2: 5%, 3: 22%, 4: 63%, 4S: 5% [76]. U našem uzorku bolesnika u stadijumu III je bilo 15% bolesnika, u stadijumu IV, 75% bolesnika i u IV-S, 10% bolesnika.

Višak *MYCN* onkogeni je, u analiziranom uzorku bolesnika u ovom radu, detektovan samo u III i IV stadijumu bolesti (po dva bolesnika u svakom navedenom stadijumu). U radu Spitz i saradnika, međutim, *MYCN* višak se sreće u svim stadijumima bolesti (stadijum 1: 11%, stadijum 2: 11%, stadijum 3: 3%, stadijum 4S: 8%), ali je u najvećem procentu nađen u stadijumu 4 (68.%) [76].

Bez *MYCN* amplifikacije u našoj grupi ispitanika je bilo 66.7% i oni su bili raspoređeni u stadijume na sledeći način: stadijum I: 12.5%, II: 10.4%, III: 39.6%, IV: 18.8%, IV-S: 18.8%. Ovakva raspodela bolesnika se razlikuje od one koju su publikovali

Spitz i saradnici: stadijum 1: 32%, stadijum I2: 17%, stadijum 3: 17%, 4: 26%, stadijum 4S: 9% [76].

Preživljavanje NB bolesnika sa amplifikovanim *MYCN* onkogenom u našoj studiji iznosilo je 35% (tabela 15). S obzirom na to da je amplifikacija u našem uzorku NB bolesnika detektovana samo kod bolesnika u III i IV stadijumu, kao i u IV-S stadijumu, ova raspodela preživljavanja bolesnika se odnosi i na stadijume sa *MYCN* amplifikacijom. Schwab i saradnici zaključuju da je *MYCN* amplifikacija značajan prediktor lošeg ishoda, pre svega u nižim stadijumima bolesti [11]. Schneiderman i saradnici upravo iznose isti zaključak u svom radu: u nižim, prognostički povoljnim stadijumima je ukupno sedmogodišnje preživljavanje bolesnika bez *MYCN* amplifikacije iznosilo 96%, dok je sa *MYCN* amplifikacijom bilo 59% [92].

5.2.3. *MYCN* status i delecija 1p36.3

U grupi od 50/72 NB bolesnika ispitivano je prisustvo ili odsustvo delecije u regionu 1p36.3. U okviru ove grupe 82.9% bolesnika bez amplifikacije *MYCN* onkogeni nije imalo detektovanu deleciju 1p36.3, dok je 17.1% imalo del1p36.3. Bolesnici sa *MYCN* viškom su u 50% slučajeva bili bez del1p36.3, a u 50% slučajeva sa del 1p36.3. Kod bolesnika sa *MYCN* amplifikacijom čak 15.4% nije imalo deleciju, a 84.6% bolesnika je uz amplifikaciju imalo detektovanu i deleciju 1p36.3. Spitz i saradnici u radu iz 2004. godine iznose svoje rezultate u kojima je 1p aberacija detektovana u 11% bolesnika bez *MYCN* amplifikacije, u 33% sa *MYCN* viškom i u 85% sa *MYCN* amplifikacijom [76].

MYCN amplifikacija i del 1p su, zasebno, u korelaciji sa višim stadijumima, agresivnim tokom i lošim ishodom bolesti [93]. Takođe, pokazana je i korelacija između ova dva genetička parametra koji, kada su u kombinaciji, predstavljaju genetički prepoznatljivo obeležje visoko agresivnih NB [2, 62,]. Većina bolesnika sa *MYCN* amplifikacijom ima i del1p, ali nemaju svi bolesnici sa del1p i *MYCN* amplifikaciju, što može da ukaže na to da del1p prethodi amplifikaciji *MYCN* onkogeni [2]. Ono što je takođe interesantno je činjenica da je *MYCN* amplifikacija uvek udružena ili sa del1p ili sa 17q viškom [83].

5.2.4. *MYCN* status i kariotip

NB bolesnici bez *MYCN* amplifikacije, u analiziranoj grupi u našem radu, su u većini slučajeva imali normalan kariotip (80.5%), a svega 19.5% je imalo aberantan kariotip. Citogenetička analiza je pokazala prisustvo sledećih aberacija : „near“ diploidija, „near“ tetraploidija, tetraploidija i kompleksan kariotip. Kod dva od 4 bolesnika sa viškom *MYCN* onkogenom je urađen kariotip i nalaz je bio normalan, dok je u grupi sa *MYCN* amplifikacijom 50% imalo aberaciju u kariotipu, a 50% imalo normalan nalaz kariotipa. Od detektovanih aberacija u ovoj grupi bolesnika bili su zastupljeni dmin i hsovi što je i očekivano s obzirom na to da ove aberacije predstavljaju citogenetičku manifestaciju amplifikacije *MYCN* onkogenom. Takođe, u ovoj grupi je detektovana i dellp, „near“ tetraploidija i tetraploidija, kao i pentaploidija (tabela 8). Westermann i saradnici sugerišu da je amplifikovani *MYCN*, uz prisustvo strukturnih aberacija, najčešće onih koje uključuju 1p, češći u „near“ diploidnim i „near“ tetraploidnim tumorima i to kod bolesnika starijih od 12 meseci [36].

George i saradnici su 2005. godine objavili rad u kome ističu da kod NB bolesnika sa *MYCN* amplifikacijom u četvrtom stadijumu, ploidiya nije imala značaja u prognostičkom smislu, kako u grupi bolesnika ispod 12 meseci, tako i u grupi jednako ili više od 12 meseci [59]. U grupi bolesnika bez *MYCN* amplifikacije u 4 stadijumu, uzrasta do 18 meseci, pokazano je da je vreme preživljavanja do pojave relapsa znatno bolje kod bolesnika sa hiperdiploidijom u odnosu na one sa diploidnim tumorom. Ploidiya gubi prognostički značaj kod NB bolesnika starijih od 2 godine.

5.2.5. *MYCN* status i grupe rizika

Različite kooperativne grupe za dijagnostiku i lečenje NB imaju različite kriterijume za svrstavanje bolesnika u određenu grupu rizika, ali su to uglavnom tri kategorije i to: nizak, srednji i visok rizik. Tri prognostička faktora su od presudnog značaja u ovoj klasifikaciji i to su: stadijum bolesti, uzrast bolesnika i *MYCN* status. Prisustvo *MYCN* amplifikacije svrstava bolesnika u grupu visokog rizika bez obzira na ostale prognostički povoljne faktore! Izuzetak je samo stadijum 1 kod koga je prisutan nizak rizik nezavisno od

MYCN statusa i uzrasta [32]. Shodno tome, u našoj grupi bolesnika sa amplifikovanim *MYCN* onkogenom, 100% bolesnika je bilo svrstano u grupu sa visokim rizikom. U grupi sa viškom *MYCN* onkogenom, 25% bolesnika je bilo u srednjem riziku, a 75% u visokom riziku. Grupa bolesnika bez *MYCN* amplifikacije je bila relativno ravnomerno raspodeljena u ove tri grupe, ali je procenat ipak opadao sa porastom rizika: 39.6% bolesnika je bilo u grupi sa niskim rizikom, 31.3% u grupi sa srednjim rizikom i 29.2% u grupi sa visokim rizikom.

5.3. POREĐENJE UTICAJA DELECije 1p36.3 I OSTALIH POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB

5.3.1. Delecija 1p36.3 i uzrast pri postavljanju dijagnoze

U grupi od 50/72 NB bolesnika kod kojih je urađen status 1p, bez del1p36.3 je bilo 65.5% (21/32) bolesnika uzrasta ispod 18 meseci i 34.4% (11/32) uzrasta 18 ili više meseci, dok je odnos u grupi sa del1p36.3 bio obrnut i iznosio je 27.8% (5/18) uzrasta < 18 i 72.2% (13/18) uzrasta ≥ 18 meseci. Ukoliko posmatramo raspodelu ove aberacije u odnosu na uzrast, u grupi ispod 18 meseci je 19.2% (5/26) imalo del 1p, a u grupi jednako ili više od 18 meseci 54.2% (13/24), odnosno kod starijih bolesnika je ova aberacija bila češće zastupljena. U radu Marisa i saradnika iz 2001.godine, u grupi ispod 12 meseci je bilo 22% sa del 1p, a 37% u grupi iznad 12 meseci [48]. Mnoge studije su dokumentovale veoma jasnu korelaciju između del 1p i uzrasta iznad 12 meseci, tumora sa metastazama i prisutnom *MYCN* amplifikacijom [68-71]. Delecija 1p je češće prisutna kod tumora sa malignijim tokom, ali novija istraživanja nisu pokazala da ova aberacija ima nezavisan prognostički značaj, odnosno da utiče na ukupnu dužinu preživljavanja. Shodno tome, većina radova koja se odnosi na uticaj del 1p i uzrasta bolesnika na preživljavanje uzima u obzir i druge, često detektovane aberacije kao što je *MYCN* amplifikacija, ili kliničke parametre kao što je stadijum bolesti.

Kako je kod naših NB bolesnika starosna granica koja deli povoljan od nepovoljnog uzrasta bila 19 meseci, nakon statističke obrade podataka je došlo do promene samo u grupi

bolesnika bez delecije 1p u smislu da se broj bolesnika bez del1p ispod 19 meseci sa 65.5% povećao na 68.8%, dok se broj bolesnika sa 19 i više meseci smanjio sa 34.4% na 31.3%.

5.3.2. Delecija 1p36.3 i stadijumi bolesti

Delecije 1p36.3 je u analiziranoj grupi NB pacijenata češće bila prisutna u višim stadijumima bolesti (u III : 5/18, odnosno 27.8% ; u IV stadijumu 10/18, odnosno 55.6%), dok je u nižim stadijumima bolesti bila slabije zastupljena (I-5.6%, II-0.0% i IV-S-11.1%). Postoje teškoće u poređenju distribucije del1p po stadijumima između različitih istraživačkih grupa zbog korišćenja različitih sistema za klasifikaciju. Često se stadijumi 1, 2 i 4S (odnosno I, II i IV-S) grupišu u tzv. povoljne stadijume bolesti i kod njih se pojava del 1p kreće između 5 do 27%, dok se kod stadijuma 3 i 4 (III i IV) ovaj procenat kreće između 30 i 50% (del 1p i stages). Mora i saradnici su u svojoj studiji izneli da je u povoljnim stadijumima bilo 32% bolesnika sa del1p, a u višim, nepovoljnim, 52% bolesnika. U našem radu se u stadijumima I, II i IV-S nalazilo 19% bolesnika, a u stadijumima III i IV, 44%, što se uklapa u dati raspon u literaturi [94]. Nakon statističke obrade podataka pokazano je da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju bolesnika bez del1p i sa del1p u odnosu na stadijume. Međutim, kao i u poređenju statusa 1p sa uzrastom, i u ovom slučaju se ne mogu izvesti zaključci o uticaju 1p statusa na preživljavanje bez uključivanja drugih, prognostički značajnih faktora (uzrast, *MYCN* status).

5.3.3. Delecija 1p36.3 i *MYCN* status

Rezultati naših istraživanja su pokazali da u analiziranom uzorku NB bolesnika postoji visoka korelacija između *MYCN* statusa i del1p36.3 (tabela 43, tabela 29). Kada posmatramo grupu od 50/72 NB bolesnika kod kojih je urađen status 1p36.3, u grupi bolesnika bez delecije, u poređenju sa *MYCN* statusom, smo dobili sledeći odnos u procentima: bez *MYCN* amplifikacije je bilo 90.6%, sa *MYCN* viškom 3.1% i sa amplifikovanim *MYCN* onkogenom 6.3%. U grupi bolesnika sa del1p36.3, pokazano je da je 33.3% bolesnika bilo bez amplifikacije, 5.6% sa *MYCN* viškom i 61.1% sa *MYCN*

amplifikacijom. Nekoliko studija je pokazalo korelaciju između del1p i amplifikacije *MYCN* onkogen [95]. White i saradnici su detektovali amplifikovani *MYCN* u 78% NB koji su imali LOH. Takeda i saradnici su svoju grupu NB bolesnika sa del1p podelili na one sa velikom delecijom i one sa malom, intersticijalnom delecijom. Utvrđeno je da su bolesnici sa većim delecijama, koje su bile više proksimalno, imali amplifikovani *MYCN* onkogen, dok je kod bolesnika sa distalnom, malom delecijom bio prisutan *MYCN* u normalnom broju kopija [96].

5.3.4. Delecija 1p36.3 i kariotip

Kod 41/72 NB bolesnika je urađena i detekcija delecije 1p36.3 i analiza kariotipa. U ovoj analiziranoj grupi, bez del1p je bilo 65% NB bolesnika, i od njih je 88.9% imalo normalan kariotip, a 11.1% aberantan kariotip. Od aberacija u grupi bez del1p36.3 su bile zastupljene „near“ diploidija i „near“ triploidija. U 34% bolesnika iz ovog uzorka je detektovana del 1p36.3, i polovina njih je imala normalan kariotip, a polovina je imala aberantan kariotip. Kod ove grupe bolesnika je češće detektovana „near“ tetraploidija i tetraploidija, amplifikacija *MYCN* onkogen u obliku dmin i hsova, kao i kompleksan kariotip. Westermann (2002) navodi da su „near“ diploidni i „near“ tetraploidni tumori često udruženi sa strukturnim aberacijama koje obično zahvataju 1p, kao i sa *MYCN* amplifikacijom i uglavnom se sreću u uzrastu iznad 12 meseci, što je bio slučaj i u našoj grupi bolesnika (tabela 8) [36].

5.3.5. Delecija 1p36.3 i grupe rizika

Kao što je navedeno u rezultatima, zastupljenost NB bolesnika bez delecije 1p36.3 u grupama sa rizikom označenim kao nizak, srednji i visok, je bila uglavnom ravnomerna i iznosila je 34.4%, 37.5%, i 28.1% respektivno. U grupi NB bolesnika sa delecijom 1p36.3 najzastupljeniji su bili bolesnici iz grupe sa visokim rizikom, 83.3%, zatim sa srednjim rizikom 11.1%, a najmanje ih je bilo u grupi sa niskim rizikom, svega 5.6% . Ovi rezultati nedvosmisleno pokazuju da je del1p36.3 najčešće prisutna u tumorima iz grupe visokog rizika. Maris i saradnici su, takođe, utvrdili postojanje korelacije, iako je u njihovoj grupi

bolesnika sa visokim rizikom 49% imalo 1p36 LOH, dok je svega 15% sa ovom aberacijom detektovano u grupi srednjeg i niskog rizika. Ista grupa autora je uradila i univarijantnu analizu radi određivanja prognostičkog značaja 1p36 unutar grupa rizika. Grupa bolesnika sa srednjim rizikom nije analizirana zbog izuzetno povoljnog preživljavanja unutar grupe. U grupi sa visokim rizikom je vreme do pojave relapsa kao i ukupno preživljavanje bilo smanjeno kod bolesnika sa LOH 1p, a takođe i u grupi sa niskim rizikom. Međutim, kada je urađena multivarijantna analiza, u koju su bili uključeni parametri kao što su uzrast bolesnika, histologija tumora i *MYCN* status, pokazano je da jedino del1p nije nezavisan prognostički faktor, odnosno da ima uticaja na smanjeno vreme do pojave relapsa, ali ne utiče na ukupnu dužinu preživljavanja [65].

6. ZAKLJUČAK

U dijagnostičkoj proceduri NB određivanje različitih genetičkih parametara ima značajnu ulogu u postavljanju dijagnoze, određivanju kliničkog stadijuma, odabiru terapije i prognozi bolesti.

Na osnovu dobijenih i analiziranih rezultata na prikazanoj grupi bolesnika u ovom radu, mogu se izvesti sledeći zaključci:

6.1. UTICAJ POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB

- ✓ Utvrđena je starosna granica kod NB bolesnika između prognostički povoljnog i nepovoljnog uzrasta i ona iznosi 19 meseci. Preživljavanje je bilo bolje u grupi ispod 19 meseci.
- ✓ Utvrđena je distribucija NB bolesnika po stadijumima: I-8.3% , II-6.9%, III-33.3%, IV-36.1% i IV-S-15.3%. Preživljavanje NB bolesnika je bolje u nižim stadijumima bolesti, odnosno lošije u višim stadijumima bolesti.
- ✓ Utvrđeno je prisustvo *del1p36.3* kod 36% NB bolesnika od 50 analiziranih. Preživljavanje je lošije kod NB bolesnika sa detektovanom *del1p36.3*.
- ✓ Utvrđen je *MYCN* status kod svih prikazanih NB bolesnika i pokazano je da je bez *MYCN* amplifikacije bilo 66.7% bolesnika, sa *MYCN* amplifikacijom 27.8%, a sa viškom *MYCN* onkogenom 5.6% NB bolesnika. Preživljavanje je najbolje u grupi bez amplifikacije dok je najlošije u grupi sa amplifikacijom. U grupi sa viškom *MYCN* onkogenom preživljavanje je iznosilo 50%.
- ✓ Aberantan kariotip je utvrđen kod 27% NB bolesnika od 59 analiziranih i njihovo preživljavanje je lošije u odnosu na grupu sa normalnim kariotipom.
- ✓ Utvrđena je raspodela NB bolesnika po grupama rizika: 26.4% bolesnika je bilo u grupi niskog, 22.2% u grupi srednjeg i 51.4% u grupi visokog rizika.

Preživljavanje je bilo najbolje u grupi niskog rizika, a najlošije u grupi visokog rizika.

6.2. POREĐENJE UTICAJA *MYCN* STATUSA I OSTALIH POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB

- ✓ Preživljavanje NB bolesnika mlađih od 19 meseci bez *MYCN* amplifikacije i onih sa viškom *MYCN* je značajno veće u odnosu na bolesnike sa amplifikacijom.
- ✓ Prisustvo *MYCN* amplifikacije je u korelaciji sa višim stadijumima bolesti, dok se normalan status *MYCN* onkogen sreće u svim stadijumima. Amplifikacija *MYCN* onkogen u višim stadijumima bolesti ima lošu prognozu, za razliku od normalnog *MYCN* statusa, koji u nižim stadijumima bolesti ima dobru prognozu. Višak *MYCN* onkogen je u asocijaciji sa višim stadijumima bolesti, ali ne utiče na preživljavanje.
- ✓ Amplifikacija *MYCN* onkogen je u visokom procentu udružena sa delecijom 1p36.3 i oba parametra su u korelaciji sa lošim ishodom bolesti. Višak *MYCN* onkogen je ravnomerno distribuiran između grupa bolesnika bez del1p36.3 i sa del1p36.3.
- ✓ Normalan status *MYCN* onkogen i višak *MYCN* onkogen je u visokom procentu udružen sa normalnim kariotipom u koštanoj srži. *MYCN* amplifikacija nije u asocijaciji sa aberantnim kariotipom.
- ✓ Amplifikovani *MYCN* onkogen je, kao nezavisan prognostički faktor, kod 100% bolesnika udružen sa grupom visokog rizika. Višak *MYCN* onkogen je u visokom procentu udružen sa grupom visokog rizika, dok je normalan *MYCN* status raspoređen relativno ravnomerno u sve tri grupe rizika.

6.3. POREĐENJE UTICAJA DELECije 1p36.3 I OSTALIH POJEDINAČNIH PARAMETARA NA PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA NB

- ✓ Delecija 1p36.3 je češća u grupi bolesnika iznad 19 meseci i njihovo preživljavanje je lošije.
- ✓ Delecije 1p36.3 je češće prisutna u višim stadijumima bolesti, i preživljavanje ovih bolesnika je lošije u odnosu na bolesnike u nižim stadijumima bolesti u kojima je delecija 1p36.3 slabije zastupljena.
- ✓ postoji visoka korelacija između del1p36.3 i *MYCN* amplifikacije i preživljavanje ovih bolesnika je lošije u odnosu na bolesnike bez del1p36.3 i *MYCN* amplifikacije.
- ✓ Delecija 1p36.3 nije udružena sa aberantnim kariotipom, a odsustvo delecije 1p36.3 je češće udruženo sa normalnim kariotipom u koštanoj srži.
- ✓ Delecija 1p36.3 je najčešće prisutna u tumorima iz grupe visokog rizika čije je preživljavanje lošije. Zastupljenost NB bolesnika bez delecije 1p36.3 u grupama sa rizikom označenim kao nizak, srednji i visok, je bila uglavnom ravnomerna.

7. LITERATURA

1. Gatta G, Ferrari A, Stiller CA, Pastore G, Bisogno G, Trama A, Capocaccia R; RARECARE Working Group. Embryonal cancers in Europe. *Eur J Cancer*. 2012 Jul;48(10):1425-33.
2. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:203–216.
3. <http://www.orpha.net>
4. National cancer institute. Surveillance, Epidemiology And End Results Database. <http://seer.cancer.gov> (accessed Novembar, 2005)
5. Schwab M: Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 1999, 9:319-325.
6. Wright JH (1910) Nerurocytoma or neuroblastoma: a kind of tumor not generally recognized. *J Exp Med* 12:556-561.
7. Pepper WA (1901) A study of congenital sarcoma of the liver and suprarenal with report of a case. *Am J Med Sci (1827-1924)* 121:287-299.
8. Hutchison R (1907) On suprarenal sarcoma in children with metastases to the scull. *Q J Med* 1:33-38
9. Maris, John M;Hogarty, Michael D;Bagatell, Rochelle;Cohn, Susan L. Neuroblastoma *The Lancet*; Jun 23-Jun 29, 2007; 369, 9579; ProQuest Central pg. 2106
10. Hallett A., Traunecker H. A review and update on neuroblastoma. *Paediatrics and child health* Volume 22, Issue 3 , Pages 103-107, March 2012
11. Schwab, M., Westermann, F., Hero, B., Berthold, F., 2003. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol.* 4, 472–480.

12. Matthay KK, Sather HN, Seeger RC, Haase GM, and Hammond GD. Excellent outcome of stage II neuroblastoma is independent of residual disease and radiation therapy. *J Clin Oncol.* 1989;7(2):236-44.
13. Evans AE, Silber JH, Shpilsky A, and D'Angio GJ. Successful management of low-stage neuroblastoma without adjuvant therapies: a comparison of two decades, 1972 through 1981 and 1982 through 1992, in a single institution. *J Clin Oncol.* 1996;14(9):2504-10.
14. Kushner BH, Cheung NK, LaQuaglia MP, Ambros PF, Ambros IM, Bonilla MA, et al. International neuroblastoma staging system stage 1 neuroblastoma: a prospective study and literature review. *J Clin Oncol.* 1996;14(7):2174-80.
15. Alvarado CS, London WB, Look AT, Brodeur GM, Altmiller DH, Thorner PS, et al. Natural history and biology of stage A neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2000;22(3):197-205.
16. Perez CA, Matthay KK, Atkinson JB, Seeger RC, Shimada H, Haase GM, et al. Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children's cancer group study. *J Clin Oncol.* 2000;18(1):18-26.
17. D'Angio, G., Evans, A., Koop, C., 1971. Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis. *Lancet* 1, 1046–1049.
18. Esiashvili N, Anderson C, Katzenstein H.M. Neuroblastoma Volume 33, Issue 6, *Curr Probl Cancer* 2009;33:333-360
19. Kushner BH, Yeh SD, Kramer K, Larson SM, and Cheung NK. Impact of metaiodobenzylguanidine scintigraphy on assessing response of high-risk neuroblastoma to dose-intensive induction chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2003;21(6):1082-6.

20. Schmidt M, Simon T, Hero B, Schicha H, and Berthold F. The prognostic impact of functional imaging with (123)I-mIBG in patients with stage 4 neuroblastoma >1 year of age on a high-risk treatment protocol: results of the German Neuroblastoma Trial NB97. *Eur J Cancer*. 2008;44(11):1552-8.
21. Hicks MJ, Mackay B. Comparison of ultrastructural features among neuroblastic tumors: maturation from neuroblastoma to ganglioneuroma. *Ultrastruct Pathol*. 1995 Jul-Aug;19(4):311-22
22. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer*. 1999 Jul 15;86(2):349-63
23. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999 Jul 15;86(2):364-72.
24. Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV, Hata J, Roald B, Dehner LP, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK, Shimada H. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer*. 2003 Nov 15;98(10):2274-81.
25. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleiermacher G, Speleman F, Spitz R, London WB, Cohn SL, Pearson ADJ and Maris JM, International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *British Journal of Cancer* (2009) 100, 1471 – 1482
26. Ootsuka S, Asami S, Sasaki T, Yoshida Y, Nemoto N, Shichino H, Chin M, Mugishima H, Suzuki T. Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma. *Biol Pharm Bull*. 2008 Jun;31(6):1071-4

27. Evans, A.E., D'Angio, G.J. & Randolph, J. A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer studygroup A. Cancer.1971 Feb;27(2):374-8.
28. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D'Angio G, et al. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. J Clin Oncol. 1988b;6(12):1874-81.
29. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al: Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. J Clin Oncol 11:1466-1477, 1993
30. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson AD. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. INRG Task Force. J Clin Oncol. 2009 Jan 10;27(2):298-303
31. Colon NC and Chung DH. Neuroblastoma. Adv Pediatr. 2011 ; 58(1): 297–311.
32. Bruno De Bernardi, Susan L. Cohn. In EDUCATION BOOK International Society of Paediatric Oncology (2005): Risk-based Treatment for Children with Neuroblastoma. (pp62-67). 37th Congress of the International Society of Paediatric Oncology Vancouver, British Columbia, Canada · September 20-24, 2005
33. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report.INRG Task Force. J Clin Oncol. 2009 Jan 10;27(2):289-97.
34. Schwab M., Varmus H.E., Bishop J.M., Grzeschik K.H., Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Brodeur G., Trent J. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc, Nature 308 (5956) (1984) 288–291.

35. Corvi R., Amler L.C., Savelyeva L., Gehring M, Schwab M. MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 91 (12) (1994) 5523–5527.
36. Westermann F, Schwab M (2002) Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Letters* 184 (2002) 127–147
37. Amler L.C., Schwab M, Amplified N-myc in human neuroblastoma cells is often arranged as clustered tandem repeats of differently recombined DNA, *Mol. Cell. Biol.* 9 (11) (1989) 4903–4913.
38. Amler L.C., Schurmann J, Schwab M, The DDX1 gene maps within 400 kbp 50 to MYCN and is frequently coamplified in human neuroblastoma, *Genes Chromosomes Cancer* 15 (2) (1996) 134–137.
39. Squire J.A., Thorner P.S., Weitzman S., Maggi J.D., Dirks P., Doyle J., Hale M., Godbout R., Co-amplification of MYCN and a DEAD box gene (DDX1) in primary neuroblastoma, *Oncogene* 10 (7) (1995) 1417–1422.
40. Stanton LW, Schwab M, Bishop JM. Nucleotide sequence of the human N-myc gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1772–76.
41. Ibson JM, Rabbitts PH. Sequence of a germ-line N-myc gene and amplification as a mechanism of activation. *Oncogene* 1988; 2: 399–402.
42. Lutz W., Schwab M, In vivo regulation of single copy and amplified N-myc in human neuroblastoma cells, *Oncogene* 15 (3) (1997) 303–315.
43. Schwab M., Ellison J., Busch M., Rosenau W., Varmus H.E., Bishop J.M., Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (15) (1984) 4940–4944.

44. Corvi R., Savelyeva L., Schwab M. Duplication of N-MYC at its resident site 2p24 may be a mechanism of activation alternative to amplification in human neuroblastoma cells, *Cancer Res.* 55 (16) (1995) 3471–3474.
45. Valent A, Le Roux G, Barrois M, et al. MYCN gene overrepresentation detected in primary neuroblastoma tumour cells without amplification. *J Pathol* 2002; 198: 495–501.
46. Davidoff A.M. Neuroblastoma. *Seminars in Pediatric Surgery* (2012) 21, 2-14
47. Rubie H, Hartmann O, Michon J, et al. N-Myc gene amplification is a major prognostic factor in localized neuroblastoma: results of the French NBL 90 study. Neuroblastoma Study Group of the Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1171–82.
48. Maris J.M., Guo C., Blake D., White P.S., Hogarty M.D., Thompson P.M., Rajalingam V, Gerbing R., Stram D.O., Matthay K.K., Seeger R.C. and Brodeur G.M. Comprehensive Analysis of Chromosome 1p Deletions in Neuroblastoma *Medical and Pediatric Oncology* 36:32–36 (2001)
49. Gilbert F, Balaban G, Moorhead P., Bianchi D., Schlesinger H., Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma tumors and cell lines, *Cancer Genet. Cytogenet.* 7 (1) (1982) 33–42
50. Bader S.A., Fasching C., Brodeur G.M., Stanbridge E.J., Dissociation of suppression of tumorigenicity and differentiation in vitro effected by transfer of single human chromosomes into human neuroblastoma cells, *Cell Growth Differ.* 2 (5) (1991) 245–255.
51. Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, et al. CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100:940-9.
52. Attiyeh E.F., London W.B., Mosse Y.P., Wang Q, Winter C., Khazi D., McGrady P.W., Seeger R.C, Look A.T., Shimada H., Brodeur G.M, Cohn S.L. Matthay K.K.,

- and Maris J.M, Chromosome 1p and 11q Deletions and Outcome in Neuroblastoma
N Engl J Med 2005;353:2243-53.
53. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, eds (2009) ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, S. Karger.
 54. Dracopoli N.C., Haines J.L., Korf B.R., et al. Short protocols in Human genetics. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc; 2004
 55. Peter M., Michon J. and Vielh P. (1992): PCR assay for chromosome 1p deletion in small neuroblastoma samples. Int J Cancer, 52,544-548.
 56. Surveillance, Epidemiology, and End Results databases www.seer.cancer.gov
 57. London WB, Castleberry RP, Matthay KK, et al: Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. J Clin Oncol 23:6459-6465, 2005
 58. Breslow N, McCann B: Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma. Cancer Res 31:2098-2103, 1971
 59. George RE, London WB, Cohn S, et al: Hyperdiploidy plus nonamplified *MYCN* confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group Study. J Clin Oncol 23:6466-6473, 2005
 60. Schmidt ML, Lal A, Seeger R, et al: Favorable prognosis for patients 12 to 18 months of age with stage 4 nonamplified *MYCN* neuroblastoma: A Children's Cancer Group Study. J Clin Oncol 23:6474-6480, 2005
 61. Bernstein ML, Leclerc JM, Bunin G, et al. A population-based study of neuroblastoma incidence, survival and mortality in North America. J Clin Oncol 1992;10:323-9. Erratum, J Clin Oncol 1992;10:1202.

62. Fong C.T., Dracopoli N.C., White P.S., Merrill P.T., Griffith R.C., Housman D.E., Brodeur G.M. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (10) (1989) 3753–3757.
63. Takayama H., Suzuki T., Mugishima H., Fujisawa T., Ookuni M., Schwab M., Gehring M., Nakamura Y, Sugimura T., Terada M., Yokota J. Deletion mapping of chromosomes 14q and 1p in human neuroblastoma, *Oncogene* 7 (6) (1992) 1185–1189.
64. Takita T, Hayashi Y., Kohno T., Shiseki M., Yamaguchi N., Hanada R., Yamamoto K., Yokota J. Allelotype of neuroblastoma, *Oncogene* 11 (9) (1995) 1829–1834.
65. Maris J.M., Weiss M.J., Guo C., Gerbing R.B., Stram D.O., White P.S., Hogarty M.D., Sulman E.P., Thompson P.M., Lukens J.N., Matthay K.K., Seeger R.C., Brodeur G.M. Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study, *J. Clin. Oncol.* 18 (9) (2000) 1888–1899.
66. Fong C.T., White P.S., Peterson K., Sapienza C., Cavenee W.K., Kern S.E., Vogelstein B., Cantor A.B., Look A.T., Brodeur G.M. Loss of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas, *Cancer Res.* 52 (7) (1992) 1780–1785.
67. Martinsson T., Sjoberg R.M., Hedborg F., Kogner P. Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms, *Cancer Res.* 55 (23) (1995) 5681–5686.
68. Maris J.M., White P.S., Beltinger C.P., Sulman E.P., Castleberry R.P., Shuster J.J., Look A.T., Brodeur G.M. Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma, *Cancer Res.* 55 (20) (1995) 4664–4669.

69. Gehring M., Berthold F, Edler L., Schwab M., Amler L.C. The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma, *Cancer Res.* 55 (22) (1995) 5366–5369.
70. Schleiermacher G., Delattre O., Peter M., Mosseri V., Delonlay P., Vielh P., Thomas G., Zucker J.M., Magdelenat H., Michon J. Clinical relevance of loss heterozygosity of the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma: a single-institution study, *Int. J. Cancer* 69 (2) (1996) 73–78.
71. Caron H., Van Sluis P., De Kraker J., Bokkerink J., Egeler M., Laureys G., Slater R., Westerveld A., Voute P.A., Versteeg R. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma, *N. Engl. J. Med.* 334 (4) (1996) 225–230.
72. Maris J.M., Weiss M.J., Guo C., Gerbing R.B., Stram D.O., White P.S., Hogarty M.D., Sulman E.P., Thompson P.M., Lukens .N., Matthay K.K., Seeger R.C., and Brodeur G.M. Loss of Heterozygosity at 1p36 Independently Predicts for Disease Progression But Not Decreased Overall Survival Probability in Neuroblastoma Patients: A Children's Cancer Group Study
73. Schwab M: Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 1999, 9:319–325
74. Savelyeva L, Schwab M: Amplification of oncogenes revisited: from expression profiling to clinical application. *Cancer Letters* 2001, 167:115–123
75. Valent A, Le Roux G, Barrois M, Terrier-Lacombe MJ, Valteau-Couanet D, Le'on B, Spengler B, Lenoir G, Be'nard J, Bernheim A: MYCN gene overrepresentation detected in primary neuroblastoma tumour cells without amplification. *J Pathology* 2002, 198:495–501

76. Spitz R, Hero B, Skowron M, Ernestus K, Berthold F: *MYCN*-status in neuroblastoma: characteristics of tumors showing amplification, gain and non-amplification. *Eur J Cancer* 2004, 40:2753–2759
77. Stallings RL, Carty P, McArdle L, Mullarkey M, McDermott M, O'Meara A, Ryan E, Catchpoole D, Breatnach F: Evolution of unbalanced gain of distal chromosome 2p in neuroblastoma. *Cytogenet Genome Res* 2004, 106:49–54
78. Jeison M, Ash S, Halevy-Berko G, Mardoukh J, Luria D, Avigad S, Feinberg-Gorenshtein G, Goshen Y, Hertz G, Kapelushnik J, Barak AB, Attias D, Steinberg R, Stein J, (2010) 2p24 Gain Region Harboring MYCN Gene Compared with MYCN Amplified and Nonamplified Neuroblastoma, Biological and Clinical Characteristics. *The American Journal of Pathology*, Vol. 176, No. 6, June 2010 2616-2625
79. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224: 1121–1124
80. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D (1985) Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313: 1111– 1116
81. Ambros PF, Ambros IM, Strehl S, Bauer S, Luegmayr A, Kovar H, Ladenstein R, Fink FM, Horcher E, Printz G, Mutz I, Schilling F, Urban C, Gadner H (1995) Regression and progression in neuroblastoma. Does genetics predict tumour behaviour? *Eur J Cancer* 31A: 510–515
82. Guć Šćekić M., Đurišić M., Đokić D., Vujić D., Milović I., Đuričić S., Čvorkov-Dražić M., Vidić D. (2007) An evaluation of clinical, biological and genetic prognostic factors in neuroblastoma patients: a single institution study. *Periodicum Biologorum* Vol.109, No 2, 129-136

83. Cohn S.L., Tweddle D.A. MYCN amplification remains prognostically strong 20 years after its “clinical debut” *European Journal of Cancer* 40 (2004) 2639–2642
84. Souzaki R., Tajiri T., Teshiba R., Higashi M., Kinoshita Y., Tanaka S., Taguchi T. The genetic and clinical significance of MYCN gain as detected by FISH in neuroblastoma *Pediatr Surg Int* (2011) 27:231–236
85. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, et al: Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 27:1026- 1033, 2009
86. Schleiermacher G., Janoueix-Lerosey I., Ribeiro A., Klijanienko J., Couturier J., Pierron G., Mosseri V., Valent A., Auger N., Plantaz D., Rubie H., Valteau-Couanet D., Bourdeaut F, Combaret V., Bergeron C., Michon J., and Delattre O. (2010) Accumulation of Segmental Alterations Determines Progression in Neuroblastoma *J Clin Oncol* 28:3122-3130, 2010
87. Oberthuer A., Berthold F, Warnat P., Hero B., Kahlert Y., Spitz R., Ernestus K., König R, Haas S., Eils R., Schwab M, Brors B., Westermann F. And Fischer M. Customized oligonucleotide microarray gene expression–based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification. *J. Clin. Oncol.* 2006;24:5070-5078.
88. Weinstein J.L., Katzenstein H.M., Cohn S.L. (2003) Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *The Oncologist*, 2003; 8: 278-292
89. De Bernardi B., Nicolas B., Boni L., Indolfi P., Carli M., Cordero Di Montezemolo L., Donfrancesco A., Pession A., Provenzi M., Di Cataldo A., Rizzo A., Tonini G. P., Dallorso S., Conte M., Gambini C., Garaventa A., Bonetti F., Zanazzo A., D’Angelo P., Bruzzi P. (2003). Disseminated neuroblastoma in children older than one year at diagnosis: comparable results with three consecutive high-dose protocols adopted by the Italian Co-Operative Group for Neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* 21, 1592–1601.

90. Matthay K.K., Villablanca J.G., Seeger R.C., Stram D.O., Harris R.E., Ramsay N.K., Swift P., Shimada H., Black C.T., Brodeur G.M., et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *N. Engl. J. Med.* 1999;341:1165–1173.
91. Schmidt ML, Lukens JN, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Gerbing RB, et al. Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: a prospective children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 2000, 18, 1260–1268
92. Schneiderman J., London W.B., Brodeur G.M., Castleberry R.S., Look A.T., and Cohn S.L. (2008) Clinical Significance of *MYCN* Amplification and Ploidy in Favorable-Stage Neuroblastoma: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 26:913-918. 2008
93. Ambros P.F, Ambros I.M., Kerbl R., Luegmayr A., Rumpler S., Ladenstein R., Amann G., Kovar H., Horcher E., De Bernardi B, Michon J., Gadner H. Intratumoural Heterogeneity of 1p Deletions and MYCN Amplification in Neuroblastomas *Medical and Pediatric Oncology* 36:1–4 (2001)
94. Mora J., Cheung N.V, Kushner B.H., LaQuaglia M.P., Kramer K., Fazzari M, Heller G., Chen L.,and Gerald W.L. Clinical Categories of Neuroblastoma Are Associated with Different Patterns of Loss of Heterozygosity on Chromosome Arm 1p *Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 2, No. 1, February 2000
95. White PS, Maris JM, Beltinger C, et al. A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5520–5524.
96. Takeda O., Homma C., Maseki N., Sakurai M., Kanda N., Schwab M., Nakamura Y., Kaneko Y.: There may be two suppressor genes of chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma. *Genes Chromosom Cancer* 10: 30-39, 1994

8. BIOGRAFSKI PODACI AUTORA

Marina Đurišić je rođena 1968.g u Aleksincu. Osnovnu i srednju školu završila je u Sokobanji. Diplomirala je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 1995. g, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, sa srednjom ocenom 8,20 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Diplomski rad pod nazivom »Izo 9(q) u akutnoj limfoblastnoj leukemiji« je radila u laboratoriji za medicinsku genetiku Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije (IMD) pod mentorstvom prof. dr Marije Guć-Šćekić.

Magistarsku tezu pod nazivom »Genetičke promene kod neuroblastoma i njihov prognostički značaj« odbranila je 2002.g. na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Marije Guć-Šćekić.

Specijalističke akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu završila je 2013.g. odbranom specijalističkog rada pod nazivom »Detekcija minimalne bolesti i minimalne rezidualne bolesti kod bolesnika sa neuroblastomom određivanjem prisustva aktivnosti tirozin hidroksilaze u koštanoj srži« pod mentorstvom prof. dr Marije Guć-Šćekić.

Zaposlena je od 1995.g. u laboratoriji za medicinsku genetiku IMDa. Radi na prenatalnoj i postnatalnoj dijagnostici hromozomopatija i monogenских oboljenja i na detekciji citogenetičkih i molekularnih rearanžmana kod leukemija i solidnih tumora.

Marina Đurišić je boravila dva meseca u toku 1996.g. u laboratoriji za onkologiju u Biotehnološkom Centru G.Gaslini u Đenovi, Italija. Obučavala se za detekciju amplifikacije *MYCN* onkogeno delecije 1p36 FISH i PCR metodom kod neuroblastoma.

Mr Marina Đurišić je objavila **126** naučnih publikacija koje obuhvataju: **8** poglavlja u knjigama/monografiji (M44), **6** radova u međunarodnim časopisima (M22 i M23), **12** radova u časopisu nacionalnog značaja (M51 i M52), **1** uvodno predavanje na skupu nacionalnog značaja štampano u celini (M61), **5** radova saopštenih na skupu nacionalnog značaja štampanih u celini (M63), **51** saopštenje sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34), **43** saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марина М. Ђуришић

број уписа _____

Изјављујем

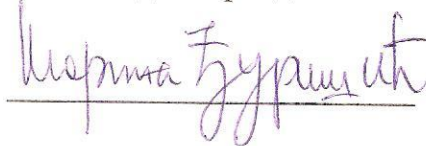
да је докторска дисертација под насловом

Хетерогеност статуса MYCN онкогена и присуство делеције 1p код болесника са неуробластомом у Србији

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, _____

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Марина М. Ђуришић

Број уписа _____

Студијски програм: Биологија, генетика

Наслов рада: **Хетерогеност статуса MYCN онкогена и присуство делеције 1p код болесника са неуробластомом у Србији**

Ментор: проф др Марија Гућ-Шћекић,
проф др Софија Павковић-Лучић

Потписани: Марина М. Ђуришић

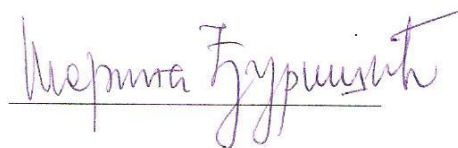
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Хетерогеност статуса MYCN онкогена и присуство делеције 1p код болесника са неуробластомом у Србији

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

