

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Branislava Radović

**PROCENA VREDNOSTI
SEMIKVANTITATIVNOG BODOVNOG
SISTEMA SIMPATIČKO-ADRENALNE
SCINTIGRAFIJE U DECE OBOLELE
OD NEUROBLASTOMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Branislava Radović

**EVALUATION OF THE SIOPEN SEMI-
QUANTITATIVE SCORING SYSTEM IN
PLANAR SIMPATIO-ADRENAL MIBG
SCINTIGRAPHY IN CHILDREN WITH
NEUROBLASTOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTOR:

Prof. dr Vera Artiko,

redovni profesor na katedri nuklearne medicine Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR:

Prof. dr Dragana Vujić,

vanredovni profesor na katedri pedijatrije Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Dragana Šobić-Šaranovć,

redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

2. Doc. dr Miloš Kuzmanović,

docent Medicinskog fakulteta u Beogradu

3. Prof. dr Simon Nikolić,

vanredni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici

DATUM ODBRANE: _____

Zahvaljujem se Profesorki dr Veri Artiko, mentorki ovog rada i direktorki Centra za nuklearnu medicinu Kliničkog centra Srbije, kao i Profesorki dr Dragani - Šobić Šarano-
vić, što su mi, svojim bogatim nuklearnomedicinskim i naučno-istraživačkim iskustom,
olakšale i usmerile izradu doktorata.

Profesorki dr Dragani Vujić jer me je uvela u lavirint ovog zagonetnog tumora i
pokazala moguće izlaze.

Hvala i nuklearnomedicinskim tehničarima na strpljenu i veštini koje su pokazali u
izvođenju mIBG studije kod teško bolesne dece.

*Svojim „malim pacijentima“, hrabrim borcima u njihovoj odsudnoj
životnoj bici, kao i pok. Profesoru Rubenu Hanu, mom učitelju u
nuklearnoj medicini, posvećujem ovaj rad sa zahvalnošću*

Procena vrednosti semikvantitativnog bodovnog sistema simpatičko-adrenalne scintigrafije u dece obolele od neuroblastoma

Branislava Radović

REZIME

Cilj: Neuroblastom je najčešći dečji tumor u čijoj se dijagnostici obavezno izvodi simpatičko-adrenalna scintigrafija pomoću metajodobenzilgvanidina. SIOPEN semi-kvantitativni bodovni sistem je jedan od bodovnih sistema kojim se procenjuje planarni mIBG scintigram, a koji se sastoji od dva segmenta mekotkivnog i osteomedularnog. Glavni ciljevi studije su : 1) procena oba „skora” (mekotkivnog i osteomedularnog) SIOPEN semikvantitativnog bodovnog sistema u odnosu na: a) klinički stadijum bolesti određen na osnovu INSS kriterijuma; b) histološki stadijum neuroblastoma određen pomoću INPC kriterijuma; c) „biološke markere“ neuroblastoma: urinarne nivoe VMA i HVA; nivo LDH; nivo NSE; nivo s-ferritina; nalaz ćelija neuroblastoma u punktu koštane srži; prisustvo umnoženosti MYCN onkogen; 2) procena međusobne povezanosti oba skora SIOPEN bodovnog sistema; 3) povezanosti skorova SIOPEN bodovnog sistema sa skorom „Kiri“ semikvantitativnog bodovnog sistema.

Metodologija: Prospektivna kohortna studija sa ponovljenim merenjem, izvedena je na 143 planarna scintigrama u sedamdesetšestoro dece koja su u Centar za nuklearnu medicinu Kliničkog centra Srbije upućena sa sumnjom na neuroblastom ili sa postavljenom dijagnozom neuroblastoma u smislu postterapijskog praćenja. Deca su upućivana iz dva centra: Univerzitetske dečje bolnice i iz Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić” u Beogradu, gde im je postavljena dijagnoza i započeto lečenje, između januara 2007. i jula 2014. Za poređenje sa skorovima SIOPEN bodovnog sistema korišćeni su podaci iz istorija bolesti malih pacijenata. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu. Scintigrafija pomoću meta-jodobenzilgvanidina obeleženog sa J^{123} ili J^{131} učinjena je po preporukama vodiča za scintigrafiju pomoću mIBG kod dece, Evropske asocijacije za nuklearnu medicinu. Tako dobijeni planarni scintigrama su procenjivani po kriterijumima SIOPEN i „Kiri“ semikvantitativnog bodovnog sistema. SIOPEN sistem ima dva „skora“ mekotkivni i osteomedularni. Mekotkivni „skor“ se izračunava sabiranjem zona patološkog nakupljanja radiofarmaka u 6 anatomskih mekotkivnih regija bolesnika. Osteomedularni „skor“ se izračunava sabiranjem zona patološkog nakupljanja radiofarmaka u 12 anatomskih regija skeleta bolesnika. „Kiri“ skor se izračunava sabiranjem zona patološkog nakupljanja radiofarmaka u 10 anatomskih regija bolesnika.

Rezultati: Utvrdili smo da su osteomedularni SIOOPEN skorovi bili statistički značajno veći kod dece sa pozitivnim nalazom biopsije koštane srži (Mann-Whitney $U = 77,9$; $p = 0,009$); kod dece sa povećanim nivoom VMA u urinu (Mann-Whitney $U = 322$; $p = 0,038$) i kod dece u uznapredovalom kliničkom stadijumu bolesti (Spearman $r = 0,37$; $p = 0,003$).

Nije bilo statistički značajne razlike između osteomedularnog i mekotkivnog SIOOPEN skora u odnosu na histološki stadijum neuroblastoma, u odnosu na povećane nivoe HVA u urinu, odnosno povećane serumske nivoe LDH, NSE i s-feritina. Razlika nije pokazana između SIOOPEN skorova i prisustva umnoženog MYCN onkogen. Uočena je statistički značajna linearna povezanost „Kiri skora“ sa steomedularnim i mekotkivnim SIOOPEN skorom pri bodovanju prva tri planarna mIBG scintigrama: na prvom bodovanom scintigramu ($n = 75$) SIOOPEN mekotkivni skor $r = 0,696$; osteomedularni SIOOPEN skor, $r = 0,676$, $p < 0,001$; na drugoj scintigrafiji ($n = 31$) SIOOPEN mekotkivni skor $r = 0,715$; osteomedularni SIOOPEN skor, $r = 0,47$ $p < 0,001$; na trećoj scintigrafiji ($n = 20$) SIOOPEN mekotkivni skor $r = 0,509$; osteomedularni SIOOPEN skor, $r = 0,656$, $p = 0,002$.

Pacijenti koji su imali patološke vrednosti nivoa VMA u urinu su u 85% slučajeva imali i patološke vrednosti nivoa HVA u urinu. Oni koji nisu imali patološke vrednosti VMA u mokraći, u 27% su imali patološke vrednosti HVA u urinu. Postoji statistički značajna povezanost pozitivnosti nalaza VMA i HVA (hi-kvadrat = 15.7, DF = 1, $p < 0,001$). Mera slaganja patoloških nalaza VMA i HVA u urinu iznosi kappa = 0.57.

U 31% pacijenata koji su imali pozitivan mekotkivni SIOOPEN skor, bio je pozitivan i SIOOPEN koštani skor. Postoji statistički značajna povezanost pozitivnih mekotkivnih i koštanih SIOOPEN skorova (hi-kvadrat = 5.1, DF = 1, $p = 0,025$, OR=4.0).

U 70% pacijenata koji su imali pozitivan koštani SIOOPEN skor, bio je pozitivan i mekotkivni SIOOPEN skor. Postoji statistički značajna povezanost pozitivnih koštanih i mekotkivnih SIOOPEN skorova (hi-kvadrat = 31.1, DF = 1, $p < 0,001$, OR = 35.8).

Zaključak: postoji statistički značajna povezanost povećanog nivoa urinarnih kateholamina i nalaza ćelija neuroblastoma u koštanoj srži sa osteomedularnim skorom SIOOPEN bodovnog sistema, kao i međusobna povezanost oba skora SIOOPEN semikvantitativnog bodovnog sistema. Oba „skora“ (i mekotkivni i osteomedularni) SIOOPEN semikvantitativnog bodovnog sistema su jednako dobri za upotrebu u proceni planarnog mIBG scintigrama kod dece obolele od neuroblastoma kao i „skor“ „Kiri“ semikvantitativnog bodovnog sistema. Mekotkivni segment SIOOPEN skora bi trebalo dodatno testirati u kontrolisanim kliničkim uslovima.

KLJUČNE REČI: neuroblastom, simpatičko-adrenalna scintigrafija, mIBG- J 123, urinarni kateholamini, tumorski markeri, MYCN onkogen, semikvantitativni bodovni sistem, SIOOPEN, Kiri

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: nuklearna medicina

Evaluation of the SIOPEN semi-quantitative scoring system in planar simpatico-adrenal MIBG scintigraphy in children with neuroblastoma

Branislava Radović

SUMMARY

Objective: Neuroblastoma is the most common malignancy in children. MIBG scintigraphy is a mandatory neuroblastoma diagnostic test, which is among others methods, semi-quantified by the SIOPEN method. SIOPEN semi-quantitative method is defined by two separate scores: soft tissue score and skeletal (osteo-medullary) score. The main objectives of the study are the following: 1) comparison both of the scores of SIOPEN semi-quantitative method to: a) INSS clinical stage of neuroblastoma; b) INPC histology grade of the tumour; c) neuroblastoma biology markers (urinary catecholamine VMA and HVA; LDH, NSE, serum ferritin, presence of neuroblastoma cell line in bone marrow smears and amplified MYCN); 2) correlation of the two scores; 3) correlation both of the SIOPEN scores with “Curie” semi-quantitative method score.

Methodology: The cross-sectional study with repeated measurements of 143 planar scintigrams, which included 76 children, was performed at the Centre for Nuclear Medicine of Clinical centre of Serbia. In line with international agreement, patients were referred to the centre by paediatricians because of suspected or proven neuroblastoma. They were sent for an MIBG scan for initial diagnosis or for evaluation after treatment by physicians of two centres: Institute for Health Protection of Mother and Child of Serbia “Dr. Vukan Cupic” and University Children’s Hospital, both in Belgrade. Patients were sent between January 2007 and July 2014. I-123/131 MIBG scintigraphy was performed according to previously published guidelines; the images were acquired 24 h or 48 h after slow intravenous injection of no less than 80 MBq (I-123) or 35 MBq (I-131) in accordance with the EANM (European Association of Nuclear Medicine) dosage card. For every patient, the I-123 MIBG and I-131 MIBG scans were scored by the Curie and the SIOPEN methods. The SIOPEN method included both the skeletal (osteo-medullary) and the soft tissue score. The skeleton was divided into 12 anatomical body segments. The soft tissue was divided into 6 anatomical body segments. According to the Curie semi-quantitative scoring method, the skeleton was divided into nine areas, and a tenth sector counting any soft tissue involvement was added.

Results: The skeletal SIOPEN scores were significantly higher in bone marrow positive children (Mann-Whitney $U=77.9$; $p=0.009$), in children with pathologically elevated

urinary VMA levels (Mann-Whitney $U=322$; $p=0.038$) and in children in a more advanced clinical stage (Spearman $r=0.37$, $p=0.003$). The SIOOPEN soft tissue score showed no difference in relation to the aforementioned higher VMA levels, more advanced clinical stage and positive bone marrow assessment. There was no difference between the SIOOPEN skeletal and soft tissue scores on one hand and the histological tumour grade; elevated or normal levels of HVA, LDH, NSE and ferritin; and the presence or absence of MYNC amplification in the neuroblastoma cell line, on the other hand. The results of both SIOOPEN scores and the Curie score showed a high linear correlation at the first three examination time points, i.e. MIBG scans. (At the first scan ($n=75$): SIOOPEN soft tissue, $r = 0.696$; SIOOPEN skeletal, $r = 0.676$; at the second scan ($n=31$): SIOOPEN soft tissue, $r = 0.715$ SIOOPEN skeletal, $r = 0.47$ (all $p < .001$); at the third scan ($n=20$): SIOOPEN soft tissue, $r = 0.509$ ($p = 0.22$) SIOOPEN skeletal, $r = 0.656$ $p = 0.002$).

Patients with pathological urinary VMA levels had pathological urinary HVA levels in 85% cases. There was statistically significant correlation between VMA and HVA urinary levels (chi-quadrat = 15.7, $DF = 1$, $p < 0.001$). 31% of patients with elevated soft tissue SIOOPEN score had elevated skeletal SIOOPEN score which was proven statistically significant (chi-quadrat = 5.1, $DF = 1$, $p = 0.025$, $OR=4.0$). 70 % of patients with elevated skeletal SIOOPEN score had elevated soft tissue SIOOPEN score as well, which was proven statistically significant (chi-quadrat = 31.1, $DF = 1$, $p < 0.001$, $OR = 35.8$).

Conclusion: In conclusion the data from this study clearly demonstrated once more the reliability of the SIOOPEN scoring method in detecting skeletal involvement in patients with elevated VMA levels and bone marrow infiltration. The soft tissue segment of the SIOOPEN score needs further elucidation in a more controlled milieu. Excellent correlation between all parts of the two semi-quantitative scoring methods speak in favour of the application of the complete SIOOPEN scoring system in everyday mIBG scanning

KEY WORDS: *neuroblastoma, simpatico-adrenal scintigraphy, MIBG-J123, urinary catecholamines, tumour markers, MYCN amplification, semi-quantitative method, SIOOPEN, Curie*

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. NEUROBLASTOM: ISTORIJSKI PODACI, PREGLEDNA ETIOLOŠKA, KLINIČKA, DIJAGNOSTIČKA I TERAPIJSKA RAZMATRANJA	2
1.1.1. Istorijski podaci o neuroblastomu	2
1.1.2. Epidemiologija neuroblastoma	2
1.1.3. Etiologija neuroblastoma	3
1.1.4. Klinička slika neuroblastoma	4
1.1.5. Dijagnoza neuroblastoma	5
1.1.6. Histološke osobine neuroblastoma.....	6
1.1.7. Genetske osobine neuroblastoma.....	8
1.1.8. Makroskopske osobine neuroblastoma	8
1.1.9. „Stejdžing“ neuroblastoma	9
1.1.9.1. Klinički „stejdžing“ neuroblastoma	9
1.1.9.2. Stejdžing za procenu rizika INRGSS.....	10
1.1.9.3. Histološka INCP klasifikacija	10
1.1.10. Tumorski markeri u neuroblastomu	12
1.1.10.1. Vanilmandelična i homovanilinska kiselina	12
1.1.10.2. Neuron - specifična enolaza.....	15
1.1.10.3. Serumski feritin (s-feritin)	15
1.1.10.4. Laktat dehidrogenaza	15
1.1.10.5. Mijelogram - prisustvo neuroblasta u aspiratu koštane srži.....	16
1.1.11. Terapija neuroblastoma.....	16
1.1.12. „Skrining“ na neuroblastom.....	17
1.2. „Imidžing“ tehnike u dijagnostici i praćenu pacijenata sa neuroblastomom	18
1.2.1. Ultrazvuk	18
1.2.2. Kompjuterizovana tomografija	19
1.2.3. Magnetna rezonanca	19
1.2.4. Konvencionalna radiologija.....	20
1.2.5. Evaluacija primarnog tumora i loko-regionalnih metastaza drugim „imidžing“ tehnikama.....	20
1.3. Primena drugih nuklearnomedicinskih metoda u dijagnostici neuroblastoma.....	21
1.3.1. Nuklearnomedicinske metode sa pozitronskim emiterima.....	22
1.4. Scintigrafija neuroblastoma pomoću metajodobenzilguanidina (mIBG).....	23
1.4.1. Radiofarmak metajodobenzilguanidin	23

1.4.1.1. Istorijat	23
1.4.1.2. Sinteza neradioaktivnog („hladnog“) mIBG	24
1.4.1.3. Sinteza radioaktivnog mIBG.....	24
1.4.1.4. Mehanizmi nakupljanja mIBG	26
1.4.1.5. Farmakokinetika mIBG.....	26
1.4.1.6. Metabolizam mIBG.....	27
1.5. Interpretacija scintigrama u neuroblastomu	29
1.5.1. Semikvantitativna procena mIBG scintigrama.....	30
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
3. METOD RADA.....	33
3.1. Izbor ispitanika.....	33
3.2. Priprema ispitanika	34
3.3. Priprema radiofarmaka	34
3.4. Aplikacija radiofarmaka.....	34
3.5. Akvizicija	34
3.6. Interpretacija scintigrama (semi-kvantitativno bodovanje SIOPEN odnosno Kiri metodom)	35
3.7. Statistička analiza	38
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	39
4.1. Pol i uzrast bolesnika	39
4.2. Klinički stadijum bolesnika određivan na osnovu INSS kriterijuma	40
4.3. Histološki stadijum neuroblastoma određivan na osnovu INPC kriterijuma.....	41
4.4. „Biološke“ osobine neuroblastoma u ispitivanih bolesnika	41
4.5. Rezultati bodovanja planarnih simpatičko-adrenalnih scintigrama.....	46
4.6. Povezanost skorova SIOPEN semikvantitativnog bodovnog sistema sa „biološkim“ osobinama tumora.....	47
4.7. Povezanost skorova SIOPEN semikvantitativnog bodovnog sistema sa skorom Kiri semikvantitativnog bodovnog sistema	47
4.8. Povezanost urinarnih nivoa VMA i HVA u bolesnika.....	48

4.9. Međusobna povezanost mekotkivnog i oteomedularnog skora SIOPEN semikvantitativnog bodovnog sistema	48
5. DISKUSIJA	57
5.1. Pol i uzrast bolesnika	57
5.2. Klinički i histološki stadijum bolesti	58
5.2.1. Klinički stadijum određen na osnovu INSS kriterijuma	58
5.2.2. Histološki stadijum neuroblastoma određen na osnovu INPC kriterijuma	58
5.3. „Biološki markeri” tumora.....	59
5.4. Patološki nivoi urinarne VMA i HVA.....	59
5.5. Serumski nivo neuron specifične enolaze.....	60
5.6. Nivo serumskog feritina.....	61
5.7. Prisustvo ćelija neuroblastoma u bioptatu (aspiratu) koštane srži	61
5.8. Prisustvo povećanog broja kopija MYCN onkogeno u ćelijama neuroblastoma (umnoženost MYCN onkogeno)	62
5.9. Semikvantitativni bodovni sistemi u proceni scintigrama učinjenih pomoću mIBG	64
5.9.1. SIOPEN semikvantitativni bodovni sistem.....	64
6. OGRANIČENJA STUDIJE.....	66
7. ZAKLJUČNA RAZMATRANJA.....	67
8. ZAKLJUČCI	69
9. LITERATURA	70
10. SKRAĆENICE	79
11. BIOGRAFIJA.....	82

1. UVOD

Neuroblastom je najčešći ekstrakranijalni solidni tumor dečjeg uzrasta. To je najčešće dijagnostikovana maligna bolest ranog detinjstva. Neuroblastom je bolest simpatičko-adrenalne loze neuralnog grebena i može da se razvije bilo gde u simpatičkom nervnom sistemu. Najveći broj primarnih tumora nastaje u abdomenu (oko 65%), a najmanje polovina ovih tumora potiče iz srži nadbubrežne žlezde. Vrat, grudni koš i karlica su druga uobičajena mesta gde se javlja neuroblastom.

Dijagnoza ove bolesti se postavlja na osnovu nedvosmislenog nalaza ćelija neuroblasta u tumorskom tkivu pomoću svetlosnog mikroskopa (sa ili bez : imunohistohemijskog bojenja, nalaza elektronske mikroskopije, povećanih nivoa kateholamina u urinu ili krvi) ili nalazom neuroblasta u koštanoj srži i povećanog nivoa kateholamina u urinu ili krvi.

Neuroblastom pokazuje raznoliko biološko i kliničko ponašanje i najčešće se klasifikuje u 5 kliničkih stadijuma. Prognoza bolesti kao i terapija zavise od histoloških osobina tumora i uzrasta deteta.

Dijagnostički algoritam za neuroblastom uključuje biohemijske analizu krvi ili urina na metabolite kateholamina (VMA i HVA), tumorske markere NSE, LDH, feritin, genetsku analizu neuroblasta na prisustvo: umnoženog MYCN onkogeno, određenih hromozomskih aberacija, prisustvo tirozin-hidroksilaze, ultrazvučne, radiološke (CT, MR) i nuklearnomedicinske „imidžing“ tehnike.

Scintigrafija pomoću mIBG (kateholaminskog analoga) je obavezan dijagnostički postupak u neuroblastomu. Do sada je bilo više pokušaja semikvantifikovanja planarnog mIBG scintigram u cilju njegovog standardizovanja kao i u cilju procene obima bolesti u jednog pacijenta i među različitim pacijentima.

SIOPEN semikvantitativni bodovni sistem je najnoviji sistem bodovanja planarnog mIBG scintigrama čija je klinička evaluacija u toku.

Ova doktorska disertacija je nastala kao rezultat nastojanja da se u Centru za nuklearnu medicinu Kliničkog centra Srbije unapredi primena ove nuklearnomedicinske metode i doda deo u osnove radionuklidne terapije ne samo neuroblastoma već i drugih oboljenja simpatohromafinog tkiva.

1.1. NEUROBLASTOM: ISTORIJSKI PODACI, PREGLEDNA ETIOLOŠKA, KLINIČKA, DIJAGNOSTIČKA I TERAPIJSKA RAZMATRANJA

1.1.1. *Istorijski podaci o neuroblastomu*

Za ovaj zagonetni tumor se zna više od 140 godina. Prvi ga je opisao Viršov (Virchow) 1864. kod deteta sa tvrdinom u trbuhu i nazvao ga „gliom“.

1891. Maršo (Marchaud) je otkrio zajedničke osobine tumora simpatičkog nervnog sistema i tumora srži nadbubrežne žlezde, a 1901. Peper (Pepper) je opisao prenatalne metastaze sarkoma nadbubrežne žlezde u jetri sa otokom skrotuma, anemijom i učestalim groznicama. Danas je ova vrsta neuroblastoma poznata kao 4S neuroblastom, prototip tumora koji se spontano povlači.

Hačinson (Hutchison) 1907. godine, uočava karakteristične obostrane periokularne hematome praćene proptozom kao simptomom metastaze tumora u orbitu i skelet. Ove promene su tipične za progresivni neuroblastom, otporan na brojne terapijske pristupe.

Rajt (Right) 1910. godine uvodi termin neuroblastom, pošto je pokazao da tumor vodi poreklo od embrionalnih neuroblasta perifernog simpatičkog nervnog sistema.

Kušing (Cushing) i Volbah (Volbach) 1927. uočavaju da tumor spontano sazreva u ganglioneurom. Tek 1957. Mejson (Mason) ukazuje na metabolite kateholamina kao na tumorske markere neuroblastoma, a dve godine kasnije, vanilmandelična kiselina (VMA) dobija epitet glavnog tumorskog markera u neuroblastomu (1).

1.1.2. *Epidemiologija neuroblastoma*

Specifična stopa incidence i uzrasna standardizovana incidenca u Japanu, gde se od 1973. vodi rigorozna kontrola odojčadi na svaka 3 meseca, a za period od 1979-1983. (pre skrininga na neuroblastom), bliža je onoj u UK (Ujedinjeno Kraljevstvo) nego stopi incidence u drugim evropskim zemljama. U ovom periodu stopa incidence 3. i 4. kliničkog stadijuma je bila 71,9%. Ova cifra je opet bliža onoj dobijenoj na uzorku iz UK nego iz drugih evropskih zemalja (75,7% vs 62,9-65,4%) (2).

Međunarodna klasifikacija dečjih kancera (International Classification of Childhood Cancer (ICCC) je ustanovljena 1996. godine kao sredstvo za poređenje stope incidence i verovatnoće preživljavanja dece obolele od kancera. Na osnovu podataka ICCC-3 standardizacija po uzrastu je učinjena na osnovu World Standard Population Modified by Dell

et al. svi podaci se odnose na decu mlađu od 15 godina. Neuroblastom (i drugi tumori perifernih nervnih ćelija) je svrstan u IV grupu ICCC klasifikacije. Jednu četvrtinu svih malignih bolesti u dece čine embrionalni tumori (neuroblastom, retinoblastom, nefroblastom, meduloblastom, embrionalni rai-domiosarkom, tumori germinativnih ćelija).

Distribucija vrste tumora zavisi od uzrasta: trećina svih tumora kod odajčadi čini neuroblastom, a zajedno sa nefroblastomom, retinoblastomom ovaj tumor čini polovinu svih malignih tumora kod dece.

Neuroblastom je pored nefroblastoma najčešći ekstrakranijalni solidni tumor kod dece sa relativnom učestalošću od 7,6% po ICC-3 dijagnostičkim grupama; na osnovu SEER (US Surveillance Epidemiology and End Results) podataka oboljeva 61,3 dete na milion dece. Ovaj tumor ima najnižu medijanu uzrasta koja je pri postavljanju dijagnoze manja od 17 meseci (1,3 meseci). Prosečna godišnja promena procenta ove grupe tumora je 1,7%. Petogodišnje preživljavanje je 59% odnosno 66% po podacima iz „European Automated Childhood Cancer Information System“ (ACCIS) odnosno SEER (3).

Na osnovu podataka SEER NIC za period od 1975-2000., ukupna incidenca je 10.2 obolele na milion dece mlađe od 15 godina. Stopa incidence je na osnovu ovih podataka 10.3 obolelih na milion dečaka, odnosno 10.1 obolelih na milion devojčica; stopa incidence po rasama je sledeća: 10,8 za belu rasu, 8,4 za crnu decu i 7,5 drugih etničko/rasnih grupa. Uzrasna stopa incidence je 19.6 na milion dece uzrasta 1-4 godine; 2,9 za uzrast 5-9 godina i 0,7 za uzrast 10-14 godina. Stopa incidence kod odajčadi je nešto veća kod dečaka (62,8) nego kod devojčica (59,8).

Poboljšanja na polju dijagnostičkih procedura, prenatalne dijagnoze, zbog skrininga u nekim zemljama, dovela su do porasta incidence u periodu od sedamdesetih do ranih devedestih godina XX veka. Ipak, ukupan porast incidence po SEER podacima nije statistički značajan (0.3% je godišnja promena procenta (4, 5)).

1.1.3. Etiologija neuroblastoma

Jasni faktori rizika za nastanak i razvoj neuroblastoma nisu poznati. Do sada su ispitivani različiti faktori kao što je tok trudnoće, termin porođaja, gestaciona starost, telesna masa deteta na rođenju, udruženi nedostaci : neurofibromatoza tip 1, Hiršsprungova (Hirshsprung) bolest, Turnerov (Turner) sindrom; upotreba lekova i hormona u trudnoći („neuronski aktivni“ lekovi: amfetamin, antidepresivi, antipsihotici; miorelaksansi, antiemetici, antibiotici, diuretici), životni stilovi majke koji uključuju alkohol i pušenje, zanimanje oba roditelja {očevi koji su radili u elektronskoj industriji, koji su koristili električni materijal (monteri, zavarivači), poljoprivrednici, radnici koji su bili u proizvodnji gume, proizvodnji plastike i hemijskih sredstava kao i majke koje su bile tekstilne radnice, pa-

kovale prehrambene proizvode, ili su radile u industriji čarapa, plastičnih, električnih i metalnih proizvoda, su bili u većem riziku da rode dete sa neuroblastomom}(6).

1.1.4. Klinička slika neuroblastoma

Klinička slika neuroblastoma zavisi od mesta primarnog tumora (što može biti bilo koja simpatička ili parasimpatička ganglija), raširenosti njegovih metastaza i prisustva neoplastičnog sindroma. Retroperitoneum abdomena je najčešće primarno mesto tumora: nadbubrežna žlezda (35%), paravertebralni ganglioni vratne, grudne, trbušne kičme i kičme male karlice (35%), zadnji medijastinum (20%), mala karlica (u manje od 5%), vrat (manje od 5%), Cukerkandlov (Zuckerkanndl) organ: skupina hromafinih ćelija na bifurkaciji aorte ili na mestu gde izvire a. mesenterica inferior), ganglion stelatum na poprečnom nastavku 7.vratnog pršljena. Retko se dešava da se primarno mesto tumora ne otkrije. Sa napretkom dijagnostičkih „imidžing“ tehnika, posle 1980. godine, broj neotkrivenih primarnih neuroblastoma se smanjio sa 5% na 2% (7).

Neuroblastom metastazira putem krvi i limfe ali metastaski obrasci nisu uvek jasni. Razlika postoji između progresivnog 4. kliničkog stadijuma bolesti (po redu učestalosti javljanja metastaza: koštana srž, kost, limfni čvorovi, koža, intrakranijalno/mozak, pluća/pleura, paraterstikularno, jajnici) i spontano regresivnog 4S kliničkog stadijuma (koštana srž, jetra, koža i paratestikularno). Deca do godinu dana starosti u 4S kliničkom stadijumu po pravilu nemaju sekundarne depozite u kostima.

Sindromi koji se najčešće javljaju u neuroblastomu su:

- Peperov (Pepper) sindrom: masivna zahvaćenost jetre metastazama neuroblastoma koja može da dovede do poremećaja disanja.
- Hornerov (Horner) sindrom: ptoza, mioza, enoftalmus, istostrana anhidroza lica kod neuroblastoma primarno lokalizovanog u vratu i grudnom košu. Ovi simptomi se povlače sa hirurškom resekcijom tumora.
- Hačinsonov (Huchinson) sindrom: razdražljivost i slabost udova kod male dece zbog metastaza neuroblastoma u kostima i koštanoj srži.
- sindrom opsoklonus-mioklonus-ataksije {Kinsburnov sindrom (Kinsbourne)}: mioklonički trzaji udova i nevoljni pokreti očnih jabučica sa ili bez cerebelarne ataksije. Ovaj sindrom je često udružen sa diferencirajućim neuroblastomom povoljne prognoze. Ne povlači se obavezno sa resekcijom tumora i često ostavlja neuropsihološke sekvele. Ovaj paranesoplastični sindrom se viđa u 2-3% slučajeva, nepoznatog je mehanizma, a neuroblastom je uzrok u 50% dece sa ovim sindromom.

- Kerner-Morisonov (Kerner-Morrison) sindrom: uporni prolivi otporni na lečenje zbog povećane tumorske sekrecije vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP). Neuroblastom koji se klinički prezentuje ovim sindromom je povoljnog ishoda.
- sindrom neurokristopatije: neuroblastom udružen sa drugim poremećajima neuralnog grebena kao što su sindrom kongenitalne hipoventilacije i Hiršprungova (Hirshprung) bolest. Moguć uzrok je mutacija na PHOX2B genu (8).

Tumor se najčešće opipava u trbuhu. Novorođenčad mogu imati uvećan trbuh zbog prisutne tumorske mase ili zbog metastaza uvećane jetre. Tumor ima neobjašnjivu tendenciju da se širi u kosti lica, naročito u kosti orbite dajući periorbitalne ekhimoze („oči rakuna“), sa ili bez proptoze što je klasični znak hematogene diseminacije neuroblastoma. Pretpostavlja se da je ovo u vezi sa zajedničkim poreklom ćelija kosti lica i neuroblastoma iz neuralnog grebena.

Opšti simptomi i znaci kao što su bledilo, groznica, anemija, bolovi u kostima često podsećaju na leukemiju. Starija deca se mogu žaliti na bol u nogama i u zglobovima što ukazuje na artritis. Primarni tumori u vratu ili gornjem medijastinumu se obično otkrivaju pri rutinskom radiološkom pregledu grudnog koša. Tumori ove primarne lokalizacije se prikazuju i kao Hornerov sindrom.

Paravertebralni tumori se mogu proširiti preko kičmenih otvora ekstraduralno ka kičmenoj moždini („dumbbell“ , „bisagasti“ tumori) dajući neurološke simptome i znake zbog transverzne mijelopatije (1).

Veliki tumori trbuha i male karlice otežavaju ili sasvim opstruišu mokrenje i izazivaju hipertenziju zbog pritiska tumora na renalnu arteriju i sledstvenu aktivaciju renin-angiotezin sistema pre nego tumorska sekrecija kateholamina. Hemioterapija može da pogorša hipertenziju pre nego što se ova povuče.

Podkožni lividni čvorovi su naročito uočljivi kod neonatusa.

Neuroblastom se može uočiti i antenatalno ultrazvučnim pregledom trudnice.

1.1.5. Dijagnoza neuroblastoma

Dijagnoza neuroblastoma se postavlja na osnovu nedvosmislenog nalaza ćelija neuroblastoma u tumorskom isečku pomoću svetlosnog mikroskopa sa ili bez: imunohistohemiskog bojenja, nalaza elektronskim mikroskopom, povećanog nivoa katehlaminanu urinu (ili serumu) ili na osnovu nedvosmislenog nalaza ćelija neuroblastoma (tj. nalaz sincicijuma ili imunocitološki pozitivnih ćelijskih nakupina) u bioptatu koštane srži. Tumorski uzorci primarno dobijeni otvorenom biopsijom (tumorski isecci dobijeni pre bilo kakve terapijske intervencija) su najpovoljniji materijal za histološko ispitivanje i prognozu.

Diferencijalna dijagnoza se postavlja u odnosu na: druge periferne neuroblastne tumore (pNT), Juingov (Ewing) sarkom, rabdomiosarkom, dezmozoplastični tumor malih plavih okruglih ćelija, maligni non-Hodžkin (non-Hodgkin) limfom, hemoragiju u nadbubrežnoj žlezdi novorođenčeta, nefroblastom {Vilmsov (Wilms) tumor}, estesioneuroblastom (tumor porekla bazalnih progenitora olfaktornog epitela), feohromocitom, paragangliom, hemodektom koji potiče od parasimpatičke ganglije glave i vrata (2).

1.1.6. Histološke osobine neuroblastoma

Neuroblastom, kao jedan od perifernih neuroblastnih tumora, pripada neoplazmama „malih plavih okruglih ćelija“ dečjeg uzrasta. Ovi tumori nastaju od progenitorskih ćelija simpatičkog nervnog sistema, simpatogonija simpatičko-adrenalne loze. Pluripotentne simpatogonije posle migracije sa neuralnog grebena, formiraju simpatičke ganglije, hromafine ćelije srži nadbubrega, označavajući tipičnu lokalizaciju neuroblastnih tumora. Još uvek se na zna tačno zašto ove embrionalne ćelije, iz kojih se razvijaju primarni neuroblastni tumori, ostaju i u kasnijem razvoju organizma. Čini se da je u osnovi nekontrolisane proliferacije defekt u embrionskim genima koji kontrolišu razvoj neuralnog grebena. Zbog ovih defekata dolazi do ranog i poznog prekida u diferencijaciji neuroblasta. Klasični histološki subtipovi perifernih neuroblastnih tumora (pNT) kao što su neuroblastom, ganglioneuroblastom, ganglioneurom, odražavaju čitav spektar sazrevanja od tumora sa preovladavajućim nediferentovanim neuroblastima do tumora koji se uglavnom sastoje od sasvim diferentovanih neurona okruženih gustom stromom Švanovih (Schwan) ćelija(9, 10).

Glavna odlika neuroblastoma je raznovrsnost njegovih ćelija. Prisustvo fenotipski razlikih ćelija se može objasniti stalnom mutagenezom ili teorijom kancerske stem ćelije koja ima sposobnost beskonačnog samoobnavljanja. Ovakve stem ćelije ipak nije otkrivena u neuroblastomu te je moguće da stem ćelija neuroblastoma potiče iz stem ćelije neuralnog grebena i delom čuva, a delom prekida normalne puteve njenog sazrevanja.

Tipični neuroblastom je sazdan od malih ćelija jednoobrazne veličine koje sadrže gusto hiperhromatično jedro i bazofilnu svetlu citoplazmu. U 50% slučajeva viđaju se Homer-Rajtove (Homer-Wright) pseudorozete sastavljene od neuroblasta koji okružuju eozinofilna polja neuropila. Elektronskim mikroskopom se uočava gusto jezgro, membranom ograničene neurosekretorne granule, mikrofilamenti i paralelni redovi mikrotubula sa neuritičnim nastavcima (neutropili). Preciznije razlikovanje pNT od ostalih tumora malih plavih ćelija zahteva imunohistohemijsko bojenje na neuralne markere kao što su neuron specifična enolaza (NSE), neurofilamentni protein, gangliozid GD2, hromatogranin A, tirozin-hidroksilaza.

Neuralni greben je prolazna je prolazna ćelijska embrionalna struktura koja potiče od neuroektodermalne ploče neuralne cevi. Mnogi od ćelijskih fenotipova karakterističnih za neuralni greben kao što su neuroblastom, Švanove ćelije, perineuralne ili satelitske ćelije, melanociti prisutni su i u samom neuroblastomu. Ćelijska raznolikost i obim povezani su sa kliničkim tokom i koriste se za prognozu bolesti. Opisane su 3 zasebne feontipske varijante ćelije neuroblastoma.

Simpatičko-adrenalna (N-tip): ćelija neuroblasta liči na simpatoadrenoblast, malu okruglu neuroendokrinu prekursorsku ćeliju sa neuronskim nastavcima koji variraju po broju i dužini. Ćelije su međusobno čvrsto vezane i formiraju pseudoganglije. Ekspimiraju proteine za sinetzu, vezivanje i razgradnju naoradrenalina i acetilholina (dva glavna neurotransmitera perifernog nervnog sistema), opioidnih i holinergičkih receptora, nestin, sva tri proteina neurofilamenta, hromograanin A(CgA), sekretogranin S (Sg S).

Ekspresija onkoproteina koji je produkt MYCN onkogen je u vezi sa povećanom mitozom i dediferencijacijom neuroektodermalnih ćelija CNS. Ne-neuronske ćelije ne ekspimiraju ovaj onkoprotein čak ni u ćelijskim linijama sa povećanim kopijama MYCN gena. N-tip ćelije su tumorogenične.

S-tip („substrat adherent“) ćelije su čvrsto vezane za supstrat na kojem se odgajaju. Ove ćelije ispoljavaju kontaktnu inhibiciju rasta i ograničenog su trajanja u ćelijskoj kulturi. Biohemijske osobine s-tipa ćelija su raznovrsnije u odnosu na N-tip ćelije. Kod ovih ćelija su uočene osobine melanocita (tirozinaza, melanozomski glikoproteini i melanozomi), markeri Švanovih ćelija i ćelija glijе (hondroitin sulfat proteoglikan i velike količine laminina i fibronektina).

I-tip stem ćelije: pokazuje morfološke osobine i N i S tipa ćelija (kratke izdanke slične neuritima i gust rast što su osobine n-tipa ćelija), jaku atheziju za supstrat i ekstenzivno širenje kroz isti (osobine ćelija S-tipa). Ove ćelije ekspimiraju proteine oba puta diferencijacije: enzime noradrenergičke biosinteze, granine (CgA i Sg II) i proteine neurofilamenta neuroblasta kao i protein S ćelija, vimentin, EGF receptor i CD44. Ovo su jedinstvene neuroblastne ćelija zbog svoje sposobnosti samoobnavljanja i sposobnosti diferencijacije u oba pravca: u pravcu neuroblasta ili u pravcu glijalnih ćelija. Ćelije neuroblastoma I-tipa koje nemaju umnožen MYCN gen su tumorogenije nego N-tip neuroblasta koje imaju više od 150 MYCN kopija.

Sekundarne histološke osobine neuroblasta su nekroza, mitoze, hemoragije, fibroza, kalcifikacija, limfocitna infiltracija, i karioreksa (fragmentacija jedra u delove rasute po citoplazmi koja se javlja pri ćelijskoj smrt; nekad ju je teško razlikovati od mitoze u neuroblastu) (11).

1.1.7. Genetske osobine neuroblastoma

Glavna genetička obeležja su umnoženost (amplifikacija) MYCN onkogen, promenjena ploidija, parcijalna delecija kratkog kraka hromozoma 1(1p; prisutan u 25-30% neuroblastoma) i alelski gubitak na dugom kraku hromozoma 11 (11q; sreće se u 35-45% neuroblastoma) te dodavanje 1-3 dugih krakova hromozoma 17 kroz neravnotežnu translokaciju sa hromozom 1 ili 11 je takođe povezano sa agresivnijim fenotipom neuroblastoma (7, 8).

1965. godine su otkrivena sićušna hromatinska tela „double minutes“ (DM) u ćelijskim linijama neuroblastoma za koja se posle otkrića ćelijskih homologa retroviralnih onkogeno *c-onc* pokazalo da su zapravo umnoženi „amplifikovani“ bliski rođak MYC gena, pilećeg retrovirusnog onkogeno *c-onc*. MYCN kodira protein bHLH koji se nalazi u jedru i mora da se dimerizuje ne bi li se vezao za DNK. MYCN protein je odgovoran za tumorogenezu, rast tumora te se amplifikovani MYCN smatra „kliničkim debijem onkogeneze“.

Prvi okidači diferencijacije ili migracije ćelija iz neuralnog grebena su koštani morfogenetički proteini (BMPs: bone morphogenetic proteins). Geni: MASH 1, HES 1, MYCN, HIFK, iHUD, Phox2a, Phox2b i P73 su odgovorni za diferencijaciju u simpatički neuron, dok je za normalan razvoj nervnog sistema MYCN nezamenljiv. Svi ovi geni međusobno regulišu jedan drugi ne bi li se ćelija neuralnog grebena ispravno diferencirala u simpatički neuron. MYCN se prolazno eksprimira za vreme normalnog razvoja nervnog sistema definišući pravac neuronske diferencijacije (12)

MYCN onkogen je prisutan u povećanom broju kopija u oko 25% do 35% neuroblastoma. U 30% do 40% neuroblastoma 3. i 4. kliničkog stadijuma i u oko 5% 4S kliničkog stadijuma može da se nađe umnožen MYCN onkogen. Ovakvi tumori su veoma agresivnog toka i nepovoljnog ishoda kao posledica prekomerne ekspresije ovog onkoproteina koji napada telomerazu, biogenom ribozoma i sintezu proteina (7).

MYCN se određuje fluorescentnom in situ hibridizacijom (FISH). To je citogenetsko testiranje u interfazi ćelijske deobe pri čemu se vrši skrining, imidžing i brojanje prisutnih fluorescencija u citološkom uzorku posle bojenja specifičnih antigena ćelije neuroblastoma fluorohromom.

1.1.8. Makroskopske osobine neuroblastoma

Neuroblastički tumori mogu biti ograničeni ili infiltrativni, najčešće do 10 cm u dijаметru. Tumori koji polaze iz sredogruda ili nadbubrežne žlezde najčešće izgledaju kao da su inkapsulisani iako ni neuroblastom, ni ganglioneuroblastom, ni ganglioneurom nemaju pravu kapsulu. Neuroblastom je mekši od ganglioneuroblastoma i ganglioneuroma. Na tankom tumorskom isečku mogu se uočiti nekroza hemoragija i kalcifikacija. Hemora-

gični fokusi ili čvorovi su često neuroblastno tkivo. Prisustvo strome u različitom stepenu između, može da im da lobulirani izgled (8).

1.1.9. „Stejdžing“ neuroblastoma

1.1.9.1. Klinički „stejdžing“ neuroblastoma

Sinteza nekoliko „stejdžing“ sistema, na osnovu kojih se planirala terapija i koji su imali prognostički karakter {među njima se izdvajaju klasifikacija po COG (Children's Oncology Group), POG (Pediatric Oncology Group), American Cancer Tumour Node Metastases sistem} dovela je do Međunarodnog „stejdžing“ sistema za neuroblastom (INSS International Neuroblastoma Staging System). Po tom sistemu bolest se grupiše u 5 kliničkih stadijuma. Sistem je zasnovan na kliničkim, histološkim i hirurškim osobinama tumora (13).

- **Stadijum 1:** Lokalizovani potpuno resektabilni tumor (onaj koji može u celini da se ukloni, a da se ne uklone vitalni organi, ne ugroze veliki krvni sudovi ili unakazi pacijent) sa ili bez makroskopski rezidualnom bolešću; istostrani limfni čvorovi nisu mikroskopski infiltrisani. Limfni čvorovi koji su vezani za tumor i koji su uklonjeni zajedno s tumorom mogu biti pozitivni na neuroblastom.
- **Stadijum 2a:** Lokalizovani nepotpuno resektabilni tumor sa istostranim regionalnim limfnim čvorovima bez infiltracije ćelijama neuroblastoma.
- **Stadijum 2b:** Lokalizovani tumor nepotpuno resektabilan, sa regionalnim limfnim čvorovima infiltrisanim ćelijama neuroblastoma. Uvećani kontralateralni limfni čvorovi su mikroskopski bez neuroblastne infiltracije.
- **Stadijum 3:** Neresektabilni jednostrani tumor koji infiltriše strukture preko srednje linije (srednja linija je označena kičmenim stubom ; tumori koji polaze sa jedne strane i prelaze na drugu stranu moraju da infiltrišu ili kičmeni stub ili strukture s druge strane kičmenog stuba.) sa ili bez zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova; lokalizovani jednostarni tumor koji zahvata limfne čvorove suprotne strane ili grupa tumora u srednjoj liniji sa obostranim rastom u druge organe (neresektabilni tumori) bilo da zahvataju limfne čvorove ili ne.
- **Stadijum 4:** Bilo koji primarni tumor sa diseminacijom u udaljene limfne čvorove, kost, koštanu srž, jetru kožu ili druge organe (osim kako je definisano u stadijumu 4S)
- **Stadijum 4S:** Lokalizovani tumor kako je definisano u stadijumu 1, 2a i 2b sa diseminacijom u jetru, kožu, koštanu srž, kod dece mlađe od godinu dana. Zahvaćenost koštane srže treba da je minimalna, manja od 10% ukupno identifikovana

nih ćelija sa jedrom kao malignih u uzorku aspirata ili bioptata koštane srži. Ako je zahvaćenost koštane srži veća to je stadijum 4. mIBG scintigrafija bi trebalo da u 4S stadijumu bude negativna (1).

1.1.9.2. Stejdžing za procenu rizika INRGSS

Najnoviji „stejdžing“ sistem je INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System) Međunarodni stejdžing sistem za procenu rizika kod neuroblastoma.

L1- lokalizovani tumor koji ne zahvata vitalne strukture i ograničen je na jedan deo tela (vrat, grudni koš, trbuh ili malu karlicu)

L2- lokalni/regionalni tumor sa jednim ili više faktora rizika koji su određeni jednom od vizualizacionih metoda tj. zahvaćenost dva dela tela, obuhvaćenost velikih krvnih sudova, invazija okolnih organa ili intraspinalno širenje

M-tumor sa udaljenim metastazama

MS- pacijenti mlađi od 18 meseci sa metastazama u koži, jetri i/ili koštanoj srži.

INRG sistem služi da se na uniforman način definiše raširenost bolesti kada se dijagnoza postavlja pre hirurškog odstranjivanja tumora (1). Ovaj sistem je zasnovan na pristupu koji je predložilo Evropsko međunarodno društvo pedijatrijske onkološke grupe za neuroblastom {European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group (EISPONG)}, a koji je pokazao da su radiološke osobine primarnog tumora korisni prediktori uspešne i bezbedne hirurške terapije. Po INRG sistemu raširenost bolesti se određuje „imidžing“ tehnikama i nalazom u koštanoj srži. Kao granični uzet je uzrast od 18 meseci jer se na studiji od 3666 dece obolele od neuroblastoma pokazalo da je dotadašnji uzrast od 365 dana suviše niska tačka za granicu i da je uzrast između 15 i 18 meseci povoljnija granična tačka (7).

1.1.9.3. Histološka INCP klasifikacija

Još početkom XX veka su postojali pokušaji da se na osnovu histološke slike tumora predvidi tok i ishod bolesti. Počev od Vala (Wahl) 1914. koji je predložio „sazrevajući niz“, preko Bekvita (Beckwith) i Martina (Martin) koji su 1968. predložili gradiranje tumora na osnovu semikvantitativne procene odnosa neuroblastne i ganglijske ćelijske diferencijacije, sve do 1984. i klasifikacionog sistema koji je predstavio Šimada (Shimada), nije bilo sistema koji bi odgovarao onkolozima.

Šimadin sistem se zasniva na originalnom konceptu u kojem je uzrast povezan sa morfološkim indikacijama. Prvo su načinjeni okviri uzrasno odgovarajućih sazrevajućih sekvenci. Svaki sazrevajući niz je bio definisan sa dva morfološka indikatora: stepenom diferencijacije neuroblasta i stepenom razvoja Švanove strome. Pre ove studije, Švanova

stroma koja je glavni element simpatičke ganglije nije ozbiljnije istraživana u perifernim neuroblastnim tumorima. Na osnovu ovih kriterijuma tumori su podeljeni u povoljnu i nepovoljnu prognostičku grupu, tako da manje diferentovani tumori u dece mlađeg uzrasta treba da u dece starijeg uzrasta imaju morfološke osobine uznapredovalog sazrevanja. Šimada je uveo i koncept mitisko-karioreksnog indeksa na osnovu kojeg je Joši (Joshi) 1992. predložio gradaciju na osnovu stope mitoze: niska stopa mitoze je manje i jednako 10 mitoz na 10 polja, visoka stopa mitoze je preko 10 mitoz na 10 polja; i na osnovu odsustva i prisustva kalcifikacija. 1996. Joši (Yoshi) i saradnici modifikuju svoj sistem uvođeći mitotsko-karioreksni indeks MKI.

Koncept Bekvita (Beckwith) u Perina (Perrin) nastao na osnovu njihovog opažanja involucije i progresije adrenalne lezije mikroskopske veličine koja je identična tipičnom adrenalnom neuroblastomu (koji se kod dece javlja sa 50% većom incidencom), je iskorišćen za uspostavljanje Međunarodne patološke klasifikacije za neuroblastom. (International Neuroblastoma Pathology Classification, INPC). INPC razlikuje histološki nepovoljnu i povoljnu grupu pNT, a na osnovu uzrasnih opsega morfoloških karakteristika kao što je razvoj Švanove strome, stepena neuroblastne diferencijacije, i mitotsko-karioreksnog indeksa (7).

- neuroblastom (oskudne Švanove strome, sastavljen od neuroblastnih ćelija koje formiraju gnezda odeljena stromalnim septama bez ili sa ograničenom proliferacijom Švanovih ćelija. U ovoj kategoriji su tri podtipa: nediferentovani; slabo diferentovani (manje od 5% ćelija pokazuju diferencijaciju u okruženju od prepoznatljivih neutropila); diferencirajući (više od 5% ćelija pokazuju diferencijaciju ka ganglionskoj ćeliji u okruženju bogatom neutropilima)
- ganglioneuroblastom (mešani, bogat Švanovom stromom); sastoji se od jasno definisanih grupica neuroblasta, mikroskopske veličine, gde su neuroblasti pomešani ili nasumično razbacani po ganglioneuromatoznoj stromi. Grupice su sastavljene od neuroblasta različitog stepena diferencijacije, pri čemu prevladjuju diferencirajući neuroblasti i sazrevajuće ganglionske ćelije u neuropilskom okruženju.
- ganglioneurom (sa dominantnom Švanovom stromom) sa dva podtipa: sazrijevajući-sastavljen uglavnom od ganglioneuromatozne strome sa razbacanim grupama diferencirajućih neuroblasta ili sazrevajućih ganglijskih ćelija pored sasvim zrelih ganglionskih ćelija; zreli podtip: sastavljen od zrele Švanove strome i ganglijskih ćelija);
- nodularni ganglioneuroblastom („kompozitni“; zajedno područja stromom bogatog i stromom siromašnog tumora): prisutne su jasno vidljive obično hemoragični neuroblastni nodusi (siromašni stromom, agresivnog klona) uz mešani

ganglioneuroblastom (bogate strome) ili ganglioneurom (sa dominantnom stromom), oba porekla neagresivnog klonu. Ovaj tip tumora je sastavljen od biološki različitih klonova i zato nosi naziv „kompozitni“.

Postoji značajna povezanost između morfoloških osobina INPC i bioloških svojstava pNT kao što su umnoženost MYCN gena ekspresija gena TrkA (15, 16).

1.1.10. Tumorski markeri u neuroblastomu

Neuroblastoma je jedan od nekoliko dečjih tumora kod kojih tumorski markeri igraju važnu ulogu pri dijagnozi, u prognozi bolesti i praćenju bolesnika.

1.1.10.1. Vanilmandelična i homovanilinska kiselina

Metaboliti kateholamina (adrenalina, noradrenalina i dopamina), vanilmandelična kiselina (VMA) i homovanilinska kiselina (HVA) predstavljaju specifične i najsenzitivnije tumorske markere za neuroblastom (1, 17).

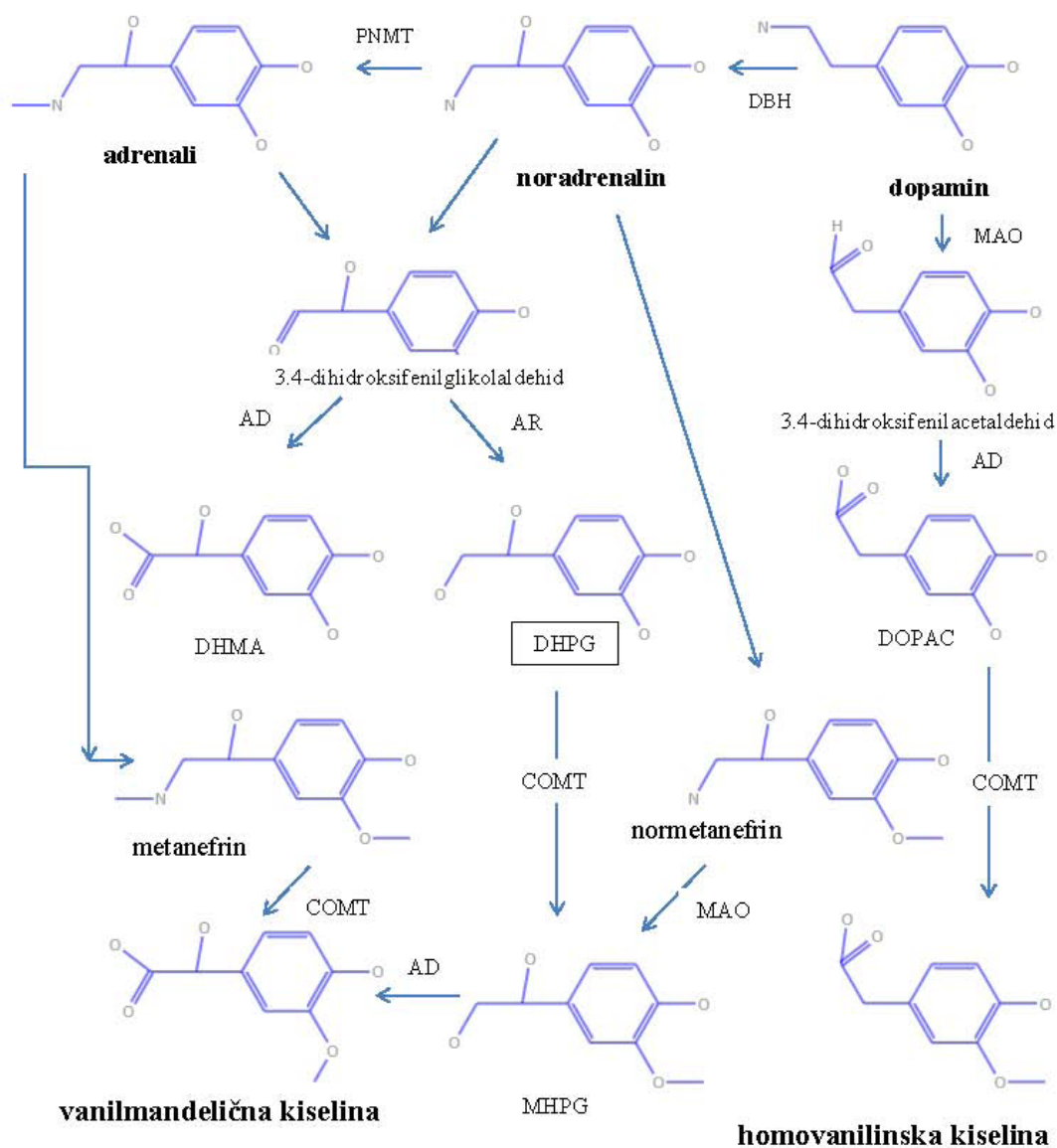
VMA u urinu je glavni krajnji proizvod metabolizma noradrenalina. Nastaje uglavnom oksidacijom 3-metoksi-4-hidroksifenilglikola (MHPG) koju katališe sekvencijalno dejstvo alkoholnih i aldehidnih dehidrogenaza. Najveći deo metabolisanja kateholamina se odigrava u u samoj ćeliji gde kateholamini i nastaju. Značajno je da se najveći deo ovog metabolizma dešava nezavisno od ekstracelularnog oslobađanja kateholamina i samo mala frakcija metabolita nastaje od cirkulišućih kateholamina. Kateholamini se uglavnom nalaze u sekretornim granulama i u dinamskoj su ravnoteži sa kateholaminima u okolnoj citoplazmi. Živ i brz aktivni transport kateholamina iz citoplazme u granule, posredovan transporterima monoamina, uravnotežuje pasivnu difuziju iz granula. Glavni izvor metabolita kateholamina je mala frakcija kateholamina u citoplazmi koja ne podleže sekvencijalnoj destrukciji u granulama. Monoaminoooksidaza (MAO) oksidiše dopamin u 3,4-dihidroksifenilacetaldehid (DOPAL), adrenalin i noradrenalin u 3,4-dihidroksifenilglikolaldehid (DOPEGAL). Ovi aldehidni metaboliti su kratkoživeći intermedijarni proizvodi koji se u drugom koraku uz grupu aldehid i aldoza-reduktaza prelaze u stabilne alkohole i deaminirane kiseline. U simpatičkim neuronima se DOPEGAL uglavnom uz dejstvo aldoza-reduktaze (AR) redukuje u 3,4-dihidroksifenilglikol (DHPG) kojeg katehol-o-metiltransferaza (COMT) prevodi u 3-metoksi-4-hidroksifenilglikol (MHPG). Alkohol-dehidrogenaza (ADH) prevodi MHPG u 3-metoksi-4-hidroksifenilglikolaldehid (MOPEGAL). Aldehid-reduktaza ili aldoza-reduktaza konačno prevodi MOPEGAL u VMA.

Glavni metabolit noradrenalina je MHPG nastao predominantno o-metilacijom DHPG što je Labros (LaBross) još 1970. godine pretpostavio proučavajući decu obolelu od neuroblastoma. Stoga, najveći deo VMA (94%) nastaje oksidacijom cirkulišućeg MHPG u

jetri uz pomoć alkohol-dehidrogenaze koje najviše ima u jetri. Jetra praktično svu količinu kateholamina preradi u VMA ostavljajući samo mali deo u odvodni venski sistem. 87% ovako nastalog VMA u jetri potiče od cirkulišućih MHPG i DHPG, 11% od noradrenalina, a manje od 2 % od normetanefrina i metanefrina (18).

Sve se ovo najvećim delom dešava u citoplazmi iste ćelije u kojoj se kateholamini i sintetišu i spontano difunduju u citoplazmu iz sekretornih granula čiji transporter monoamina živo preuzima ponovo u granule oko 90% ovih difundovanih kateholamina. Svega 30% noradrenalina iz simpatičkih ćelija je podložno metabolizmu do VMA.

Glavni krajnji proizvod metabolizma dopamina je homovanilska kiselina(HVA) koja se izlučuje urinom skoro 2 puta više nego VMA. Za razliku od VMA, najveći deo HVA se proizvodi van jetre, o-metilacijom 3,4-dihidroksifenilacetične kiseline (DOPAC) ili oksidativnom deaminacijom metoksitiramina. Ovaj dopamin potiče uglavnom iz srži nadbubrega, mozga i mezenteričkih organa (19).



Slika 1. Sinteza VMA i HVA

1.1.10.1.1. Laboratorijski testovi za VMA i HVA

Za testiranje VMA u urinu najpre se koristi „spot test“ ili Labrosa test koji se zasniva na reakciji urina na filter papiru sa tečnim reagensom, elektrofilnim diazotovanim paranitroanilinom pri čemu se razvija ružičasta boja. Primer spot testa: mešavina paranitroanilina 25%, natrijum nitrata 25%, kalijum karbonata 50% se ukapa na filterpapir natopljen urinom odojčeta; pojava plave boje kroz sat vremena je pozitivan nalaz, a negativan nalaz je ako se boja ne promeni. Lažno pozitivne reakcije ovog testa su moguće u prisustvu gvajakola, metoksihidroksibenzilalkohola, vanilne kiseline.

Hromatografija na tankom sloju (TLC) je u prednosti nad spot testom jer istovremeno detektuje i prisustvo i nivo HVA u urinu. Senzitivnost ovog testa je ispod 1% lažno negativnih rezultata.

Tečna hromatografija visoke performanse (pod visokim pritiskom) HPLC: uzorak urina dobijen sa filter-papira (natopljen u okvašenu pelenu odojčeta napr.) se unese u mobilnu fazu koja sadrži tartaratni bufer i acetonitril, a koja se propušta kroz kolonu od nerđajućeg čelika obloženu gelom pod temperaturom od 40°C) VMA se od HVA razdvaja na osnovu različitog vremena zadržavanja 3,7 min odnosno 12,3min). Ova metoda detekcije metabolita kateholamina ima specifičnost od 100% i senzitivnost 92% (20).

Zlatni standard za detekciju VMA i HVA je gasna hromatografija-masena spektroskopija (GC-MS). U ovoj metodi gasni hromatograf i maseni spektrometar su povezani inetrfejsom. Kod GC mobilna faza je gas (gas nosač: helijum, vodonik ili azot) u kojoj mikrošpicom unet uzorak se propušta kroz kolonu od staljenog silicijum-dioksida. Masa testiranih supstanci se određuje pošto njihovi jonizovani blaci proizvedu električni signal u osciloskopu ili drugom detektorskom uređaju.

1.1.10.2. Neuron - specifična enolaza

Enolaza (2-fosfo-D- hidrolaza ili fosfopiruvat hidrataza EC 4. 2. 1.11) je glikolitički enzim koji se javlja kao serija dimernih izoenzima ($\alpha\alpha$, $\alpha\gamma$, $\gamma\gamma$). γ izomer je poznat kao neuron specifična enolaza (NSE) koju proizvode neuroni i neuroendokrine ćelije. Nivou NSE u neuroblastomu mogu biti povećani i imaju prognostički karakter. Koristi se i kao imunohistohemijski marker, a može biti povećan i u drugim dečjim tumorima kao što su Vilmsov tumor, Juingov sarkom, non-Hodžkinov limfom ili tumorima neuroendokrinog porekla (karcinoidi, feohromocitom, small-cell karcinom pluća) (21).

1.1.10.3. Serumski feritin (s-feritin)

Feritin je ubikvitarni intracelularni protein sastavljen od 24 subjedinice i glavni je protein koji vezuje gvožđe u tkivu. Ćelije neuroblastoma proizvode feritin koji je glikoliziran i biohemijski različit od feritina kojeg luče normalne ćelije. Primećeno je da je povećan samo kod dece u 4 stadijumu neuroblastoma sa lošom prognozom. To je moćan marker kad se postavlja dijagnoza ali je nepouzdan za praćenje toka bolesti (22).

1.1.10.4. Laktat dehidrogenaza

Laktat-dehidrogenaza je enzim koji katališe konverziju laktata u piruvat. Kao tumorski marker nije tumor specifičan. Pokazalo se da su serumski nivou LDH kod najvećeg broja dece sa lokoregionalnim neuroblastomom, normalni. Može biti koristan u praćenju toka bolesti kod dece u 4., visoko-rizičnom stadijumu bolesti, pošto odslikava brz ćelijski „turnover“ i veličinu tumorskog prisustva bez obzira na masu lokoregionalnog tumora (23).

Drugi tumorski markeri koji bi mogli biti od koristi u evaluaciji dece obolele od neuroblastoma su hromogranin A i neuropeptid Y.

1.1.10.5. Mijelogram - prisustvo neuroblasta u aspiratu koštane srži

Jedan od najupečatljivijih obeležja agresivne visoko-rizične bolesti kod dece sa neuroblastomom je diseminacija bolesti u koštanoj srži. Precizna detekcija bolesti je od osnovne važnosti za stejdžing dece pri postavljanju dijagnoze jer određuje vrestu početne terapije. INRGSS koji je zasnovan na kliničkoj slici i nalazu „imidžing“ tehnika, definiše infiltraciju koštane srži sa 10% ćelija neuroblastoma kao kritično prisustvo ćelija tumora u koštanoj srži koje pravi razliku između dece u stadijum M i stadijumu MS. Prisustvo ćelija neuroblastoma u aspiratu koštane srži, u perifernoj srži i u razmazu periferne krvi služi za precizno definisanje minimalne bolesti i minimalne rezidualne bolesti (25).

1.1.11. Terapija neuroblastoma

Terapijski postupci koji se koriste kod dece obolele od neuroblastoma uključuju hiruršku resekciju, hemioterapiju, radioterapiju, radionuklidnu terapiju kao i samo praćenje u brižljivo selektovanih pacijenata.

COG (Children's Oncology Group) na osnovu diploidije i nepovoljnog histološkog stadijuma svrstava decu u grupe niskog, intermedijarnog i visokog rizika.

Deca iz prvog INSS stadijuma imaju odlično preživljavanje tako da je kod njih dovoljna hirurška resekcija.

Kod dece intermedijarnog rizika (u kojoj se nalaze deca sa različitim biološkim oblicima neuroblastoma) hiruršku terapiju prati hemioterapija sa više agenasa umerenih doza.

Deca obolela od neuroblastoma visokog rizika obično reaguju na hemioterapiju ali svega njih 30% do 40% ima dugoročno preživljavanje uprkos ukupnom poboljšanju terapijskog ishoda. Standardna terapija za ovu decu uključuje :

- indukcionu hemioterapiju terapiju: kombinaciju antraciklina, alkilatora, jedinjenja platine i inhibitora topoizomerase II
- lokalnu kontrolu: kombinaciju masivne hirurške resekcije i radiološko zračenje primarnog tumora bez obzira na uspeh hemioterapiju. Neuroblastom je radio najsenzitivniji dečji tumor te se daje ukupna doza od 2160 cGy (180cGy/dan) čime se smanjuje rizik od lokalnog recidiva.

- mijeloablativnu konsolidaciju: autologu transplantaciju koštane srži očišćenim krvnim elementima. Neuroblastom je jedan od retkih tumora kod kojih ova terapija smanjuje recidiv
- lečenje minimalne rezidualne bolesti (rezistentnih mikroskopskih klonova neuroblasta) biološkim agensima kao što su cis-retinoična kiselina, fenretidin, antiGD2 monoklonska antitela, imunocitokini, inhibitori gena tirozin-kinaze malih molekula ili inhibitori histon deacetilaze (24).

4S je klinički entitet koji se karakteriše naizmeničnom pojavom i povlačenjem kliničke slike bez obzira na primenjenu terapiju (hiruršku, hemioterapiju i/ili radijacionu terapiju). Nije uvek moguće sasvim jasno razlikovati ovaj stadijum u odnosu na 4. klinički stadijum. Kod najvećeg broja odojčadi ovaj se tumor spontano povuče tako da se više ne preporučuje hirurško odstranjivanje primarnog tumora. Ipak, neki tumori iako označeni kao tumori nikog rizika zbog odsustva MYCN amplifikacije i hiperploidije, sa povoljnom histološkom slikom, mogu da dovedu do stanja koja ugrožavaju život kao što su kardio-pulmonalne komplikacije ili koagulopatije zbog metastaza u jetri. Ovo hitno medicinsko stanje se leči primenom 1 do 2 frakcije radijacione terapije u dozi do 150cGy po frakciji. Dalja primena hemioterapije nije neophodna jer će se tumor spontano povući (1).

1.1.12. „Skrining“ na neuroblastom

Skrining na neuroblastom se pojavio osamdesetih godina prošlog veka, kada je detekcija kateholamina tumorskog porekla u urinu, postala lako dostupna. Studija sprovedena u Japanu „spot“ testom detekcije VMA u urinu je pokazala da se neuroblastom može detektovati skriningom šestomesečnih odojčadi, a ovakvo rano otkrivanje dovelo je do dužeg preživljavanja obolele dece. U to vreme cena je bila 50 do 80 centi po testu. Skrining programi sprovedeni u Evropi i severnoj Americi (severna Engleska, Nemačka, Francuska, Austrija, Kvebek, Minesota), s druge strane nisu smanjili smrtnost od neuroblastoma. Od 1987. skrining se sprovodi pomoću nove metode: tečne hromatografije visokih performansi (pod visokim pritiskom) (high-performance liquid chromatography-HPLC). Danas su u upotrebi i druge tehnike testova: ELISA imuno-esej i kao zlatni standard gasna hromatografija-masena spektroskopija (GC-MS). Prema cost benefit studijama screening programi na nivou države su isplativi jer otkrivaju bolest u nižem stadijumu bolesti što pojednostavljuje i pojeftinjuje liječenje te skrining programe s tog aspekta čini vrlo primamljivim. Uvođenjem screeninga na neuroblastom povećao se broj bolesnika u 1, 2. i 4S stadijumu, ali nije opažen pad u 3. i 4. stadijumu bolesti. Skrining nije kako se očekivalo doveo do pada smrtnosti od neuroblastoma. Ranim otkrivanjem se prema procenama otkrije najmanje 50% tumora koje bi se vremenom spontano povukli. Studija u Kvebeku se pokazala psihološki vrlo stresnom jer je dovela do toga da roditelji dece koji su imali lažno

pozitivne skrining rezultate, godinama posle testiranja budu zabrinuti za svoju decu bez realnog osnova. Tokom 2004. obustavljeni svi do tada vođeni skrining programi (u Japanu je skrining obustavljen marta 2004) (25, 26).

1.2. „Imidžing“ tehnike u dijagnostici i praćenu pacijenata sa neuroblastomom

1.2.1. Ultrazvuk

Pregled ultrazvukom je najčešće korišćena tehnika u „skriningu“ oboljenja u trbuhu i maloj karlici kod dece. To je pregled „prve linije“ u eksploraciji tumorske mase u trbuhu. Prednost ovakvog ispitivanja je što se dešava u realnom vremenu i ne zahteva bilo kakvu premedikaciju. Neinvazivni karakter dozvoljava da se ultrazvućni pregled više puta ponavlja tokom lećenja i praćenja deteta obolelog od neuroblastoma, naroćito posle hemioterapije jer ne nosi rizik od ozraćivanja i nije potrebna sedacija malog pacijenta. Njime se otkriva mesto primarnog tumora, obuhvaćenost velikih krvnih sudova, metastaze u jetri. Kalcifikacije u tumoru se pri ovom pregledu prikazuju kao fokusi povećane ehogenosti. Neuroblastom pri ultrazvućnom pregledu izgleda kao hiperehogeno tkivo koje ponekad sadrži punktififormne zone ćija ehogenost manje ili više odgovara hiperehogenosti kalcifikata. Aorta i donja šuplja vena su većom retroperitonelnom masom, obićno izmešteni prema napred. Dopler moćže da se koristi da bi se procenio protok u krvnim sudovima komprimovanim tumorskom masom. Raširenost neuroblastoma se ne moćže procenti ultrazvućnim pregledom.

Ivice neuroblastoma su slabo definisane pa se kapsula ili pseudokapsula (hiperhogeno oivićenost) ne prikazuje. Najveći deo tumora je ehogenosti solidne mase ili mešane ehogenosti (heteroehogenosti). Ćesto se vide kalcifikati ili anehogene „cistićne“ zone. Razlog za hiperehogene zone u neuroblastomu još nije dovoljno poznat ali se pripisuje poljima kalcifikata, hemoragije i nekroze. Anehogene zone se mogu objasniti likvifikovanoj krvi i nekrotićnom debriju.

Sonografski lobul je još jedna karakteristika specifićna za neuroblastom.

Sa pojavom rutinske prenatalne dijagnostike ućestalo je otkrivanje fetalnog ili prenatalnog neuroblastoma (27, 28).

1.2.2. Kompjuterizovana tomografija

Kompjuterizovana tomografija (CT) se koristi za procenu primarnog tumora, koštanih metastaza i metastaza u kranio-orbitnoj regiji. „Multislajсни“ skener, preporučenih preseka od 5mm do 6mm omogućava da se dobije opacifikacija kvaliteta krvnog suda za procenu verteksa. Opacifikacija digestivnog trakta je nezamenljiva u eksploraciji male karlice i trbuha. Prvi CT u nizu se radi bez kontrasta ne bi li se uočile kalcifikacije u tumoru. Pregled glave se radi sa kontrastom da bi se detktovale epiduralno širenje tumora. CT kostiju je obično finijih preseka 1mm-2mm visoke rezolucije sa tvrdim filtrom. U 79% slučajeva na CT se neuroblastom prikazuje kao lobulirana tkivna masa sa nepravilnim i finim kalcifikacijam sa ili bez loko-regionalne adenopatije, koja je lako uočljivija pri upotrebi kontrasta. Metastaze lobanje su raznovrsne i moraju se otkriti: prikazuju se kao heterogena osteoliza baze ili krova lobanje.

CT pregled se izvodi relativno brzo te se kalcifikati u neuroblastomu lako otkrivaju. CT lobanje i orbita treba uraditi kod svakog pacijenta sa sumnjom na zahvaćenost kostiju lobanje. Za CT abdomena neophodno je punjenje kontrastom i dodatno poboljšanje slike i.v. kontrastom. CT ne može da proceni zahvaćenost koštane srži te je ova imidžing tehnika neadekvatna za procenu epiduralnih lezija. Kod malih pacijenata nedostatak intraperitonealnog masnog tkiva onemogućuje optimalnu procenu raširenosti bolesti ovom tehnikom. Mlađu decu je potrebno uvesti u opštu anesteziju pri čemu se zahvaćenost pluća neuroblastomom teško može razlikovati od atelektaze.

CT se pored svega ovoga ne može pouzdano koristiti za procenu terapijskog odgovora kod koštane zahvaćenosti tumorom jer koštane promene mogu da perzistiraju mesecima pa i godinama. Ako se vide periostna reakcija i zahvaćenost mekog tkiva, CT je dovoljna pouzdana metoda za njihovo otkrivanje. Ne treba zaboraviti ni zračenje koje pacijent primi u toku CT pregleda (28).

1.2.3. Magnetna rezonanca

Mnogi istraživači smatraju tehniku magnetne rezonance (MR) za imidžing tehniku izbora u inicijalnoj evaluaciji neuroblastoma. Značajne prednosti MR u odnosu na CT su : odsustvo jonizujućeg zračenja, sposobnost procene zahvaćenosti kičmenih otvora i epiduralno širenje kao i mogućnost da otkrije koštanu srž zahvaćenu tumorom. Pregled pomoću MR je idealan za preciznu procenu raširenosti neuroblastoma u skeletu jer razdvaja kortikalnu kost od koštane srži. Mogućnost da brzo detektuje zahvaćenost jetre, bubrega i trbušnih organa naročito dolazi do izražaja u slučaju desnostrane tumorske mase gde se odnosi među organima teško mogu sagledati pomoću CT. Dodatne informacije se postižu upotrebom gadolinijumskog kontrasta. Za MR nalaz u neuroblastomu je karakterističan nalaz

produženog T1 i T2 relaksacionih vremena gde je T1 heterogeno snižen, a T2 povećan. Kalcifikacije koje se na CT vrlo jasno raspoznaju na MR slici se prikazuju kao zone u kojima nema signala (28, 29).

1.2.4. Konvencionalna radiologija

Semiologija neuroblastoma u suštini zavisi od topografije. Po radiografskim standardima neuroblastom se prikazuje u tonalitetu (denzitetu) tečnosti sa nepravilnim finim kalcifikacijama rasejanim duž paravertebralnih linija (naročito kod torakalnog i abdominalnog ishodišta neuroblastoma) sa koštanim promenama koje su povezana sa intraarahnoidalnom i proširenošću timora u kičmene otvore (talasasto habanje kičmenih pršljenova, razređivanje posteriornih transverzalnih nastavaka, razmicanje fasetnog zgloba). Radiografski znaci diseminacije neuroblastoma u kosti su deminearalizacija, trakaste svetline sekundarnih depozita, fokalna osteoliza, diastaza razmicanje sutura kod epoduralnih metastaza lobanje). Kod torakalnog neuroblastoma senzitivnost konvencionalne radiografije se približava 100%, dok kod abdominalnog neuroblastoma jedva dostiže 38%. Intravenska urografija nema mesto u dijagnostičkom algoritmu za neuroblastom (28).

1.2.5. Evaluacija primarnog tumora i loko-regionalnih metastaza drugim „imidžing“ tehnikama

Nivo vrata: najbolji rezultati se postižu upotrebom MR koja daje uvid u krvne sudove i može da isključi intrakanalno širenje bolesti bolje od UZ ili CT.

Na **nivou toraksa** MR je opet najbolja imidžing tehnika jer jasno oslikava odnose između tumorske mase, velikih otvora i kičmene moždine. Savetuje se da se za procenu intraarahnoidalnog širenja prvo načini sagitalni pa frontalni preseki jer se tako na jednom mestu vide svi kičmeni otvori. Transverzalne preseke treba načiniti na nivou intrakranijalnog širenja tumora. Ako se ne izvodi pregled pomoću MR onda nalaz treba dopuniti pregledom pomoću spiralnog CT.

Za **nivo abdomena** tehnika izbora je pregled pomoću spiralnog CT. Njime se vide fine tumorske kalcifikacije koje su ponekad udaljene od primarnog tumora koje se ultrazvučnim pregledom, kao i pregledom pomoću MR, previde. UZ tehnikom se ne mogu sagledati ivice velikih tumora koji prevazilaze veličinu sonde, kod posteriorne propagacije tumora, ili u slučaju kalcifikacije tumora posle lečenja.

Kod lokalizovanog neuroblastoma neophodno je napraviti preoperativni pregled pomoću CT zbog tačne prokrvljenosti tumora (procenjuje se doplerom) i perciznog uvida u odnose sa okolnim organima.

Na **nivou male karlice** pregled pomoću MR je bolji od CT, naročito za presakralnu regiju zbog boljeg uvida u širenje tumora u sakrumske otvore.

1.3. Primena drugih nuklearnomedicinskih metoda u dijagnostici neuroblastoma

Nuklearnomedicinske metode imaju značajno mesto postavljanju dijagnoze, „stejdžingu“ neuroblastoma i u evaluaciji terapijskog odgovora.

Scintigrafija skeleta pomoću **tehnecijumom obeleženih difosfonata** (Tc99m-[MDP; HMDP; HEDP; DPD;]) je dugo imala važnu ulogu u evaluaciji metastaza neuroblastoma u kortikalnoj kosti i koštanoj srži. Scintigrafija odslikava reakciju zdrave kosti na prisustvo tumorskog tkiva. 40% do 85% primarnih neuroblastoma vezuje ove radiofarmake zbog prisustva kalcifikata. Ova nuklearnomedicinska metoda je “nemoćna” u proceni metafiznih zona koštanog rasta u koje zone neuroblastom pretežno metastazira (30).

Analozi **somatostatinskih receptora** [I123-tyr3-oktreotid; In111-DTPA-oktreotid; In111-DOTA-oktreotid (DOTA: tetra-aza-ciklododekan-N',N'',N'''-tetraacetat) su takođe testirani kod simpatiko-adrenalnih tumora. In111- pentetretid je od svih navedenih najviše u kliničkoj upotrebi. Oktretid je peptid od 8 aminokiselina koji se specifično vezuje za somatostatinske receptore. Neuroblastom pored SSTR3, najviše eksprimira SSTR2 i to najčešće ako je tumor triploidnog genoma. Poređenja sa mIBG scintigrafijom su pokazala da je mIBG superiorniji u odnosu na SSTR scintigrafiju i da deca sa neuroblastomom koji eksprimira SSTR imaju kumulativno duže preživljavanje te bi ova scintigrafija mogla imati više prognostički značaj. Ovo je tehnika drugog izbora za scintigrafiju neuroblastoma naročito u slučaju mIBG negativnih ili lažno pozitivnih mIBG nalaza (31).

Tc99m MIBI (metoksiizobenzil izonitril) je ispitivan u stejdžingu i za procenu upsešnosti terapije kod visoko-rizičnih neuroblastoma. Pozitivan nalaz u MIBI scintigrafiji, bez značaja u stejdžingu neuroblastoma, bio je povezan sa lošim ishodom bolesti bez obzira na mIBG nalaz.

Radioimunodetekcija neuroblastoma je prvi put izvedena 1980. godine uz pomoć J131-UJ13, monoklonskog antitela IgG1 koji se vezuje za NCAM antigen neuroektodermalnog tkiva. Nedostatak ovakve scintigrafije je veliki broj lažno negativnih nalaza i nespecifično nakupljanje u jetri.

Scintigrafija pomoću antiGD2 IgG1 antitela ima kao i mIBG scintigrafija 100% specifičnost u metastaskoj bolesti i ukazuje na kompletnu postterapijsku remisiju mnogo pre nego mIBG scintigrafija. Testirana su i druga antitela u radioimunoscintigrafiji neuroblastoma

ma: Tc99m-ch14.18 (himerička antiGD2 IgG2a antitela; J131-3F8 (antiGD2 IgG3 antitela); chCEM (himerička IgG1 monoklonska antitela koja se vezuju za L1 molekul ćelijske adhezije L1-CAM. Uprkos povećanoj senzitivnosti pri imunoscintigrafiji neuroblastoma, ovaj način detekcije tumora je ostao u istraživačkim okvirima zbog zametnog postupka obeležavanja antitela (32).

1.3.1. Nuklearnomedicinske metode sa pozitronskim emiterima

FDG-F18 PET (pozitronska emisiona tomografija pomoću F18-fluorodeoksiglukoze) je tomografska tehnika koja prikazuje trodimenzionalnu distribuciju radioaktivnosti na osnovu anihilacionih fotona koje emituju pozitronski emiteri. Najčeće korišćen pozitronski radiofarmak je F18-fluorodeoksiglukoza analog glukoze. Najveći deo malignih tumora pokazuje povećanu potrošnju glukoze što je delom povezano sa prevelikom ekspresijom GLUT-1 glukoznog transportera. Ova tehnika je korisna kod mIBG negativnih neuroblastomskih lezija ali se njena efikasnost značajno smanjuje posle primene radioterapije ili hemioterapije. Lažno pozitivno nakupljanje FDG je primećeno u koštanoj srži (33).

C11-hidroksiefedrin (C11-HED) se brzo i značajno nakuplja u neuroblastomu i zahvajući svojoj metil grupi u alfa položaju. Ne metabolišu ga monoaminooksidaze te ostaje u citosolu bez skladištenja u vezikule. Prednosti ovog radifarmaka u odnosu na mIBG su kratko vreme (do pola sata posle i.v. aplikacije) u kojem se studija završi (kod mIBG se studija izvodi najmanje 24 sata posle aplikacije radiofarmaka), bolja rezolutivna moć PET tehnologije u odnosu na SPECT i mogućnost kvantifikovanja nakupljanja radiofarmaka u tumoru. Kratak poluživot C11 (20,3 minuta), cena radiofarmaka i dostupnost su glavni nedostaci ove vrste ispitivanja (34).

J124-mIBG je u I/II fazi ispitivanja u kojem poredi J-124mIBG sa J-123mIBG u metastazom neuroblastomu (35).

Drugi radiofarmaci sa radionuklidima pozitronskim emiterima kao što su F18-mFBG(-metafluorobenzilgvanidin) C11-EPI (epinefrin), F18-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin), F18-fluorotimidin, F18-dopamin obećavaju kao radiofarmaci pri evaluaciji neuroblastoma (36, 37).

18F-FPBG PET/CT (fluoropropilbenzilgvanidin (FPBG) obećava u primeni kod obolele dece sa mIBG negativnim lezijama (38).

1.4. Scintigrafija neuroblastoma pomoću metajodobenzilguanidina (mIBG)

1.4.1. Radiofarmak metajodobenzilguanidin

Metajodobenzilguanidin obelež radioaktivnim jodom je prvi sintetisao Dr Donald Vilend (Wielend) sa sardanicima na Medicinskom fakultetu An Arbor Univerziteta u Mičigenu sedamdestetih godina prošlog veka kao sredstvo za dijagnostiku srži nadbubrežne žlezde.

FDA (Food and Drug Administration) je 1994. odobrila mIBG-J-131, poznat i kao intravenozni jodobenzilguanidin-J-131, kao agens za vizualizaciju i lokalizaciju feohromocitoma i neuroblastoma. FDA je 2004. godine odobrila i mIBG-J-123 injekciju za imidžing tumora (komercijalni preparat je Adreview; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). U Evropi i Japanu oba ova radiofarmaka su odobrena znatno ranije.

1984. je prvi put saopšteno o upotrebi mIBG-J-131 u eksperimentalnom lečenju metastatskog feohromocitoma.

Komercijalni preparat mIBG-J-131 /123 se dobija jonoizmenjivačkom reakcijom i sadrži veliki udeo neobeleženog mIBG („hladni nosač“). Pokazalo se da preko 99% molekula mIBG u komercijalnim proizvodima nisu bili obeležene radionuklidom. Pošto ovi „hladni“ molekuli kompetitivno inhibiraju preuzimanje obeleženog mIBG, sintetisani su savršeni proizvodi koji su visoke specifične aktivnosti i ne sadrže hladne nosače (39).

1.4.1.1. Istorijat

Ranih šesdesetih godina prošlog veka se već znalo da su bretilijum i gvanetidin moćni blokatori adrenergičkih neurona. Bretilijum se u visokoj koncentraciji nakuplja u srčanom tkivu te su sintetisani analozi bretilijuma obeleženi radioaktivnim jodom (RIBA) kao potencijalni radiofarmaci za vizualizaciju srca. Početna ispitivanja izvedena u pasa su pokazala da je para-jodo-bretilijum (pRIBA) adrenospecifičniji nego orto-jod-bretilijum (oRIBA) koji je bolji blokator adrenergičkog neurona u odnosu na para i meta analoge.

Šort i Derbi (Short and Derby) su još 1967. uočili da je orto-jodni izomer jodobenzilguanidina (oIBG) bolji blokator adrenergičkog neurona nego njegov para oblik (pIBG). Na osnovu ovih nalaza, kao i uporednog ispitivanja distribucije nekoliko oblika jodobenzilguanidina u tkivu psa, oni 1971. saopšavaju da se mIBG-J-125 i pIBG-J-125 selektivno nakupljaju u srži nadbubrežne žlezde više nego prethodno testirana adrenofilna jedinjenja. MIBG se u odnosu na para i orto oblik najmanje nakuplja u tireoidnom tkivu ukazujući na to da je najotporniji na in vivo dejodinaciju. Zato je odlučeno da se dalje testira samo meta izo-

mer jodobenzilguanidina što je dovelo do toga da se ovaj oblik jodobenzilguanidina danas široko primenjuje kao dijagnostički i terapijski radiofarmak.

1.4.1.2. Sinteza neradioaktivnog („hladnog“) mIBG

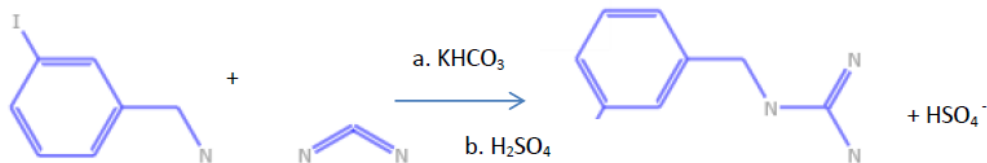
Mešavina m-jodobenzilaminhidrohlorida i cijanamida se uz mešanje zagreva na uljanom kupatilu na temperaturi od 100°C, 4 sata. Dobijena čvrsta staklasta supstanca se potom rastvori u vodi i meša sa KHCO_3 da bi se mIBG preveo u oblik bikarbonatne soli kojoj se dodaje H_2SO_4 da bi se dobio mIBG sulfat kao bezbojna kristalna supstanca. Ovo jedinjenje se topi na temperaturi od 167°C -168°C, umereno je rastvorljivo u vodi i dovoljno stabilna pri zagrevanju i hidrolizi.

1.4.1.3. Sinteza radioaktivnog mIBG

Da bi se pripremio radioaktivni mIBG mogu se koristiti sve metode zasnovane na jonoizmenjivačkoj reakciji:

- izmena u tečnoj fazi (originalan recept po Vilandu): 5 mg mIBG-sulfatu rastvorenog u 2ml vode se doda 5mCi J-125 ili J-131 NaJ bez nosača. Rastvor se destiluje 72 sata, a potom se prečisti na celuloznoj jonoizmenjivačkoj koloni da bi se uklonio radiojodid ili jodat koji nije izreagovao. Radiohemijski prinos pri ovom postupku je 60% do 80% a specifična aktivnost 0,6 do 0,8 mCi/mg.
- izmena u švrstoj fazi olakšana amonijum sulfatom
- izmena u tečnoj fazi katalizovana bakrom
- elektrofilna radiojodinacija: priprema radiojodidnog mIBG bez „hladnog“ nosača
- metode zasnovane na HPLC purifikaciji
- metode zasnovane na prekursorima vezanim za polimere koje ne zahtevaju HPLC purifikaciju

Prečišćeni J-131-mIBG se ispira sa kolone i skuplja u staklenoj bočici u kojoj se već nalazi natrijumaskorbat ili natrijum 2,5-dihidroksibenzoat koji služe kao radiostabilizatori. Ovaj finalni proizvod se filtrira kroz sterilisuće filtere veličine 0,22 μm u bočice od 30mL koje se potom zatvaraju u sterlinim uslovima i zamrzavaju. Radiohemijska čistoća u proizvodu je preko 97% a minimalna specifična aktivnost je 1650 mCi/mg ili 460 mCi/ μmol .



Sastav 5ml gotovog radiofarmaka Adreview (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)(40) u zapremini od 5 ml čija je aktivnost na dan kalibracije iznosi 370MBq, a specifične koncentracija 74MBq/ml je:

J-123 metajodobenzilguanidin sulfat.....	0,08 mg/ml
Natrijum-dihidrogen-fosfat	23,0 mg/ml
Dinatrijum-hidrogen-fosfat	2,8mg/ml
Benzil alkohol 1%	

U Institutu za nuklearne nauke „Vinča“ mIBG-J131, koji je korišćen u ovoj studiji, se dobija metodom hidrotermalnog topljenja koja se odvija na temperaturi između tačke ključanja rastvarača i tačke topljenja jedinjenja mIBG. Izotopna izmena se vrši tokom grejanja reakcione smeše neaktivnog mIBG i Na J-131 ili Na J-123 u vodenom rastvoru na temperaturi 150 °C u toku 30 minuta uz obavezno prisustvo amonijum sulfata ili sirćetne kiseline jer bez jedne od ove dve supstance reakcija ne teče. Radioaktivna koncentracija je veća od 18,5MBq/ml radioaktivna čistoća je veća od 99% a radiohemijska čistoće veće od 95% (41, 42).

To je vodeni rastvor za intravensku primenu koji sadrži J-131-mIBG i askorbinsku kiselinu kao stabilizator.

Sastav 5ml gotovog radiofarmaka je: (43)

Meta-iodobenzilguanidin-J-131 sulfat	1,0 mg
Amonijum-sulfat	3,9 mg
Natrijum-acetat-trihidrat	2,4 mg
Sirćetna kiselina.....	0,3 mg
NaCl	20,7 mg
Aqua destilata.....	5,0ml

Po spravljanju radiojodiranog mIBG neohodno je odrediti hemijsku i radiohemijsku čistoću preparata. Hromatografskim metodama (hromatografija na tankom sloju; tečna hromatografije visokih performansi; ekstrakcija na čvrstoj fazi) se određuje najvažnija

„nečistoća“ preparat, slobodni radiojodid. Drugi molekuli kao meta-jodobenzilamin (mI-BAM) i meta-jodohlorbenzilguanidin) mogu biti detektovani kao nečistoće.

1.4.1.4. Mehanizmi nakupljanja mIBG

Kateholamini (noradrenalin i dopamin) se transportuju iz noradrenergičke sinapse u citosol ciljane ćelije putem noradrenalinškog transportera (NET) koji je monoamniški transporter koji DA i NE transportuje nazad iz sinapse u citosol gde ih sekvstriraju drugi vezikularni transporteri i skladište u vezikulama za kasniju upotrebu. Ovaj mehanizam je poznat kao mehanizam 1, zavisi od Na⁺/K⁺ pumpe, visokog je afiniteta, malog kapaciteta, lako saturabilan. Ovaj mehanizam je osetljiv na povišenu temperaturu i prisustvo uabajina.

Pošto je mIBG fiziološki analog noradrenalina ćelije ga akumuliraju putem dva posebna mehanizma: jedan je aktivni transport i javlja se samo u ćelijama koje sintetišu noradrenalin. Preuzimanje mIBGa ovim mehanizmom je lako saturabilno, malog je kapaciteta, visokog afiniteta, zavisi od adenozin trifosfataze (ATP). Na ovaj način preuzeti mIBG se skladišti u noradrenergičke vezikule. Drugi način je pasivna difuzija koja je nespecifična, nije energetska zavisna, nije saturabilna, javlja se u svim ćelijama.

U idealnim uslovima aktivni transport je oko 50 puta efikasniji od pasivne difuzije. Kapacitet preuzimanja mIBG se može predvideti na osnovu broja eksprimiranih NE transportera tako da se kvantifikacija NET mRNA može koristiti za planiranje mIBG terapije.

Neuroblastomi takođe eksprimiraju NET preko kojih se i nakuplja uglavnom u mitohondrijama i citoplazmi.

Transporteri amina označeni kao VMAT 1 i VMAT 2 se nalaze na membrani sekretornih vezikula neuroendokrinih ćelija. MIBG koji je prošao ćelijsku membranu ovi molekuli potom transportuju u hromafine granule (45).

1.4.1.5. Farmakokinetika mIBG

Posle intravenske administracije mIBG-J-123/131 se brzo preuzima iz krvi i smešta u adrenergički inervisana tkiva. Zadržavanje je naročito produženo u tkivu koje je bogato adrenergički inervisano kao što su srce, srž nadbubrega i pljuvačne žlezde. Deset do 15% aplikovanog radiofarmaka se nakuplja u ćelijama koje eksprimiraju neuroendokrine receptore. U toku prvog sata akumulira se u plućima potom u srcu gde najveću koncentraciju dostiže posle 2 do 3 sata. Maksimalna koncentracija u tumoru i/ili metastazi se dostiže posle 24 do 96 sati. Radiofarmak se izlučuje mokraćom, nakuplja ga neblokirana tireoideja, a pokazuje i manji afinitet za jetru i slezinu. Najveći deo jobengvana se eliminiše nepromenjen glomerulanom filtracijom u bubrezima. U urinu osoba zdravih bubrega se posle prvih 24 sata nalazi 50%, a posle 4 dana 90% injicirane radioaktivnosti. Eliminacija

je relativno nezavisna od aplikovane aktivnosti od 0,5mCi (0,5mg) do približno 213mCi (7881MBq) (5mg). Maksimalni biološki poluživot jobengvana je 5 dana, uključujući i metabolite.

1.4.1.6. Metabolizam mIBG

Studije biodistribucije komercijalnog jobengvana J131 su pokazale da se samo mali deo preparata metaboliše in vivo. Glavni metabolit kod pacijenata sa očuvanom bubrežnom funkcijom je meta-jodo-hipurna kiselina, meta-jodo-bentoična kiselina i 4-hidroksi-3-jodobenzilgvanidin kao i slobodni radiojodid. Oni čine manje od 10% aplikovane doze radiofarmaka. Enzimski procesi koji su odgovorni za metabolisanje mIBG još nisu sasvim poznati a ni farmakološka aktivnost ovih metabolita nije proučavana. Studija sa Utratrace iobenguane I-131 koji je visoke specifične aktivnosti bez nosača, je pokazala da je preko 95% preparat izluči kao J-131-mIBG, oko 3% kao slobodni radiojodid i manje od 1% u vidu pomenutih metabolita.

Procenjena absorbovana doza za različite komercijalno dostupne jobengvane

	Jobengvan J-123		Jobengvan J-131		Ultratrace [¹³¹ I] MIBG	
organ	rad/ mCi	mGy/ MBq	rad/mCi	mGy/ MBq	rad/ mCi	mGy/MBq
srž nadbubrega	0.059	16	0.8	216	2.85	769
srce	0.067	18	0.30	81	1.41	380
jetra	0.248	67	2.9	783	1.70	460
slezina	0.074	20	2.2	594	2.37	639
bubreg	0.048	13	0.3	81	2.07	559
koštana srž	0.021	5.6	0.25	68	0.28	75
uterus	0.041	11				
ovarijumi	0.029	7.9	0.3	81	0.44	120
testisi	0.02	5.4	0.22	54	0.27	74
zid mokraćne be- šike	0.244	66.0	2.8	756	2.74	739
štitasta žlezda	0.017	4.7	0.3	81	9.62	2597
mišići	0.022	6.0	0.23	62	0.29	78
celo telo	0.30	8.1			0.40	100
efektiv- na doza	mSv/ MBq mSv/ mCi	13.7 0.507		189		

Štitasta žlezda je organ koji apsorbuje najveću dozu u odnosu na druge organe ako se aplikuje J-131 mIBG. Smatra se da zračenje potiče od slobodnog radiojodida kojeg je u testiranom preparatu Ultratrace [131I]MIBG 3% do 4,2%.

Proizvođač preporučuje da se doze „Adrevju“ preparata za decu određuju po sledećoj tabeli: (39, 40, 44)

Telesna masa (kg)	Frakcija aktivnosti za odrasle	Adrevju (mCi) pedijatrijska doza	Adrevju (MBq) pedijatrijska doza
3	0,1	1	37
4	0,14	1,4	52
6	0,19	1,9	70
8	0,23	2,3	85,1
10	0,27	2,7	99,9
12	0,32	3,2	118,4
14	0,36	3,6	133,2
16	0,4	4	148
18	0,44	4,4	162,8
20	0,46	4,6	170,2
22	0,5	5	185
24	0,53	5,3	196,1
26	0,56	5,6	207,2
28	0,58	5,8	214,6
30	0,62	6,2	229,4
32	0,65	6,5	240,5
34	0,68	6,8	251,6
36	0,71	7,1	262,7
38	0,73	7,3	270,1
40	0,76	7,6	281,2
42	0,78	7,8	288,6
44	0,8	8	296
46	0,82	8,2	303,4
48	0,85	8,5	314,5
50	0,88	8,8	325,6
52	0,9	9	333
54	0,9	9	333
56	0,92	9,2	340,4
58	0,92	9,2	340,4

Telesna masa (kg)	Frakcija aktivnosti za odrasle	Adrevju (mCi) pedijatrijska doza	Adrevju (MBq) pedijatrijska doza
60	0,96	9,6	355,2
62	0,96	9,6	355,2
64	0,98	9,8	362,6
66	0,98	9,8	362,6
68	0,99	9,9	366,3

Procenjeno je da dete od 5 godina koje primi efektivnu dozzzu od 3,7mSv primi aktivnost J^{123} 5,18 MBq po kilogramu telesne mase, odnosno za efektivnu dozu od 5,5mSv primi 0,74MBq/kg J -131 (45).

Pokazalo se da je $[^{123}I]$ MIBG bez nosača sintetisan metodom desililacije iz 3-(trimetil-silil)benzilgvanidina dobijen u prinosu od 80% do 90%, se u SK-N-SH ćelijskoj liniji neuroblastoma zadržavao u konstantnom stepenu od preko 50% za razliku od $[^{123}I]$ MIBG dobijenog jonoizmenjivačkom metodom čije se zadržavanje u ovim ćelijama smanjivalo sa opadanjem doze. Ovako spremljen je $[^{123}I]$ MIBG bez nosača se u srcu miševa nakupljao 1,5-3 puta. To je s druge strane povećavalo ozračivanje pre svega srcu i do 91% veće (46).

1.5. Interpretacija scintigrama u neuroblastomu

Mesta fiziološkog nakupljanja $J^{131}/^{123}$ - mIBG su štitasta žlezda, pljuvačne žlezde, suzne žlezde, miokard, pluća u prvim satima posle aplikacije radiofarmaka, medula nadbubrega, jetra, slezina, tanko i debelo crevo, mokraćna bešika, bubrezi. Ako postoji zastoj u izbacivanju mokraće (proširen pijelokaliksni sistem napr.) moguće je uočiti radiofarmak na nivou izvodnih mokraćnih puteva. Slabo i nehomogeno nakupljane radiofarmaka može se videti i u zoni nazofarinksa. Neuron centralnog nervnog sistema ne nakupljaju mIBG smatra se zbog hematoencefalne barijere.

Mesta mogućeg patološkog nakupljanja metajodobenzilgvanidina se smatraju sva ona mesta izvan gore pomenutih, a to su primarni tumor (bilo koje mesto simpatičke ganglije) i njegove metastaze.

1.5.1. Semikvantitativna procena mIBG scintigrama

Semikvantitativni bodovni sistemi su uvedeni da bi se standardizovao planarni mIBG scintigram u cilju procene obima bolesti u jednog pacijenta kao i među različitim pacijentima.

Prvi predloženi semikvantitativni metod bodovanja je Kiri (Curie) sistem (nazvan po Institutu Kiri u Francuskoj). Ovaj metod deli skelet prikazan na planarnom mIBG scintigramu na devet segmenata (kosti glave i lica, vrat i vratna kičma, rebra i grudna kost, slabinska i krsna kućma, mala karlica, ruke, podlaktice i šaka, noge i stopala, butine) i dodaje deseti segment koji odgovara bilo kojoj meko-tkivnoj regiji tela koja može biti zahvaćena tumorom. Kiri metod je najviše klinički testiran i pri tom je potvrđeno da dobro korelira sa ukupnim terapijskim odgovorom i dužinom remisije te se kao dovoljno pouzdan najčešće koristi u Severnoj Americi i Evropi u okviru Grupe za dečju onkologiju (Children's Oncology Group; COG). Kiri metod je bio slično prediktivan u oba planarna mIBG scintigrama: J123-mIBG vs. J131 mIBG (47, 48, 49).

Postoji nekoliko pokušaja modifikovanja Kiri bodovnog sistema. Jedan od njih je „Frappas skor“ (Frappaz score) koji koristi 7 skelatnih segmenata (kosti lobanje; orbite, kosti lica i baze lobanje; kičma; mala karlica; rebra i grudna kost; donji udovi; gornji udovi), a posebno beleži nakupljanje u mekom tkivu. Intenzitet nakupljanja radiofarmaka je bodovan na sledeći način: 0-bez nakupljanja; 1-sumnjivo fokalno nakupljanje; 2- jasno ali umereno nakupljanje; 3-jasno i značajno nakupljane radiofarmaka (50, 51).

SIOPEN (The International Society of Paediatric Oncology Neuroblastoma Europe) bodovni sistem, kao semikvantitativni sistem vrednovanja planarne simpatičko-adrenalne scintigrafije kod visko rizičnih pacijenata sa neuroblastomom, uveden je 2009. godine kao posebna varijacija semikvantitativnog bodovnog sistema koja beleži nakupljanje matajodobenzilguanidina u dvanaest anatomskih regija skeleta (lobanja, grudni koš, desna nadlaktica, leva nadlaktica, desna podlaktica, leva podlaktica, kičma, mala karlica, desna natkolenica, leva natkolenica, desna potkolenica, leva potkolenica). Zahvaćenost mekog tkiva tumorom sagledava se u šest anatomskih regija: glava i vrat, grudni koš, desna ruka, leva ruka, trbuh, mala karlica, desna noga, leva noga. Ovaj semikvantitativni metod je u 95% slučajeva slepe studije pokazao interobserversko slaganje između 6 specijalista nuklearne medicine. Pokazao se kao nešto bolji od Frapinog bodovnog sistema kao mera procene terapijskog odgovora (52, 53).

Ne postoji opšta saglasnost koji bi od do sada predloženih bodovnih sistema bio najkorisniji u kliničkoj primeni. Kiri i SIOPEN metod bodovanja su do sada najšire testirane i upoređivane metoda semikvantitativne procene simpatičko-adrenalne mIBG scintigrafije. Testiran je samo osteomedularni skor SIOPEN metoda u smislu terapijskog odgovora i

prognoze i upoređivan sa Kiri metodom iako oba sistema imaju inkorporiranu meko-tkivnu zahvaćenost tumorom. Bodovni sistemi su ispitivani u smislu terapijskog odgovora i preživljavanja pacijenata ali ne i u smisli slaganja sa drugim dijagnostičkim testovima. Meko tkivni skor nije uključivan u dosadašnju procenu SIOPEN metoda.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitivanje slaganja SIOpen i Kiri semikvantitativnih skorova na planarnoj simpatičko-adrenalnoj scintigrafiji
2. Ispitivanje slaganja mekotkivnih i osteomedularnih SIOpen skorova na planarnoj simpatičko-adrenalnoj scintigrafiji
3. Određivanje povezanosti meko-tkivnog skora na planarnoj simpatičko-adrenalnoj scintigrafiji sa biološkim pokazateljima tumora
 - a. nivoima VMA i HVA u urinu
 - b. nivoima LDH, NSE i feritina u serumu,
 - c. prisustvo MYCN amplifikacije u bioptatu neuroblastoma
 - d. prisustvo ćelija neuroblastoma u koštanoj srži (nalaz mijelograma)
4. Određivanje povezanosti osteomedularnog skora na planarnoj simpatičko-adrenalnoj scintigrafiji sa biološkim pokazateljima tumora
 - a. sa nivoima VMA i HVA u urinu
 - b. sa nivoima LDH, NSE i feritina u serumu,
 - c. sa prisustvom MYCN amplifikacije u bioptatu neuroblastoma
 - d. sa prisustvom ćelija neuroblastoma u koštanoj srži (nalaz mijelograma)
5. Određivanje povezanosti meko-tkivnog skora sa kliničkim stadijumom bolesti
6. Određivanje povezanosti osteomedularnog skora sa kliničkim stadijumom bolesti
7. Određivanje povezanosti meko-tkivnog skora sa patohistološkim stadijumom bolesti
8. Određivanje povezanosti osteomedularnog skora sa patohistološkim stadijumom bolesti

3. METOD RADA

3.1. Izbor ispitanika

U istraživanje je uključeno 76 dece, 39 devojčica (51,3%) i 37 dečaka (48,7) srednje životne dobi od $31,9 \pm 30,5$ meseci pri prvoj mIBG scintigrafiji (opseg uzrasta je bio od 0 do 135 meseci). Medijana uzrasta je 23,5 meseci. Oni su bili hospitalizovani u ustanovama tercijarnog nivoa zdravstvene zaštite radi funkcionalnog testiranja u cilju postavljanja dijagnoze, lečenja ili postterapijskog praćenja. MIBG scintigrafija se izvodila u Centru za nuklearnu medicinu Kliničkog centra Srbije u Beogradu u periodu između januara 2007. i jula 2014.

Uzorak su ispitanici poslani od strane pedijataro-onkologa (iz dve beogradske ustanove; Univerzitetske dečje klinike i Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „Dr Vukan Čupić”) kojima je postavljena dijagnoza neuroblastoma (sa ili bez određenog kliničkog i patohistološkog stadijuma bolesti) na osnovu nalaza ćelija neuroblastoma u tumorskom biopsatu ili na osnovu nalaza ćelija neuroblastoma u kosnoj srži i povećanih nivoa metabolita kateholamina u urinu, kao i ispitanici sa sumnjom na neuroblastom. Sumnja na neuroblastom je postavljena na osnovu nalaza metabolita kateholamina u urinu, ultrazvučnog i/ili radiografskog nalaza najčešće retroperitonealne tumorske mase i povećanih nivoa feritina, LDH, NSE. Ispitanici su na prezentaciji pred prvo mIBG testiranje imali u svojim istorijama bolesti nalaze koji su ukazivali na bološke osobine tumora (nivoi VMA i HVA u urinu, nivoi LDH, NSE, feritina u krvi, prisustvo amplifikacije MYCN gena, nalaz biopsije tumorske mase ili aspirata kosne srži: nalaz mijelograma, određen klinički stadijum bolesti (INSS) i patohistološki stadijum tumora (INPC), nalaze drugih imidžing tehnika (ultrazvučni nalaz, nalaz kompjuterizovane tomografije CT).

Dijagnostički parametri ispitanika su predstavljeni u tabeli 1.

Osnovne etape izvođenja mIBG scintigrafije koja se izvodi po pravilima Evropskog vodiča za scintigrafiju sa mIBG u dece, su

1. priprema ispitanika
2. priprema radiofarmaka
3. aplikacija radiofarmaka
4. akvizicija
5. interpretacija scintigrama i njihovo semi-kvantitativno bodovanje SIOPEN odnosno Kiri metodom.

3.2. Priprema ispitanika

Priprema ispitanika je podrazumevala peroralnu aplikaciju kalijum-jodida [Sol. Lugoli: deca od 1 mesec -3 godine 25mg (2 kapi) ; deca od 3-12 godina 50mg joda na dan (4 kapi)].

Ako se scintigrafija radi sa J131-mIBG Lugolov rastvor se daje 2 dana pre i još 5 dana posle aplikacije radiofarmaka.

U slučaju primene J-123 mIBG Lugolov rastvor se daje 2 dana pre i 3 dana posle aplikacije radiofarmaka (55).

Neposredno pred akviziciju (do 30 minuta) uznemirnoj deci je aplikovan blag sedativ.

3.3. Priprema radiofarmaka

J-123mIBG se dobija kao gotov komercijalni proizvod Adreview (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) dok se J-131 mIBG obeležava po specifikaciji proizvođača.

3.4. Aplikacija radiofarmaka

Obeleženi radiofarmak je aplikovan sporo, intravenski. Nisu zapažene alergijske reakcije niti druge nus pojave

3.5. Akvizicija

Ako se koristio **mIBG obeležen radioizotopom J-131**, koji ima poluvreme raspada 8 dana i glavnu emisiju gama fotona od 364 keV, planarni ciljani scintigrami se dobijaju upotrebom gama scintilacione kamere (Siemens Digitrac 37) opremljene kolimatorom za srednje energije, podešene za rad u energetskom opsegu J-131 (364 keV sa širinom „prozora“ 20%), u matrici 128x128. Ispitanici su u toku akvizicije podataka bili u supinaciji, a potom u pronaciji, na ležaju od materijala niskog atenuacionog koeficijenta. Posle 48 sati od aplikacije J-131 mIBG dobijeni su ciljani scintigrami, slike u anteriornoj i posteriornoj projekciji glave, vrata, grudnog koša, abdomena, male karlice i sva četiri ekstremiteta, od skupljenih 100 000 impulsa.

Ako se koristio **mIBG obeležen J-123** scintigrami celog tela su se dobijali na digitalizovanoj gama (scintilacionoj) kameri (ECAM, Siemens) opremljenoj kolimatorom sa paralelnim otvorima visoke rezolucije za niske energije, podešenoj za rad u energetskom opsegu J-123 (159keV i „prozor“ od 20%), 24 sata posle spore intravenske injekcije radiofarmaka u matrici 256x256. Scintigrami se dobijaju pri brzini kretanja glave kamere od 6 cm/minut. Ispitanici su sve vreme bili u supinaciji. Posteriorne projekcije celog tela su dobijene pozicioniranjem glave gama kamere.

3.6. Interpretacija scintigrama (semi-kvantitativno bodovanje SIOPEN odnosno Kiri metodom)

Za procenu planarnih simpatičko-adrenalnih mIBG scintigrama korišćena su dva semi-kvantitativna bodovna sistema: SIOPEN i Kiri (Curie)

SIOPEN bodovni sistem beleži nakupljanje matajodobenzilguanidina u dvanaest anatomskih regija skeleta (lobanja, grudni koš, desna nadlaktica, leva nadlaktica, desna podlaktica, leva podlaktica, kičma, mala karlica, desna natkolenica, leva natkolenica, desna potkolenica, leva potkolenica). Zahvaćenost mekog tkiva tumorom sagledava se u šest anatomskih regija: glava i vrat, grudni koš, desna ruka, leva ruka, trbuh, mala karlica, desna noga, leva noga. Bodovi se kostnom anatomskom segmentu dodeljuju na sledeći način: 0-bez patološkog nakupljanja radiofarmaka, 1- jedna zona patološkog nakupljanja, 2-dve zone patološkog nakupljanja, 3-tri zone patološkog nakupljanja, 4-difuzno patološko nakupljanje koje zauzima manje od 50% kosti ili više od tri zona, 5- difuzno patološko nakupljanje koje zauzima od 50% do 95% kosti, 6-difuzno patološko nakupljanje koje zauzima celu kost, X-nakupljanje radiofarmaka koje se ne može proceniti. Distribucija radiofarmaka u mekom tkivu se boduje: 0- bez patološkog nakupljanja radiofarmaka, 1- jedna zona patološkog nakupljanja, 2-brojne zone patološkog nakupljanja, X- nakupljanje radiofarmaka koje se ne može proceniti.

Patient ID			
Study Date			
Primary tumour site	Thorax	Abdo	Pelvis
Primary resected	YES	NO	

	Skeleton Score			Soft tissue Score	
	Pre treatment	Post treatment		Pre treatment	Post treatment
Skull and facial bones			Head & neck		
Thoracic cage			Thorax		
Right humerus			Right upper limb		
Left humerus			Left upper limb		
Right forearm					
Left forearm					
Spine			Abdomen		
Pelvis			Pelvis		
Right femur			Right lower limb		
Left femur			Left lower limb		
Right tibia/fibula					
Left tibia/fibula					
TOTAL					

SKELETAL SCORE

0	No abnormality
1	1 focal lesion
2	2 focal lesions
3	3 focal lesions
4	Diffuse < 50% of bone or > 3 focal lesions
5	Diffuse 50 - 95 % of bone
6	Diffuse involving whole bone
X	Unevaluable

SOFT TISSUE SCORE

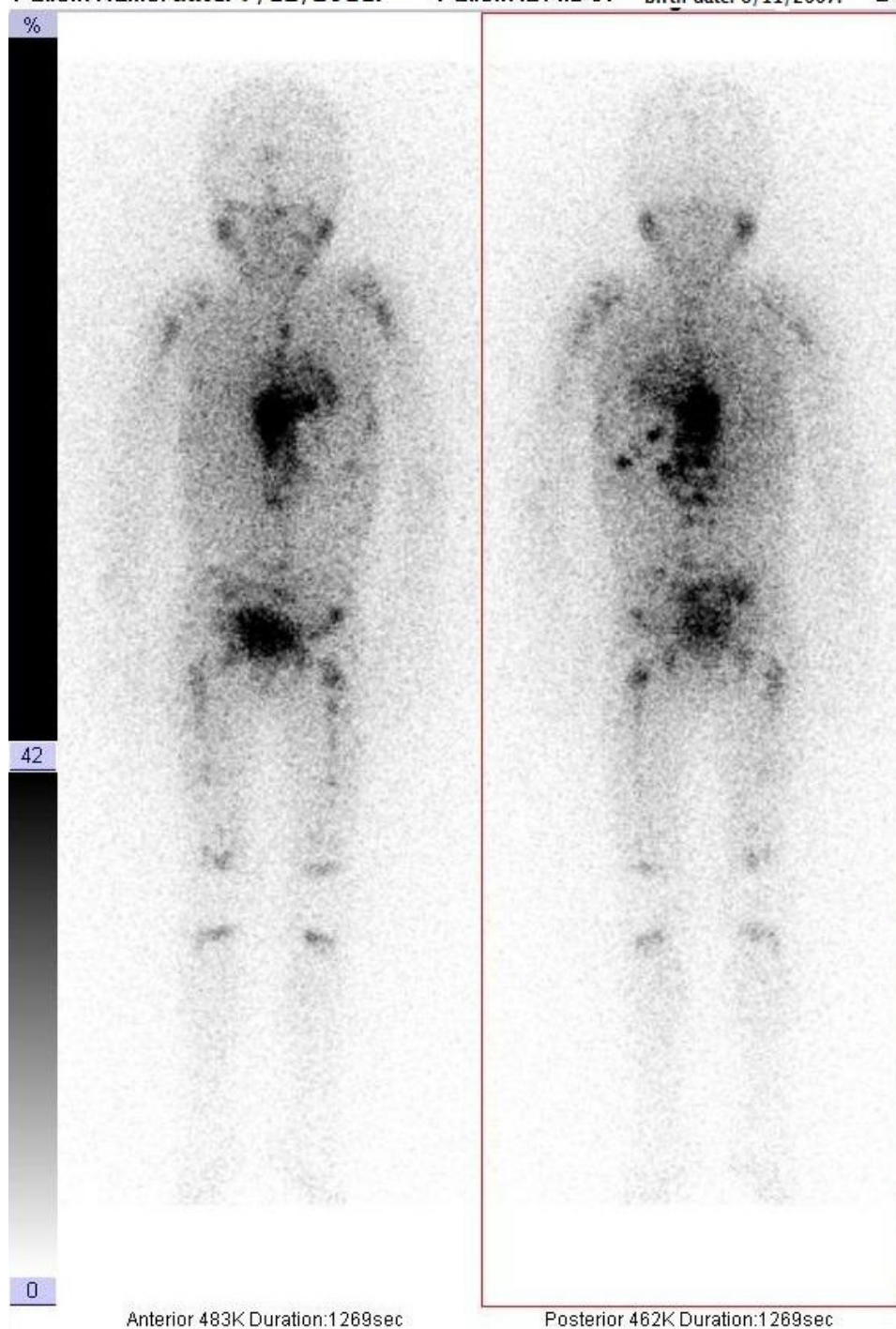
0	No abnormality
1	Solitary lesion
2	Multiple lesions
X	Unevaluable

	Uptake		Size		Intensity	
	Pre treatment	Post treatment	Pre treatment	Post treatment	Pre treatment	Post treatment
Primary tumour						

0 = no uptake		S = same as liver
A = homogeneous	I = smaller than heart	L = lower than liver
B = heterogeneous	II = equal to/larger than heart	H = higher than liver
C = dominant photopaenia		

Slika 2. Tabela za bodovanje semi-kvantitativnim SIOPEN bodovnim sistemom. Preuzeto sa: http://www.oncauvergne.fr/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=928&Itemid

Patient Name: date: 7/12/2011. Patient ID: nb 51 birth date: 6/11/2007. DO



Slika 3. Bodovanje po SIOPEN i Kiri semikvantitativnoj metodi kod dečaka starosti 49 meseci sa slabo diferencirajućim neuroblastomom bez umnoženog MYCN onkogena u 4. kliničkom stadijumu bolesti sa segmentnim viškom u dugom kraku 17. hromozoma: **SIOPEN** „skor“ u skeletu 33 (lobanja i kosti lica 0; grudni koš 4; desna nadlaktica 3; leva nadlaktica 3; desna podlaktica 0; leva podlaktica 0; kičma 4; mala karlica 3; desna butna kost 4; leva butna kost 4; desna golenjača/lišnjača 4; desna golenjača/lišnjača 4. SIOPEN „skor“ u mekom tkivu 4 (glava i vrat 0; grudi 2; desna ruka 0; leva ruka 0; trbuh 2; mala karlica 0; desna noga 0; leva noga 0). **KIRI** „skor“ 13: glava i lice 0; vrat i vratna kičma 2; rebra i grudna kost 0; krsna i sakrumska kičma 0; mala karlica 2; ruke 2; podlaktice i šake 0; bedra 2; noge i stopala 2; meko-tkivni segment 3.

3.7. Statistička analiza

Dobijeni podaci su analizirani deskriptivnim statističkim metodama (srednje vrednosti, mere varijabiliteta, pokazatelji strukture), metodama za testiranje razlike (hi-kvadrat test, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test), i metodama za ocenu povezanosti (Spearman r) i slaganja (Spearman r, kappa koeficijent). Hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti od 0.05.

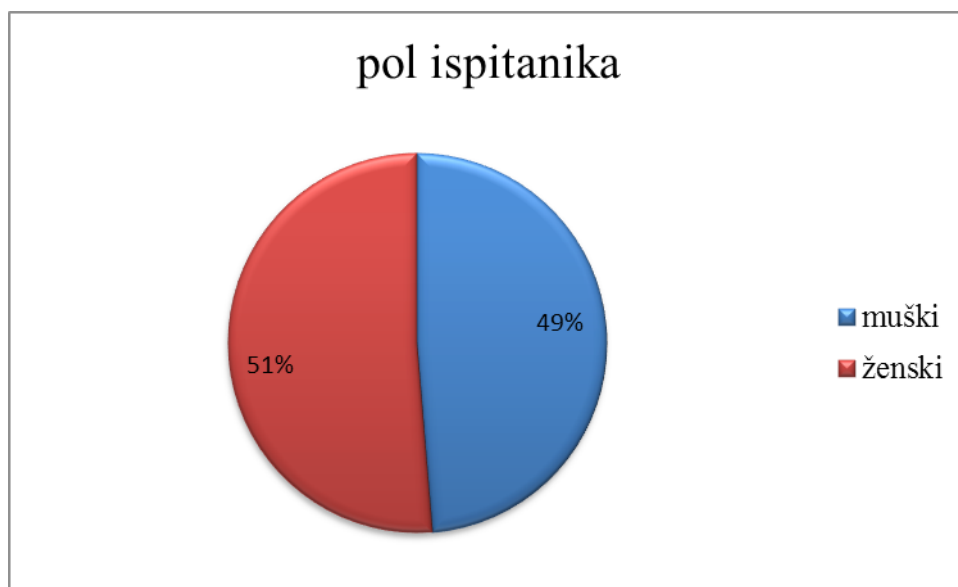
1. Statistička značajnost razlike između pozitivnog odnosno negativnog nalaza mijelograma kod ispitanika i SIOPEN skorova na njihovoj planarnoj mIBG scintigrafiji je testirano Mann-Whitney U testom.
2. Statistička značajnost razlike između operisanih i neoperisanih ispitanika i SIOPEN skorova na njihovoj planarnoj mIBG scintigrafiji je testirano Mann-Whitney U testom.
3. Statistička značajnost razlike između ispitanika sa povišenim odnosno fiziološkim nivoom VMA u urinu pred mIBG scintigrafiju i SIOPEN skorava na njihovim planarnim scintigramima testirana je Mann-Whitney U testom.
4. Statistička značajnost razlike između ispitanika sa povišenim odnosno fiziološkim nivoom HVA u urinu pred mIBG scintigrafiju i SIOPEN skorova na njihovim planarnim scintigramima testirana je Mann-Whitney U testom.
5. Statistička značajnost razlike između ispitanika sa prisustvom umnoženog NMYC onkogeno u ćelijama neuroblastoma i SIOPEN skorava na njihovim planarnim scintigramima testirana je Mann-Whitney U testom.
6. Statistička značajnost razlike između ispitanika sa povišenim odnosno fiziološkim nivoom feritina u serumu pred mIBG scintigrafiju i SIOPEN skorova na njihovim planarnim scintigramima testirana je Mann-Whitney U testom.
7. Statistička značajnost razlike između ispitanika sa povišenim odnosno fiziološkim nivoom NSE u serumu pred mIBG scintigrafiju i SIOPEN skorova na njihovim planarnim scintigramima testirana je Mann-Whitney U testom.
8. Statistička značajnost razlike između ispitanika sa povišenim odnosno fiziološkim nivoom LDH u serumu pred mIBG scintigrafiju i SIOPEN skorova na njihovim planarnim scintigramima testirana je Mann-Whitney U testom.
9. Povezanost kliničkog stadijuma ispitanika u kojem su prezentovani na mIBG scintigrafiji sa SIOPEN skorovim njihovog planarnog scintigrama je testirana Spearmanovim r koeficijentom.
10. Statistička značajnost razlike između patohistoloških (INCP) stadijuma bolesti u kojem su prezentovani na mIBG scintigrafiji i SIOPEN skorova njihovih planarnih scintigrama testirana je Kruskal-Wallisovim (Kruskal-Wallis) testom.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Prospektivnom kohortom sa ponovljenim merenjima obuhvaćeno je 76 dece koja su upućena na simpatičko-adrenalnu scintigrafiju pomoću mIBG-J131/123 zbog sumnje na neuroblastom ili su praćenja u toku lečenja neuroblastoma. Planarni simpatičko-adrenalni scintigrami učinjeni pomoću mIBG (meta-jodobenzilgvanidina) su semikvantitativno procenjivani pomoću SIOPEN i „Kiri“ bodovnog sistema.

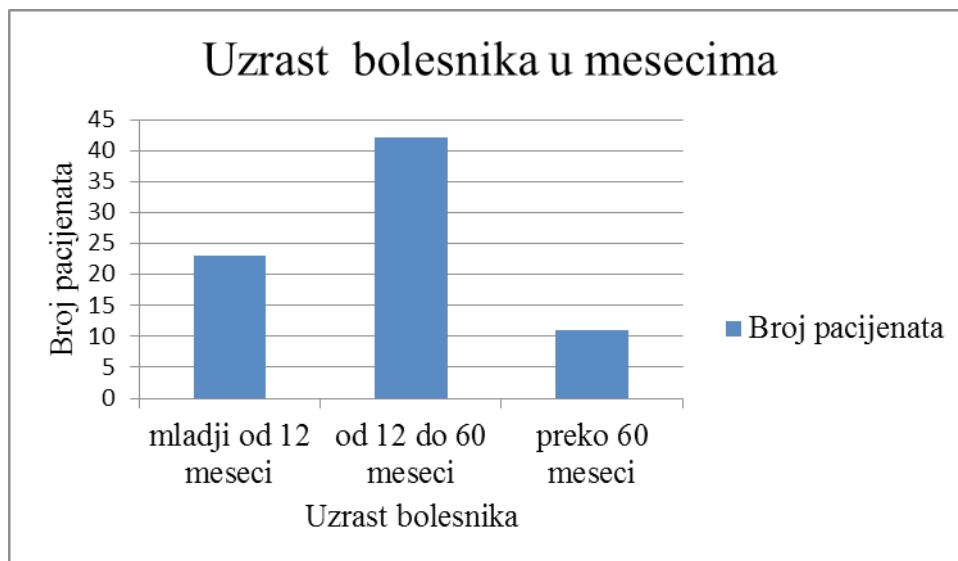
4.1. Pol i uzrast bolesnika

U uzorku je bilo 39 (51%) devojčica i 37 (49%) dečaka (Grafikon 1).



Grafikon 1. Raspodela bolesnika prema polu

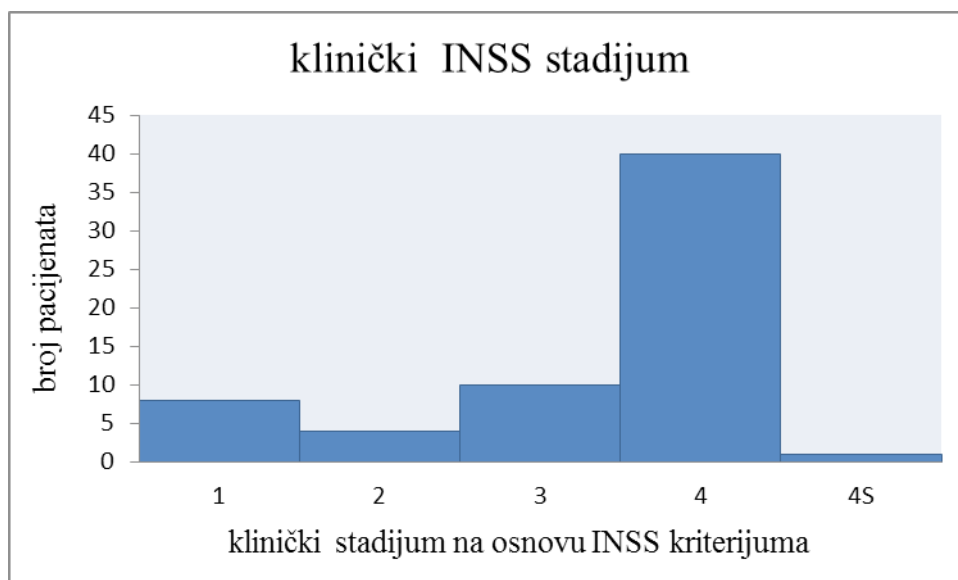
Srednji uzrast dece na scintigrafijama je bio: na prvoj scintigrafiji 38 meseci; na drugoj 46.5; na trećoj 68; na četvrtoj 81; na petoj 158; na šestoj 150 (Tabela 2).



Grafikon 2. Uzrast bolesnika na prvoj mIBG scintigrafiji izražen u mesecima

4.2. Klinički stadijum bolesnika određivan na osnovu INSS kriterijuma

Šesdesettroje od 76 dece prezentovane na prvoj mIBGscintigrafiji ove studiji je bilo u sledećim kliničkim stadijumima: 8 dece u INSS stadijumu 1; 4 dece u 2. kliničkom stadijumu; 10 dece u stadijumu 3; 40 dece u stadijumu 4 i 1 dete u stadijumu 4S (Grafikon 3) .



Grafikon 3. Raspodela bolesnika po kliničkom stadijumu koji je određivan na osnovu INSS kriterijuma

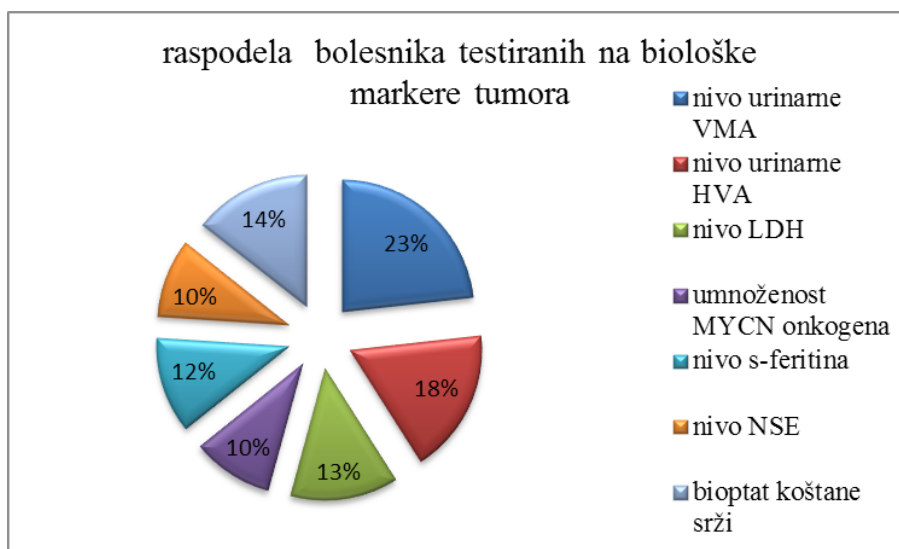
4.3. Histološki stadijum neuroblastoma određivan na osnovu INPC kriterijuma

Pedesetšestoro dece sa već postavljenom patohistološkom dijagnozom neuroblastoma je bilo raspoređeno na sledeći način: 10 dece sa nediferentovanim neuroblastomom nepovoljne prognoze; 13 dece sa slabo diferencirajućim neuroblastomom nepovoljne prognoze; 16 dece sa diferencirajućim neuroblastomom povoljne prognoze; 5 dece sa ganglioneuroblastomom; 2 deteta sa nodularnim ganglioneuroblastomom; 5 dece sa neklasifikovanim neuroblastomom.

Distribucija ispitanika po kliničkom stadijumu bolesti, histološkoj vrsti tumora, biološkim osobinama neuroblastoma prikazana je u grafikonu 3 kao i u tabeli 1.

4.4. „Biološke“ osobine neuroblastoma u ispitivanih bolesnika

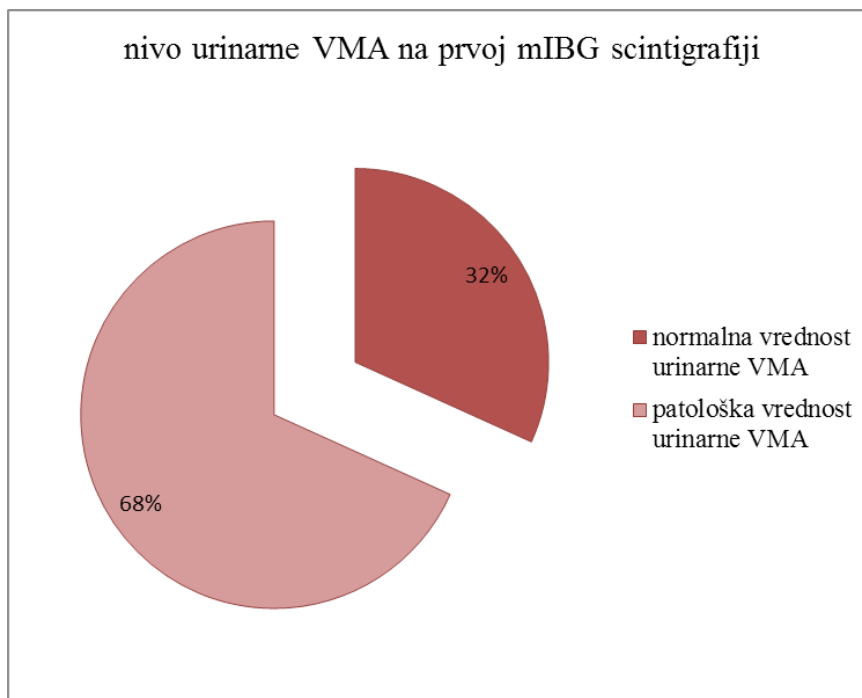
Biohemijske karakteristike tumora su među ispitanicima bile distribuirane na sledeći način (Grafikon 4):



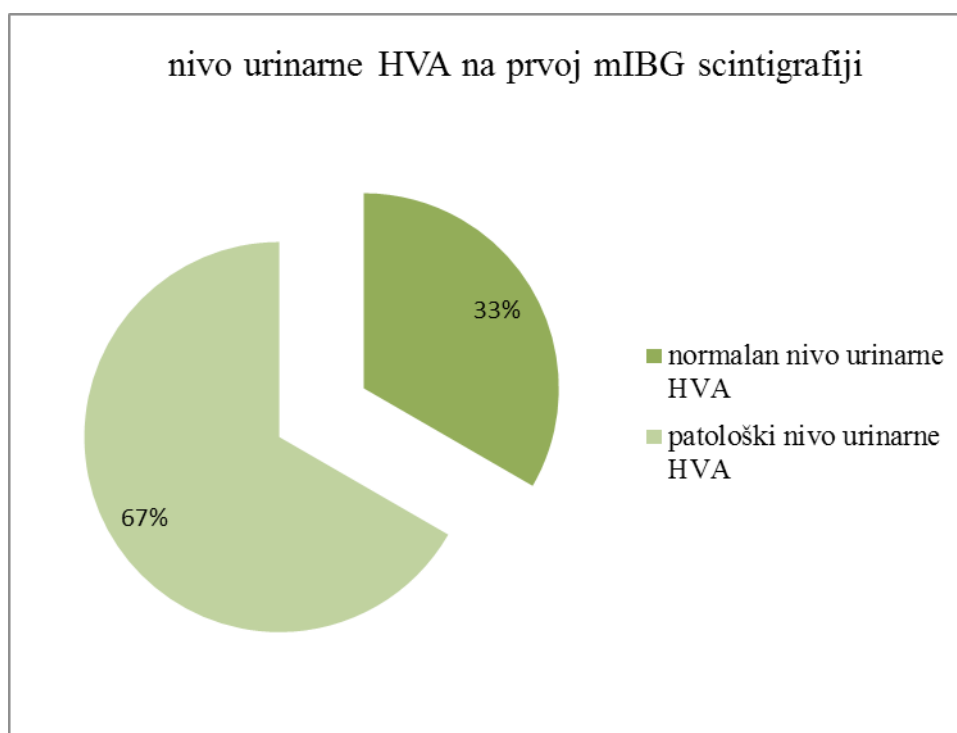
Grafikon 4. Raspodela bolesnika testiranih na biološke markere tumora

od 63 testiranih pacijenata pri prvoj mIBG scintigrafiji 43 (68%) je imalo povećan nivo VMA u urinu (Grafikon 5); nivo HVA u urinu je bio povećan u 32 (67%) od 48 testiranih pacijenata (Grafikon 6); povećan nivo NSE u 24 od 26 testiranih ispitanika (Grafikon 7); povećan nivo LDH u 28 od 36 testirane dece (Grafikon 8); povećan nivo s-ferritina u 16 od 32 testiranih (Grafikon 9); umnožen MYCN onkogen je detektovan u 7 neuroblastoma od

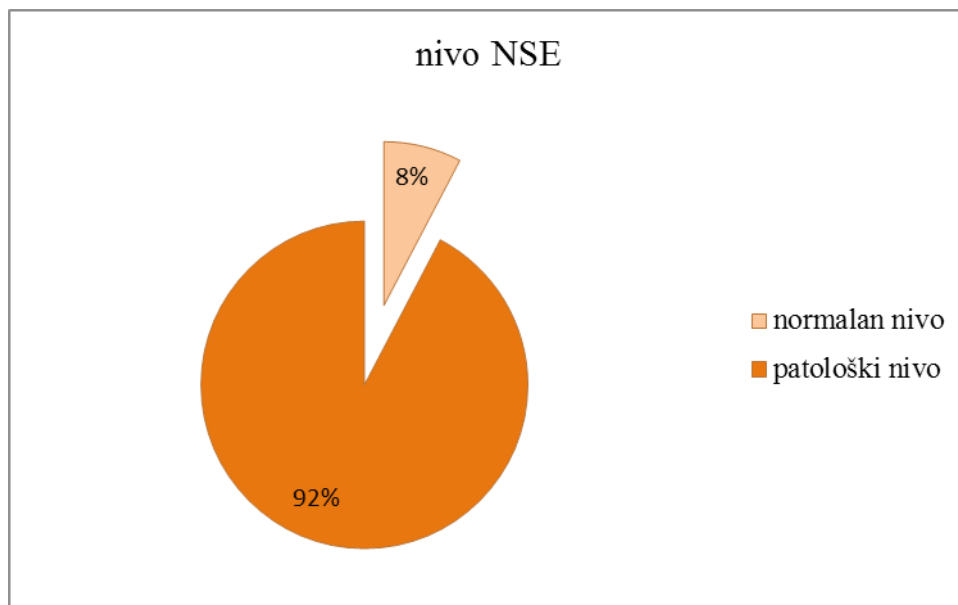
27 testiranih (Grafikon 10); Čelije neuroblastoma su nađene u koštanoj srži 12 ispitanika od 39 bioptirane dece (Grafikon 11).



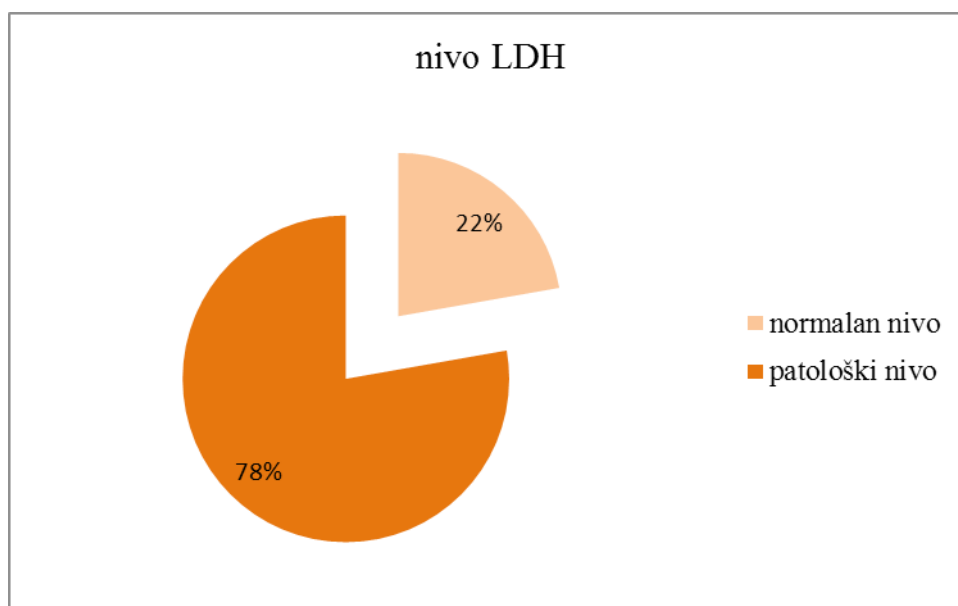
Grafikon 5. Raspodela patoloških i normalnih nivoa urinarne VMA na prvoj simpatičko-adrenalnoj scintigrafiji



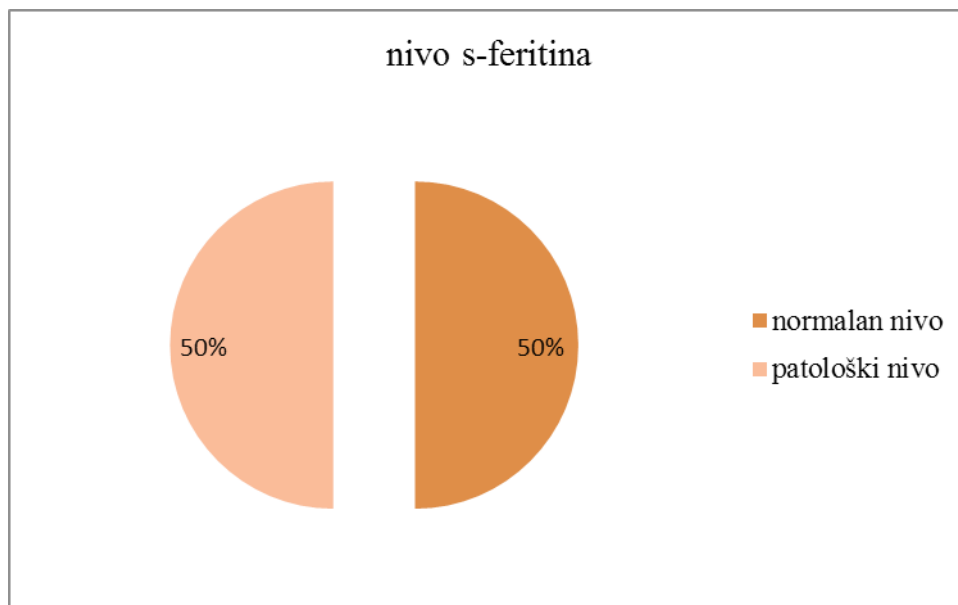
Grafikon 6. Raspodela nivoa urinarne HVA na prvoj simpatičko-adrenalnoj scintigrafiji u testiranih bolesnika



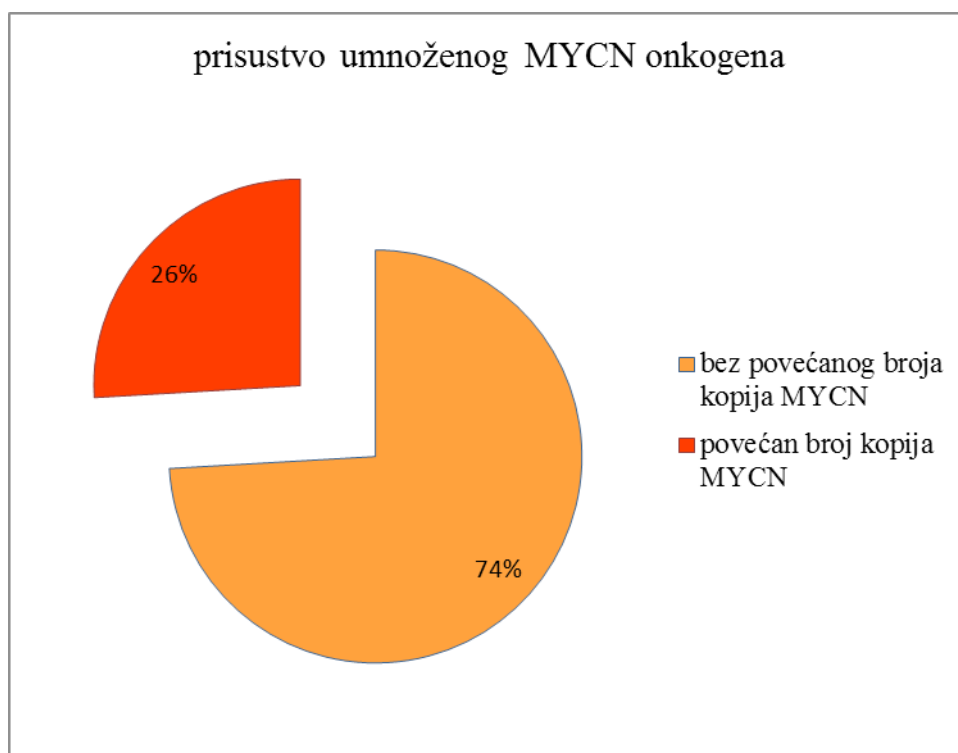
Grafikon 7. Raspodela nivoa NSE na prvoj simpatičko-adrenalnoj scintigrafiji u testiranih bolesnika



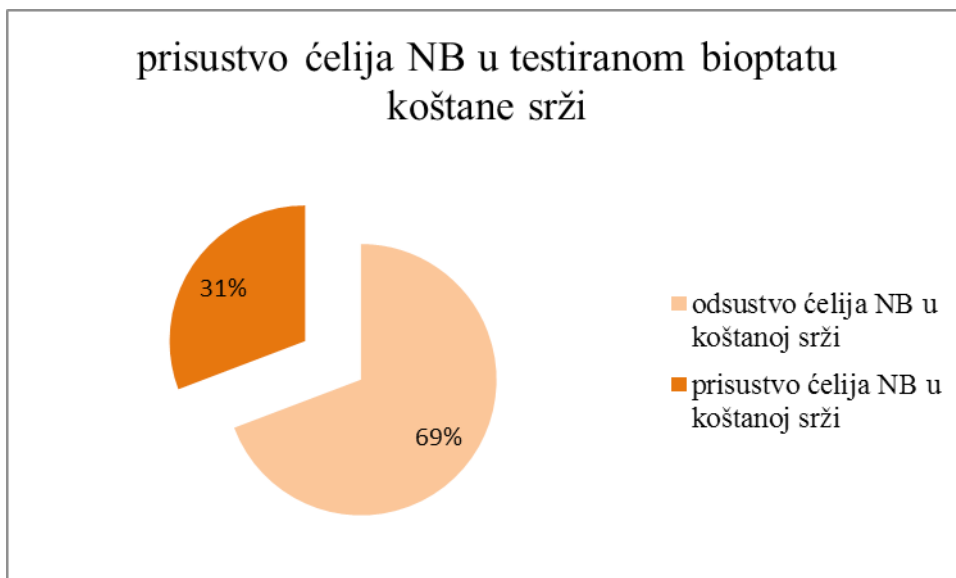
Grafikon 8. Raspodela nivoa LDH na prvoj simpatičko-adrenalnoj scintigrafiji u testiranih bolesnika



Grafikon 9. Raspodela nivoa s-feritina na prvoj simpatičko-adrenalnoj scintigrafiji u testiranih bolesnika

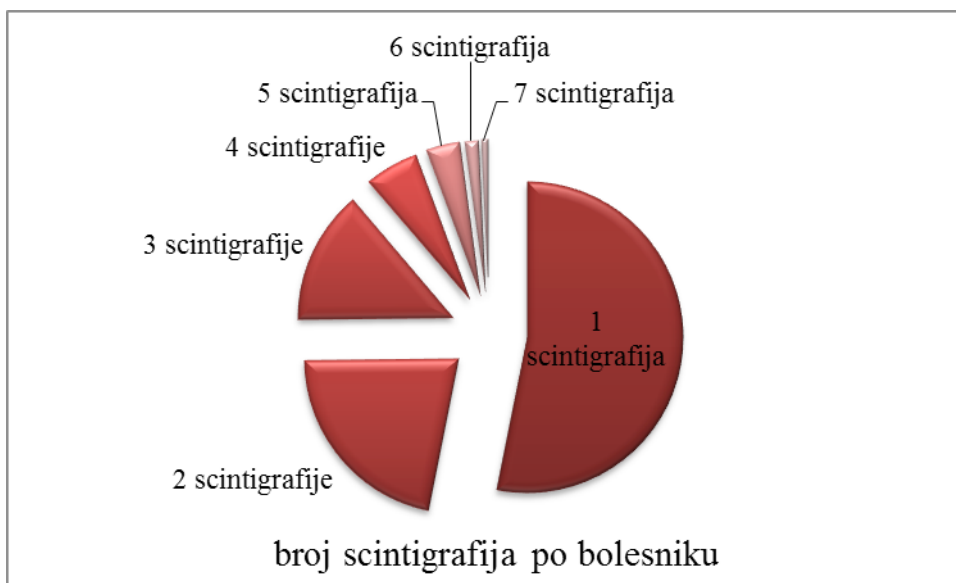


Grafikon 10. Prisustvo umnoženog broja kopija MYCN onkogeno u tumorskom bioptatu testiranih bolesnika



Grafikon 11. Raspodela prisustva ćelija neuroblastoma u bioptatu koštane srži testiranih bolesnika

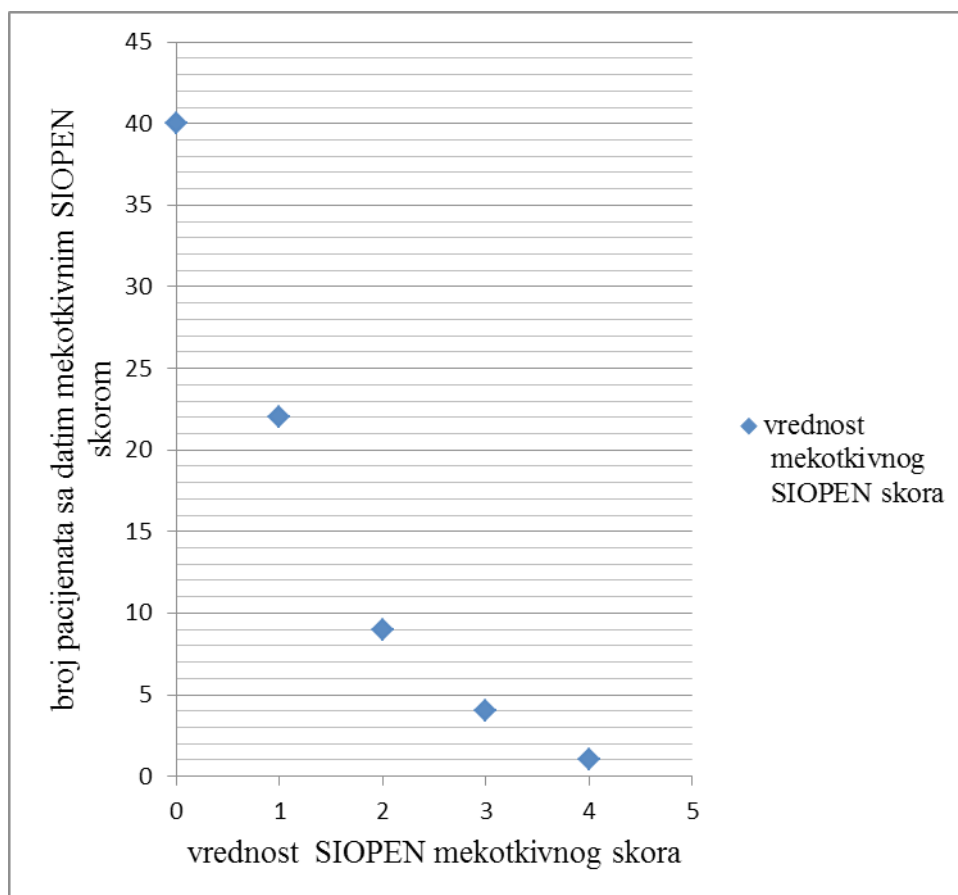
U svih 76 dece je učinjena 1 scintigrafija; 31 dete je imalo 2 mIBG scintigrafije tokom trajanja studije; 20 dece je imalo 3 scintigrafije; 8 dece 4 scintigrafska ispitivanja; 5 dece je imalo po 5 scintigramama; 2 dece po 6 a jedna devojčica je imala 7 scintigrafija dok je trajala studija (Grafikon 12).



Grafikon 12. Broj simpatičko-adrenalnih scintigrafija pomoću mIBG po bolesniku

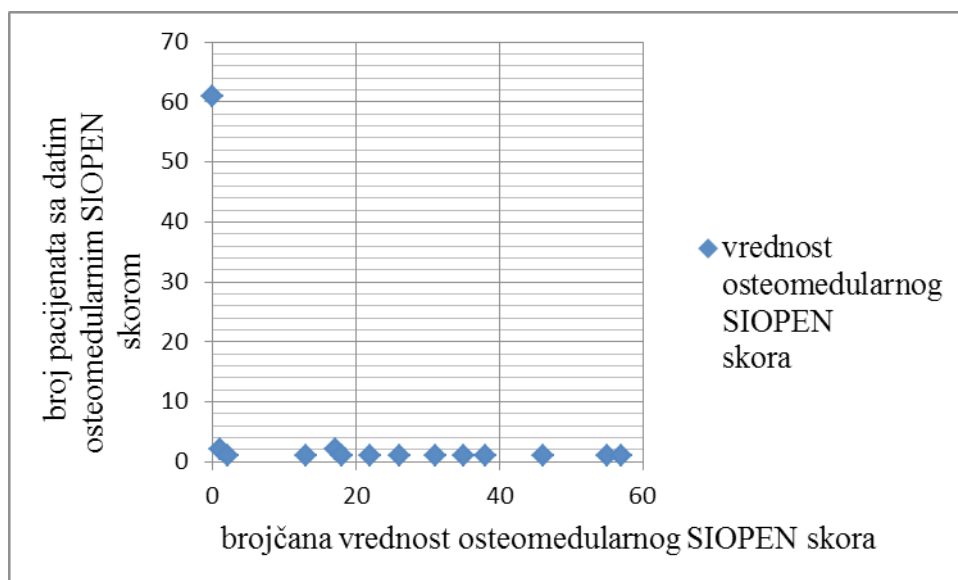
4.5. Rezultati bodovanja planarnih simpatičko-adrenalnih scintigrama

Na scintigamima SIOPEN meko-tkivni skor je bio od 0 do 5 a osteomedularni skor od 0 do 57. Kiri skor je bio od 0 do 26. Distribucija mekotkivnih SIOPEN skorova na prvoj scintigrafiji prikazan je na grafikonu 13.



Grafikon 13. Distribucija vrednosti mekotivnog SIOPEN skora na prvoj simpatičko-adrenalnoj scintigrafiji pomoću mIBG

Distribucija osteomedularnih SIOPEN skorova na prvoj scintigrafiji prikazan je na grafikonu 14.



Grafikon 14. Distribucija osteomedularnih SIOPEN skorova na prvoj adrenalno-simpatičkoj scintigrafiji

4.6. Povezanost skorova SIOPEN semikvantitativnog bodovnog sistema sa „biološkim“ osobinama tumora

Osteomedularni SIOPEN skorovi su bili statistički značajno veći kod dece sa pozitivnim nalazom biopsije koštane srži (Mann-Whitney $U = 77,9$; $p = 0,009$); kod dece sa povećanim nivoom VMA u urinu (Mann-Whitney $U = 322$; $p = 0,038$) i kod dece u uznapredovalom kliničkom stadijumu bolesti (Spearman $r = 0,37$; $p = 0,003$).

Nije bilo statistički značajne razlike između osteomedularnog i mekotkivnog SIOPEN skora u odnosu na patohistološki stadijum neuroblastoma, u odnosu na povećane nivoe HVA u urinu, odnosno povećane serumske nivoe LDH, NSE i feritina. Razlika nije pokazana između SIOPEN skorova i prisustva umnoženog MYCN onkogeno. (Tabela 3).

4.7. Povezanost skorova SIOPEN semikvantitativnog bodovnog sistema sa skorom Kiri semikvantitativnog bodovnog sistema

Uočena je statistički značajna linearna povezanost Kiri skora sa steomedularnim i mekotkivnim SIOPEN skorom pri bodovanju prva tri planarna mIBG scintigrama: na prvom bodovanom scintigramu ($n = 75$) SIOPEN mekotkivni skor $r = 0,696$; osteomedularni SIOPEN skor 43, $r = 0,676$, $p < 0,001$; na drugoj scintigrafiji ($n = 31$) SIOPEN mekotkivni skor

$r=0,715$; osteomedularni SIOPEN skor , $r=0,47$ $p < 0,001$, ; na trećoj scintigrafiji ($n=20$) SIOPEN mekotkivni skor $r=0,509$; osteomedularni SIOPEN skor , $r=0,656$, $p = 0,002$ (Tabela 4).

4.8. Povezanost urinarnih nivoa VMA i HVA u bolesnika

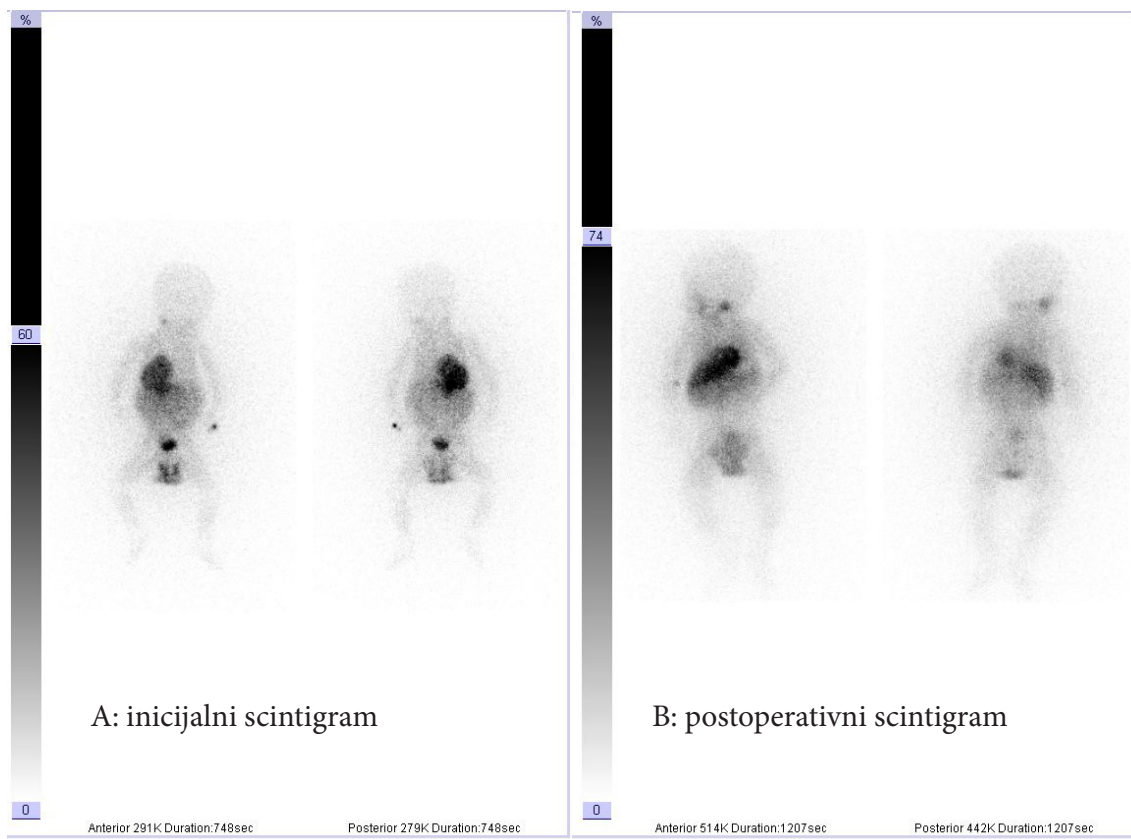
Pacijenti koji su imali patološke vrednosti nivoa VMA u urinu su u 85% slučajeva imali i patološke vrednosti nivoa HVA u urinu. Oni koji nisu imali patološke vrednosti VMA u mokraći, u 27% su imali patološke vrednosti HVA u urinu. Postoji statistički značajna povezanost pozitivnosti nalaza VMA i HVA (hi-kvadrat = 15,7, DF = 1, $p < 0,001$). Mera slaganja patoloških nalaza VMA i HVA u urinu iznosi $\kappa = 0,57$ (Tabela 5).

4.9. Međusobna povezanost mekotkivnog i osteomedularnog skora SIOPEN semikvantitativnog bodovnog sistema

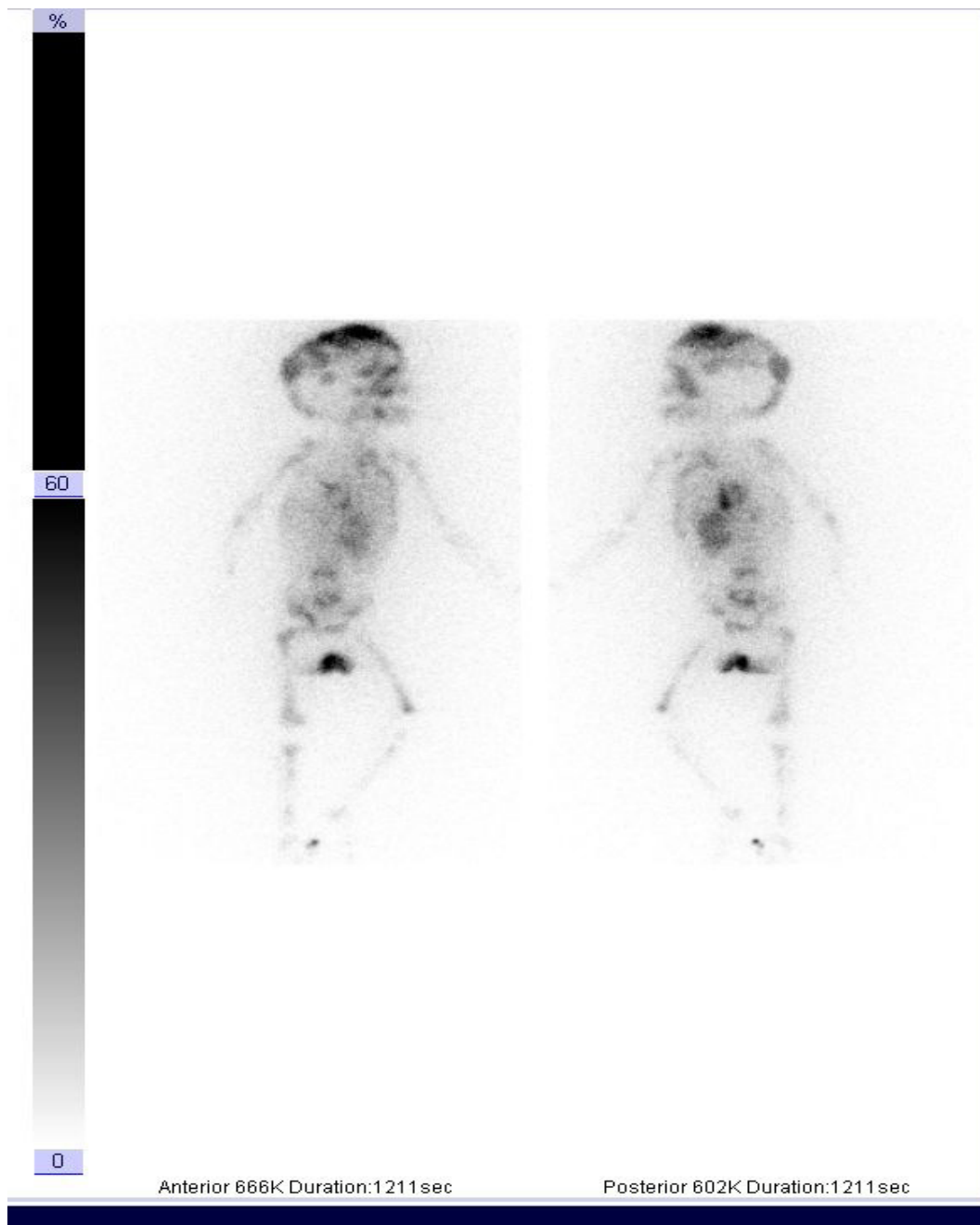
U 31% pacijenata koji su imali pozitivan meko-tkivni SIOPEN skor, bio je pozitivan i SIOPEN koštani skor. Postoji statistički značajna povezanost pozitivnih meko-tkivnih i koštanih SIOPEN skorova (hi-kvadrat = 5,1, DF = 1, $p = 0,025$, OR=4,0) (Tabela 6).

U 70% pacijenata koji su imali pozitivan koštani SIOPEN skor, bio je pozitivan i meko-tkivni SIOPEN skor. Postoji statistički značajna povezanost pozitivnih koštanih i meko-tkivnih SIOPEN skorova (hi-kvadrat = 31,1, DF = 1, $p < 0,001$, OR = 35,8) (Tabela 7).

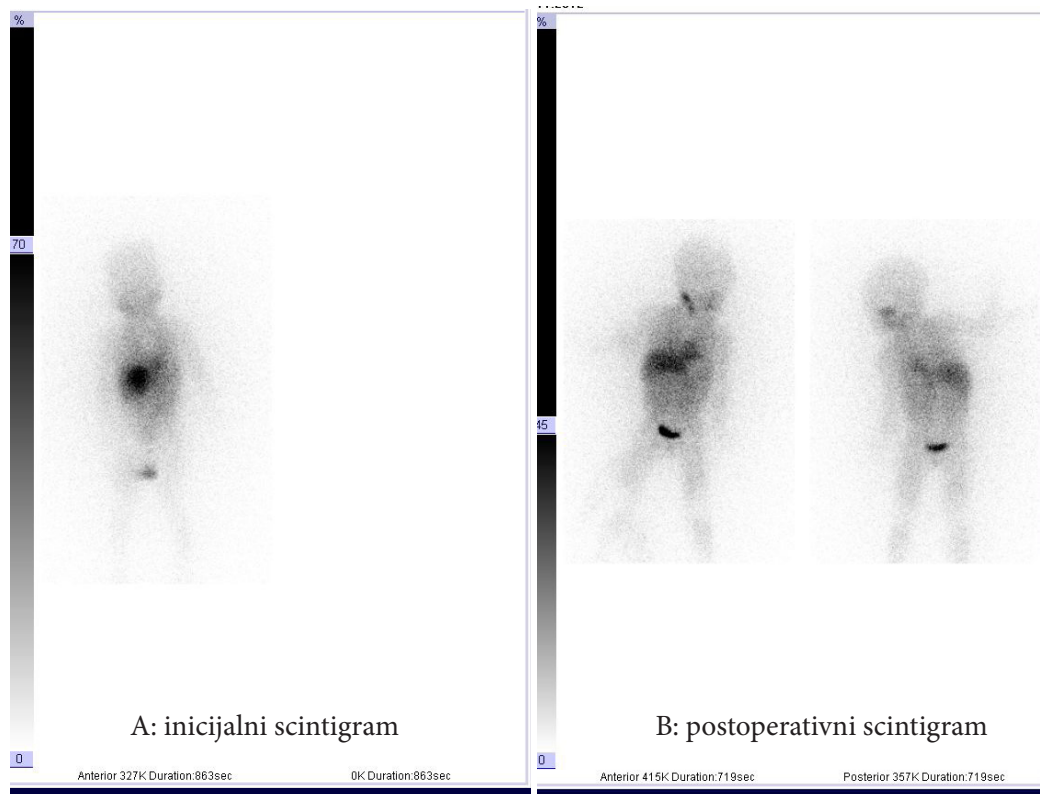
Primeri bodovanja pomoću oba semikvantitativna sistema u različitim kliničkim uslovima su dati na slikama 4-8.



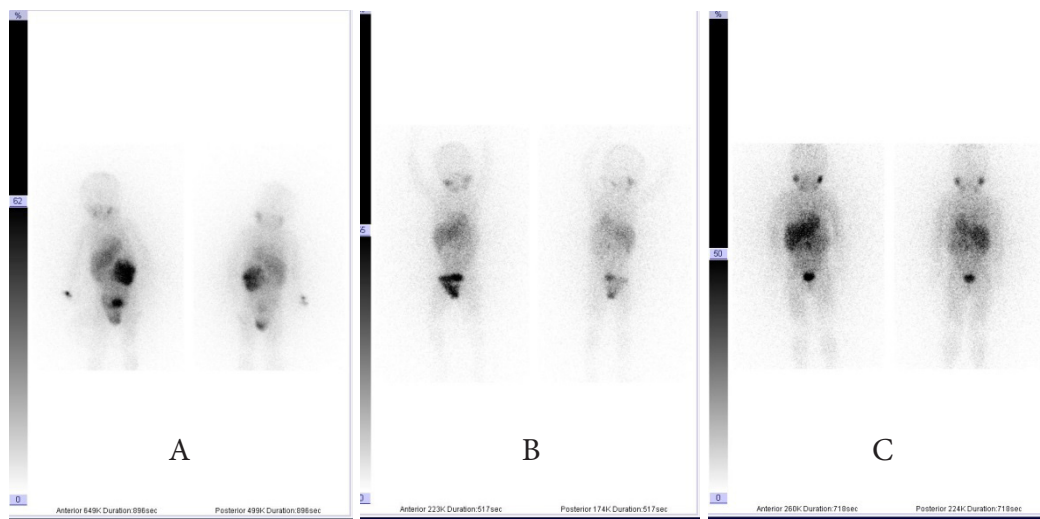
Slika 4. simpatičko-adrenalni scintigram pomoću mIBG-J-123 dečaka od 7 meseci na inicijalnoj scintigrafiji; slabodiferentovani neuroblastom (zbog oskudnog bioptata tumora nije određena prognostička kategorija); bez umnoženog MYCN onkogen; povećani nivoi s-fertina, LDH, NSE, urinarnih VMA i HVA. **A:** SIOPEN mekotkivni skor **2**; SIOPEN osteomedularni skor **0**; Kiri skor **1**; **B.** Postoperativni scintigram (extirpatio tumoris in toto) SIOPEN mekotkivni skor **1**; SIOPEN osteomedularni skor **0**; Kiri skor **1**.



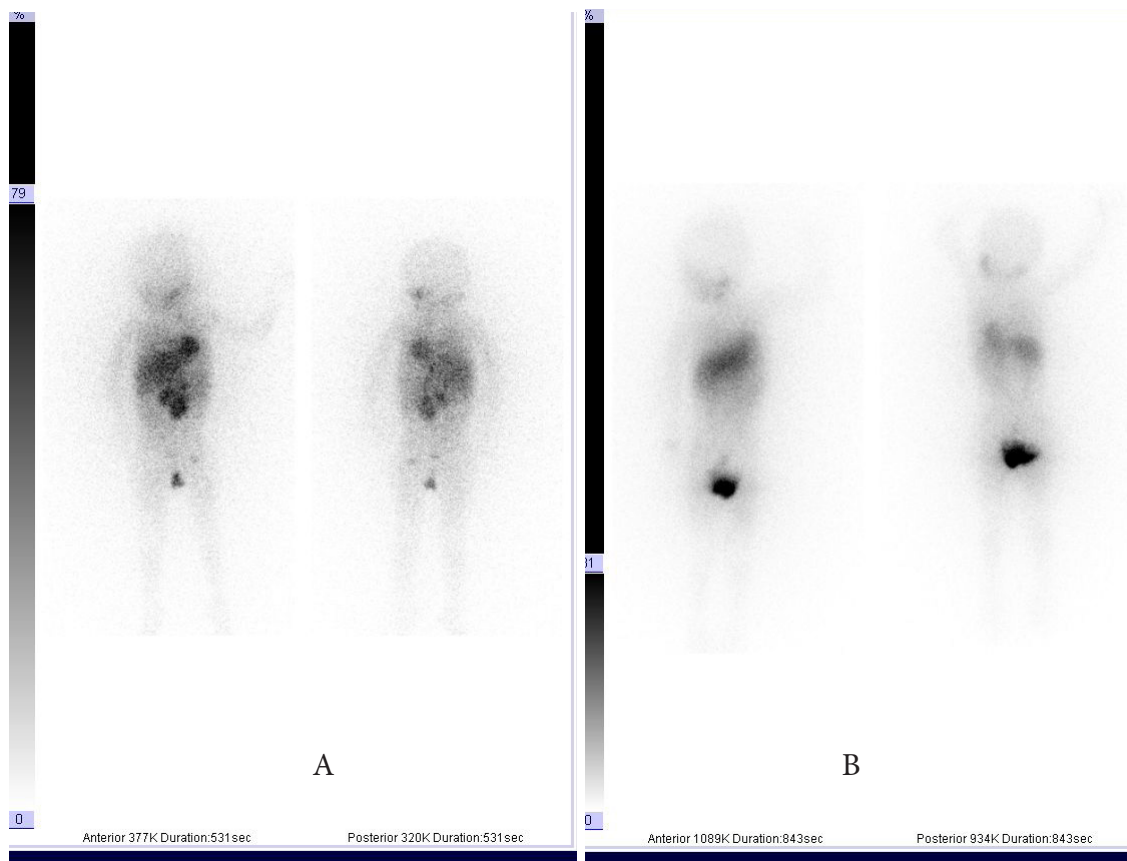
Slika 5. Planarni simpatičko-adrenalni scintigram učinjen pomoću mIBG-J-123 devojčice od 17 meseci primljene u bolnicu zbog protruzije oka; na scintigrafiju je upućena kao *neuroblastoma glandulae suprarenalis lateris sinistri* (bez kliničkog i histološkog stadijuma), povećanih nivoa LDH i urinarnih VMA i HVA. SIOPEN mekotkivni skor 2; SIOPEN osteomedularni skor 57; Kiri skor 17.



Slika 6. Planarni simpatičko adrenalni scintigram pomoću mIBG-J-123 devojčice od 15 m. na inicijalnoj scintigrafiji; registrovana kao neuroblastom diferencirajućeg podtipa u 2b INSS kliničkom, odnosno u L2 INRG stadijumu rizika; u kliničkoj slici prisutni opsoklonus i nistagmus, bez umnoženog MYCN onkogeno; povećani nivoa NSE i urinarnih VMA i HVA; **A.** SIOPEN mekotkivni skor **1**; SIOPEN osteomedularni skor **0**; Kiri skor **1**. **B.** SIOPEN mekotkivni skor **0**; SIOPEN osteomedularni skor **0**; Kiri skor **0**.



Slika 7. Planarni simpatičko adrenalni scintigram pomoću mIBG-J-123 dečaka od 12 m. pri postavljanju dijagnoze; registrovan kao neuroblastom diferentovanog podtipa povoljne prognoze u 4. INSS kliničkom stadijumu; MYCN negativan, uz prisutne ćelije neuroblastoma u bioptatu koštane srži; započeta terapija po COJEC protokolu pre prve scintigrafije (A). **A.** SIOPEN mekotkivni skor **1**; SIOPEN osteomedularni skor **0**; Kiri skor **1**. **B.** SIOPEN mekotkivni skor **2**; SIOPEN osteomedularni skor **0**; Kiri skor **2**. **C.** SIOPEN mekotkivni skor **1**; SIOPEN osteomedularni skor **0**; Kiri skor **1**.



Slika 8. Planarni simpatičko adrenalni scintigram pomoću mIBG-J-123 devojčice od 34 m. na prvoj scintigrafiji (A); neuroblastom slabo diferentovanog podtipa nepovoljne prognoze, u 4. Kliničkom INSS stadijumu, MYCN pozitivan, bez ćelija neuroblastoma u bioptatu koštane srži, povećanih nivoa LDH, NSE, s-feritina i urinarnih VMA i HVA. **A:** SIOPEN mekotkivni skor 2; SIOPEN osteomedularni skor 0; Kiri skor 2. **B:** postterapijski (COJEC) SIOPEN mekotkivni skor 0; SIOPEN osteomedularni skor 0; Kiri skor 0

Tabela 1. Distribucija pacijenata po kliničkom stadijumu bolesti, histološkoj vrsti neuroblastoma i dijagnostičkim nalazima

	N	N	%
klinički stadijum (INSS)			
1		8	10,5
2		4	5,3
3	63	10	13,2
4		40	52,6
4s		1	1,3
nalaz mijelograma			
patološki	39	12	15,8
normalan		27	35,5
patohistološka dijagnoza (INPC)			
nediferentovan nepovoljan		9	11,8
nediferentovan povoljan		1	1,3
slabo diferentovan nepovoljan		13	17,1
slabo diferentovan povoljan	50	15	19,7
ganglioneuroblastom		5	6,6
ganglioneuroblastom, nodularni		2	2,6
neklasifikovan nb		5	6,6
operacija			
operisan	51	45	59,2
neoperisan		6	7,9
EHO			
patološki	70	67	88,2
normalan		3	3,9
CT			
patološki	63	62	81,6
normalan		1	1,3
VMA ₁			
patološki	63	43	56,6
normalan		20	26,3
HVA ₁			
patološki	48	32	42,1
normalan		16	21,1
VMA ₂			
patološki	11	4	9,2
normalan		7	5,3
HVA ₂			
patološki	7	2	2,6
normalan		5	6,6
umnoženost NMYC onkogeno			
prisustvo	27	7	9,2
odsustvo		20	26,3
ferritin			
povećan	32	16	21,1
normalan		16	21,1
NSE			
povećan	26	24	31,6
normalan		2	2,6
LDH			
povećan	36	28	36,8
normalan		8	10,5

Tabela 2. Uzrast pacijenata na scintigrafiji

redosled scintigrafije	srednji uzrast pacijenta (mesec)
prva scintigrafija	38
druga scintigrafija	46,5
treća scintigrafija	68
četvrta scintigrafija	81
peta scintigrafija	158
šesta scintigrafija	150

Tabela 3. Povezanost meko-tkivnog i osteomedularnog SIOPEN skora sa nivoom VMA i HVA u urinu, brojem kopija MYCN onkogeno, tumorskim markerima feritinom, LDH i NSE, prisustvom ćelija neuroblastoma u bioptatu koštane srži, histološkom vrstom neuroblastoma

	SIOPEN skor, Meko tkivo	SIOPEN skor, kost
Biopsija koštane srži		
pozitivna srednja v. ± S.D. madiana (opseg)	0,58 ± 0,79 0 (0 - 2)	18,08 ± 20,38* 0 (0 - 55)
negativna srednja v.±S.D. madiana (opseg)	0,89 ± 0,89 1 (0 - 3)	1,44 ± 7,31* 0 (0 - 38)
VMA		
Pozitivna srednja v.±S.D. madiana (opseg)	0,53 ± 0,735 0 (0 - 2)	8,74 ± 20,38* 0 (0 - 55)
Negativna srednja v.±S.D. madiana (opseg)	1,0 ± 1,26 1 (0 - 4)	0,15 ± 0,5 0 (0 - 2)
HVA		
Pozitivna srednja v.±S.D. madiana (opseg)	0,56 ± 0,8 0 (0 - 2)	8,97 ± 17,35 0 (0 - 57)
Negativna srednja v.±S.D. madiana (opseg)	0,81 ± 1,17 0 (0 - 3)	1,13 ± 4,24 0 (0 - 17)
MYCN		
Pozitivna srednja v.±S.D. madiana (opseg)	0,86 ± 0,69 1 (0 - 2)	6,29± 11,93 0 (0 - 31)

	SIOOPEN skor, Meko tkivo	SIOOPEN skor, kost
Negativna srednja v.±S.D. madiana (opseg)	0,65 ± 0,93 0 (0 - 3)	4,2 ± 13,28 0 (0 - 55)
Ferritin		
Pozitivan srednja v.±S.D. madiana (opseg)	0,94 ± 0,85 1 (0 - 4)	8,69 ± 15,75 0 (0 - 55)
Negativan srednja v.±S.D. madiana (opseg)	1,0 ± 1,55 1 (0 - 4)	8,06 ± 18,26 0 (0 - 57)
LDH		
Pozitivna srednja v.±S.D. madiana (opseg)	0,75 ± 1,00 0,5 (0 - 4)	10,11 ± 18,17 0 (0 - 57)
Negativna srednja v.±S.D. madiana (opseg)	0,75 ± 0,71 1 (0 - 2)	0 ± 0 0 (0 - 0)
NSE		
Pozitivna srednja v.±S.D. madiana (opseg)	0,63 ± 0,77 0 (0 - 2)	6,54 ± 15,99 0 (0 - 55)
Negativna srednja v.±S.D. madiana (opseg)	1,0 ± 0 1 (1 - 1)	0,5 ± 0,71 0,5 (0 - 1)
Histološki stadijum, srednja v.±S.D, mediana (opseg)		
NB nediferentovan nepovoljne prognoze	0,75±1,49 0(0-4)	9,8±18,35 0(0-55)
NB slabo diferentovan nepovoljne prognoze	0,55±0,93 0(0-3)	5,77±11,55 0(0-35)
NB slabo diferentovan povoljne prognoze	0,45±0,93 0 (0-3)	0,13±0,34 0(0-1)
Ganglioneuroblastoma	0,25±0,5 0 (0-1)	0±0 0(0-0)
Ganglioneuroblastom nodularni	0,5±0,71 0,5(0-1)	0±0 0(0-0)
NB neklasifikovani	1,4±1,95 0(0-4)	6,2±13,864 0(0-31)

Tabela 4. Povezanost Kiri skora sa meko-tkivnim i osteomedularnim SIOPEN skorom

KIRI skor	N	SIOPEN meko-tkivni skor	p	SIOPEN koštani skor	p
I scintigrafija	75	0,691	< 0,001	0,676	< 0,001
II scintigrafija	31	0,715	< 0,001	0,470	0,008
III scintigrafija	20	0,509	0,022	0,656	0,002
IV scintigrafija	7	0,491	0,263	0,676	0,096
V scintigrafija	3	0,866	0,333	0,866	0,333

Tabela 5. Slaganje nivoa VMA u urinu sa nivoom HVA u urinu

VMA	HVA		
	normalne vrednosti	patološke vrednosti	
Normalne vrednosti, n (%)	11 (73)	4 (27)	15 (100)
Patološke vrednosti, n (%)	5 (15)	28 (85)	33 (100)
	16 (33)	32 (67)	48 (100)

Tabela 6. Slaganje meko-tkivnih sa osteomedularnim SIOPEN skorovima

SIOPEN skor meko tkivo	SIOPEN skor kost		
	normalne vrednosti	patološke vrednosti	
normalne vrednosti, n (%)	36 (90)	4 (10)	40 (100)
patološke vrednosti, n (%)	25 (69)	11 (31)	36 (100)
	61 (80)	15 (20)	76 (100)

Tabela 7. Slaganje osteomedularnih sa meko-tkivnim SIOPEN skorovima

SIOPEN skor meko tkivo	SIOPEN skor kost		
	normalne vrednosti	patološke vrednosti	
normalne vrednosti, n (%)	31 (94)	2 (6)	33 (100)
patološke vrednosti, n (%)	13 (30)	30 (70)	43 (100)
	44 (58)	32 (42)	76 (100)

5. DISKUSIJA

5.1. Pol i uzrast bolesnika

Studijom je obuhvaćena nehomogena grupa ispitanika sa sumnjom na neuroblastom ili dokazanim neuroblastomom, širokog raspona uzrasta do 11,2 godine. Neuroblastom se generalno javlja u dece između rođenja i 6. godine života gde je medijana uzrasta pri postavljanju dijagnoze 573 dana (18,8 meseci) (55, 56). Po podacima ENSG registra novootkrivenih pacijenata (European Neuroblastoma Study Group; ENSG Survey) osnovanog 1982. godine da bi se ustanovile demografske karakteristike neuroblastoma u delu zapadne Evrope, a u kojem je 11 godina učestvovalo 30 centara, 90% obolelih se otkrije do šeste godine starosti. Broj novootkrivenih neuroblastoma opada kako uzrast raste tako da se posle desete godine života otkrije svega 0,5%. Medijana uzrasta u kojem se otkriva neuroblastom, u ovom uzorku od 1277 pacijenata je bila 26 meseci. Kač sa saradnicima, na uzorku od 1392 ispitanika određuje medijanu uzrasta od 1,3 godine. Uzrast je jedan od statistički najznačajnijih nezavisnih prediktivnih faktora rizika. U radovima je jasno pokazano da je ukupno petogodišnje preživljavanje dece mlađe od godinu dana 94%, dok deca uzrasta između 1 i 4 godine preživljavaju u 60% , odnosno u 55% slučajeva ako su starosti između 5 i 9 godina (3, 55, 56, 57).

Medijana uzrasta u našem uzorku (23, 5 meseci) je između ove dve vrednosti koje su računane na mnogo većim uzorcima pacijenata (Grafikon 2). Ona je nešto veća nego što je srednji uzrast dece obolele od neuroblastoma što se objašnjava time da je kod većine dece predočene scintigrafiji pomoću mIBG bila već postavljena dijagnoza neuroblastoma ili su praćena u smislu procene uspeha lečanja. Takođe, dominantni deo uzorka su činila deca u četvrtom kliničkom stadijumu čija je incidence inače najveća među INSS kliničkim stadijumima, a koja su podvrgnuta scintigrafiji pomoću mIBG u starijem uzrastu, a ne u trenutku postavljanja dijagnoze (5).

Deca sa dokazanim neuroblastomom su bila svrstana u 5 kliničkih i 7 patohistoloških stadijuma bolesti (Grafikon 3). Bilo je nešto više devojčica nego dečaka (Grafikon 1), što je u skladu sa rezultatima dosadašnjih epidemioloških studija neuroblastoma koji ukazuju na nešto veći ukupni broj obolelih devojčica koje dominiraju u grupi nižih kliničkih stadijuma, dok su dečaci značajno brojniji u uzrastu mlađem od godinu dana, a u 4. kliničkom stadijumu (3, 5, 58).

5.2. Klinički i histološki stadijum bolesti

5.2.1. *Klinički stadijum određen na osnovu INSS kriterijuma*

Klinički stadijum bolesti naših pacijenata određivan je na osnovu INSS kriterijuma. Najveći broj scintigrafija pomoću mIBG je učinjen kod dece u 4. kliničkom stadijumu (40/76). Predominantnost 4. kliničkog stadijuma u ovoj studiji se može objasniti na sledeći način: incidenca 4. kliničkog stadijuma je najveća među INSS stadijumima bolesti, a kako je mIBG scintigrafija vrlo senzitivna ali i skup test, bio je primenjen kod pacijenata koji su praćeni u tercijarnim zdravstvenim ustanovama gde su primani najčešće u odmaklom stadijumu bolesti. Kako je glavno obeležje 4. kliničkog stadijuma prisustvo metastaza u koštanoj srži koje se najsenzitivnije detektuje simpatičko-adrenalnom scintigrafijom pomoću mIBG, to je statistički značajna povezanost između ovog INSS stadijuma bolesti i skeletnog SIOOPEN skora u našem uzorku pokazana kako se očekivalo.

Naša studija nije pokazala povezanosti između meko-tkivnog SIOOPEN „skora“ i kliničkog stadijuma bolesti što se može objasniti mali brojem pacijenata kod kojih je adrenalno-simpatička scintigrafija pomoću mIBG učinjena pre bilo koje terapijske intervencije (operacije pre svih; mali broj „inicijalnih“ scintigrafija) kao i zbog malog broja pacijenata koji imaju metastaze u mekom tkivu (Tabela 3).

5.2.2. *Histološki stadijum neuroblastoma određen na osnovu INPC kriterijuma*

Brojne studije su pokazale da je INPC sistem kriterijuma vrlo senzitivna (90,9%), mada mu je specifičnost niska (50,8%), te da ovaj sistem kriterijuma ima značajan uticaj na ishod lečenja kod obolelih od neuroblastoma. Burges je sa saradnicima, u studiji od 209 pacijenata iz španskog Nacionalnog registra za neuroblastoma, određivao prognostičku snagu INPC kriterijuma. U ovoj grupi je bilo 61% bolesnika sa nepovoljnim histološkim karakteristikama neuroblastoma od kojih je 2/3 umrlo uz srednje vreme preživljavanja od 33 meseci. Od 54 bolesnika u 4.kliničkom stadijumu, sa srednjom stopom preživljavanja od 35 meseci, oko 60% je umrlo. Ovaj autor zaključuje da pacijenti u 4. kliničkom stadijumu bolesti uz nepovoljni histološki oblik neuroblastoma imaju loš ishod bolesti. LNSE grupa (Localised Neuroblastoma European Study Group) je slično Burgesu, pokazala da INPC kriterijumi imaju značajan uticaj na prognozu pacijenata u 2b INSS stadijumu (59, 60, 61, 61).

Patohistološki stadijum neuroblastoma određivan pomoću INCP kriterijuma, u našoj studiji nije pokazao povezanost sa SIOPEN skorovima planarne mIBG scintigrafije. Ovo se može objasniti time što su histološki tipovi tumora razvrstani u 7 grupa što je previše za veličinu uzorka od 50 histološki identifikovanih neuroblastoma (Tabela 1), koliko ih je bilo u našoj studiji. Studije iz literaturnih podataka su histološke tipove grupisale najčešće u grupe povoljne i nepovoljne histologije, što se odnosilo na prognostički smisao INPC kriterijuma. „Razućenost“ stratifikacije uzorka može biti uzrok tome što povezanost nije uočena.

5.3. „Biološki markeri” tumora

Rili i saradnici su pokazali da se od 495 analiziranih članaka, u kojima su detektovali 195 različitih tumorskih markera, najveći broj bavi dijagnozom (288 članaka) i prognozom u neuroblastomu (260 članaka) (17). Značaj nekih tumorskih markera je poznat još od šesdesetih godina prošlog veka (63) dok se značaj, recimo, umnoženosti MYCN onkogeni sve češće potvrđivao u sve brojnijim radovima objavljivanim tek posle 1989.: pre 1985. nije objavljen ni jedan rad, od 1985-1989. 8 radova, a 62 rada su objavljena posle 1990. Ovi autori su pokazali da su umnoženost MYCN onkogeni, VMA, HVA, serumski ferritin(s-ferritin), NSE i LDH u vrhu tabele učestalosti analiza njihovih dijagnostičkih odnosno prognostičkih mogućnosti. Zato ne iznenađuje što su određivanje nivoa VMA i HVA u urinu, nivoa LDH, NSE i s-ferritina u krvi, prisustva umnoženog NMYC onkogeni u ćelijama neuroblastoma, nalaz biopsije kosne srži (mijelogram) kao i INSS i INPC klasifikacija bolesti postali standardni deo dijagnostičkog algoritma neuroblastoma koji vrlo precizno definišu samu bolest.

To je razlog zašto su ove varijable odabrane za poređenje sa skorovima semikvantitativnog SIOPEN bodovnog sistema: one su kao deo obaveznog dijagnostičkog postupka bile naj-dostupnije u istorijama bolesti naših malih pacijenata.

5.4. Patološki nivoi urinarne VMA i HVA

Literaturni podaci ukazuju na veoma dobre dijagnostičke mogućnosti urinarnih nivoa VMA i HVA kao tumorskih markera. U hitnim situacijama kao što su koagulopatije ili kada je ugroženo disanje, test na urinarne kateholamine, čija ekskrecija ne varira u dnevnom ritmu, može biti jedini test koji se bezbedno izvodi ne bi li se započelo sa terapijom. (55) Urinarni kateholamini služe i za diferencijalnu dijagnozu neuroblastoma u odnosu

na druge dečje tumore malih okruglih ćelija. Poznato je da se u ćelijama neuroblastoma kod kojih postoji povećana produkcija kateholamina, zbog manjka vezikula za njihovo skladištenje, ovi vrlo brzo metabolišu u VMA. Monsenjo je sa saradnicima pokazala u grupi od 395 dece da se nivoi urinarnih kateholamina značajno razlikuju kod obolelih od neuroblastoma u odnosu na kontrolnu grupu, te da se pri optimalnom pragu ROC krive test za VMA i HVA dostižu specifičnost od 97% i 96% za senzitivnost od 100% u oba slučaja u uzrasnim grupama od 0-1godinu, 1-5 godina i 5-10 godina (64). Slične rezultate saopštava i Barko sa saradnicima koji je na uzorku od 926 pacijenata podeljenih u 8 uzrasnih grupa pokazao da je senzitivnost za testove urinarnih nivoa VMA odnosno HVA niža u obolele dece prvog i drugog kliničkog stadijuma (81,8% i 73,2%), a da se značajno povećava kod obolelih u 4. kliničkom stadijumu (95% za oba testa). Senzitivnost i specifičnost testa na urinarni VMA i HVA u 4S kliničkom stadijumu neuroblastoma dostiže i 100% (65) .

Povećani nivoi kateholaminskih metabolita u urinu se sreću u skoro 60% bolesnika sa metastazama. Kod bolesnika sa lokalizovanim neuroblastomom (niži klinički stadijumi) ti nivoi su normalni. Pokazalo se takođe, da su VMA i HVA u urinu najsenzitivniji od svih tumorskih markera pri detekciji recidiva metastatske bolesti (66). Ispitanici u našoj studiji koja je najvećim delom obuhvatala pacijente u 4. kliničkom stadijumu (52,6%) najčešće su imali povećane metabolite kateholamina u urinu (85%) (Tabela 5) na prvoj scintigrafiji. Povezanost povećanih nivoa VMA u urinu i osteomedularnog „skora“ na planarnoj mIBG scintigrafiji (Tabela 3) može se objasniti time da je manje diferentovani neuroblastom skloniji je metastaziranju koje se detektuje vrlo senzitivnim mIBG testom, koji pokazuje optimalnu senzitivnost u detekciji metastaza u koštanoj srži. Ovaj nalaz potvrđuje značaj određivanja metabolita kateholamina u urinu i dodatno objašnjava veće SIOPEN skorove u pacijenata sa povećanim nivoom VMA.

5.5. Serumski nivo neuron specifične enolaze

Neuron specifična enolaza, izomer glikolitičkog enzima kojeg sintetišu neuroni i neuroendokrine ćelije, je statistički značajno povećana u većim kliničkim stadijumima bolesti. Išiguro je sa saradnicima prvi pokazao da ovaj enzim može biti povećan kod obolelih od feohromocitoma, neuroblastoma i drugih tumora malih okruglih ćelija. Zelcer, a potom i Kuper pokazuju da se serumski nivoi NSE statistički značajno razlikuju između nižih i viših kliničkih stadijuma neuroblastoma i da su povećani u višim stadijumima neuroblastoma. Kuper dalje uočava razliku između nivoa NSE kod neuroblastoma kod kojeg je povećan i ganglioneuroma kod kojeg je normalan. Pokazalo se da je povećan nivo NSE je bolji u detekciji metastaskog relapsa od povećanog nivoa laktat dehidrogenaze LDH (21, 22, 67, 68, 69, 70).

5.6. Nivo serumskog feritina

U studiji Hana i saradnika feritin pozitivno korelira sa kliničkim stadijumom bolesti. Kod 34 njihovih bolesnika sa neuroblastomom, čije su vrednosti serumskog feritina grupisane u normalne (< 75ng/ml), intermedijarne (75-142 ng/ml) i povećane (>142 ng/ml) se pokazalo da za 36 meseci duže preživljava grupa sa nisko normalnim vrednostima feritina. (22) Analiza 8 800 obolelih od neuroblastoma (International Risk Group Analytic Cohort) je pokazala da je serumski ferritin (s-ferritin) nezavisni prognostički faktor u proceni EFS kako u opštoj populaciji obolelih od neuroblastoma, tako i kod visokorizičnih pacijenata. Pacijenti stariji od 18 meseci u 4. kliničkom stadijumu sa nivoom s-ferritina većim od 92 ng/ml imaju petogodišnje preživljavanje u svega 20% slučajeva. Ista studija je pokazala da pacijenti u 1., 2., 3. 4S kliničkom stadijumu sa vrednostima LDH većim od 587 U/L za 20% kraće žive nego oni čije su vrednosti LDH manje od 587 U/L. Na kraju, studija Kona i saradnika zaključuje da iako su s-ferritin, NSE i LDH nezavisni prediktori u podgrupama obolelih od neuroblastoma, oni su bolji markeri raširenosti bolesti nego markeri biologije tumora. Pokazalo se da su ovi tumorski markeri slabiji prognostički faktori te je njihova primena u smislu kliničke stratifikacije rizika i planiranja terapije prevaziđena drugim statističku robusnijim genetskim i biološkim markerima (72).

Zbog svega ovoga pretpostavilo se da će postojati povezanost između nivoa s-ferritina, NSE, LDH i SIOPEN skorova. Takva povezanost nije potvrđena u našoj studiji (Tabela 3) što se pripisuje heterogenoj grupi ispitanika: malim brojem bolesnika niskog kliničkog stadijuma bolesti, malim brojem inicijalnih scintigrafija, tj. malim brojem bolesnika u kojih je nivo ovih tumorskih markera određivan pre bilo koje terapijske intervencije, kao i nestandardizovanim dijagnostičkim protokolom koji je primenjen kod pacijeneta podvrgnutih adrenalno-simpatičkoj scintigrafiji.

5.7. Prisustvo ćelija neuroblastoma u bioptatu (aspiratu) koštane srži

Hartman je sa saradnicima na uzorku od 218 pacijenata u 4. kliničkom stadijumu od kojih je 169 imalo skeletne metastaze, a 203 pozitivan nalaz biopsije koštane srži, procenjujući scintigrafijom pomoću mIBG zahvaćenost skeleta neuroblastomom posle terapije, pokazao da, odsustvo koštanih metastaza na adrenalno-simpatičkoj scintigrafiji učinjenoj pomoću mIBG, pored urasta mlađeg od 24 meseci i terapijske kombinacije busulfana - mefalana i visokodozne hemoterapije, predstavlja snažan i nezavistan pokazatelj povoljne prognoze ovih pacijenata (73). Nalazi scintigrafije pomoću mIBG, u studiji Parka i sarad-

nika koja testira diferentovansot metastatskih neuroblasta u koštanoj srži , izvedenoj u 42 od 51 pacijenta, su u potpunosti bili saglasni sa nalazom bopsije koštane srži (negativna prediktivna vrednost mIBG scintigrafije je bila 100%). Ova studija je takođe pokazala da se novi urinarnih kateholamina nisu razlikovali među pacijentima sa diferentovanim neuroblastoma u poređenju sa pacijentima koji su u koštanoj srži imali nediferentovane neuroblaste. Takođe, nije postojala razlika izmedju pacijenata sa diferencirajućim i “nediferencirajucim” neuroblastima u pogledu starosti, nivoa tumorskih markera (LDH, NSE, s-feritina,) nivoa urinarnih VMA i HVA. Značajno duze preživljavanje se uočilo u grupi bolesnika sa diferencirajućim neuroblastoma (74). Neuroblasti primarnog tumora se od ćelijske linije neuroblasta koji infiltrišu koštanu srž se razlikuju u ekspresiji oko 1000 gena. Kod metastatskih ćelija smanjena je ekspresija uglavnom gena koji su uključeni u regulaciju ćelijskog međućelijskog kontakta dok je povećana ekspresija gena koje obično eksprimiraju ćelije normalne koštane srži kao što su geni za mijeloperoksidazu, antigen mijeloidne diferencijacije, geni za neke citokine itd (75).

SIOPEN skeletni „skor” je u našem uzorku bio veći kod bolesnika sa pozitivnim nalazom biopsije kosne srži („pozitivan mijelogram”) (Tabela 3). To je u skladu sa navedenim literaturnim podacima koji ukazuju da je mIBG scintigrafija vrlo specifična i senzitivna u detekciji infiltracije kostiju i koštane srži te da ima veću senzitivnost nego citološka analiza rutinski dobijenih boptata koštane srži.

5.8. Prisustvo povećanog broja kopija MYCN onkogeni u ćelijama neuroblastoma (umnoženost MYCN onkogeni)

MYCN gen se nalazi na kratkom kraku drugog hromozoma humanog genoma (2p24) i ima značajnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa simpatičkih ganglija i ćelija neuralnog grebena. Prevelika ekspresija ovog gena ubrzava malignu alteraciju u neuroblastomu. Uumnoženost ovog onkogeni se sreće u 16-24% obolelih od neuroblastoma i jedan je od standardnih tumorskih biomarkera. Siger je prvi pokazao, pre trideset godina, u studiji 89 dece, da postoji značajna povezanost umnoženih kopija MYCN onkogeni i viših kliničkih stadijuma bolesti: kod dvoje od 24 dece sa lokalizovanim neuroblastoma a koja su imala umnožen MYCN došlo je do progresije bolesti; ni jedno od 5 dece u 4S kliničkom stadijumu nije imalo umnožen MYCN onkogen. Slične rezultate sopštavaju Alvarado i Kacensstajjn (55, 76, 77, 78, 79, 80). Minard i saradnici su nedvosmisleno pokazali da je period do progresije bolesti, relapsa ili smrti iz bilo kojeg razloga (EFS: event-free survival) značajno duži kod odojčadi do godinu dana uzrasta, ukoliko nemaju umnožen MYCN onkogen i koštane metastaze. U ovoj studiji najjači prognostički faktor je bilo prisustvo koštanih metastaza (81). Ihara je potvrdio i pokazao da se umnoženost MYCN onkogeni češće

sreće u višim kliničkim stadijumima bolesti, te da oboleli sa umnoženim MYCN imaju i značajno veće serumske nivoe NSE i feritina, kao i značajno veće nivoe urinarnih kateholamina (82).

Broj pacijenata sa umnoženim MYCN onkogenom je u našoj grupi ispitanika bio sličan kao i u grupi Ihare i saradnika (u našoj studiji 7/27 vs. 13/33) (Tabela 1) (Tabela 3). Umnoženost MYCN onkogena, određivana metodom fluorescentne hibridizacije in situ (FISH), koja je pouzdan indikator loše prognoze u pacijenata sa neuroblastomom, a čija klinička uloga još nije sasvim jasna, značajno i obrnuto proporcionalno korelira sa prognozom u ovih bolesnika. Uočeno je takođe da pacijenti sa neuroblastomom kod kojeg postoji umnožen MYCN onkogen pokazuju izvestan obrazac „ograničenog i fokalnog“ nakupljanja radiofarmaka pri mIBG scintigrafiji.(83) Na osnovu Iharinig rezultata o povezanosti patoloških vrednosti NSE, serumskog feritina i urinarnih kateholamina sa povećanim brojem kopija MYCN onkogena, pretpostavka je da bi se nalaz povećanog broja kopija ovog onkogena u ćelijama neuroblastoma, mogla povezati na sličan način i sa SIOPEN skorovima. Očekivalo bi se da SIOPEN skor stoga bude povezan i sa prisustvom većeg broja MYCN kopija u ovom uzorku pacijenata. Takva povezanost nije uočena u ovoj studiji što se objašnjava malim i nehomogenim brojem ispitanika.

Fendler je sa saradnicima poredio nalaze tomografske jednofotonske adrenal-simpatičke scintigarije (mIBG SPECT) koje je procenjivao koristeći odnos nakupljanja radiofarmaka u tumoru i jetri (odnos tumor-jetra). Nalaze je potom poredio sa histološkim podtipovima neuroblastoma kod 47 pacijenata srednjeg uyrasta 2 godine i 6 meseci od kojih je 70% bilo u klinickom stadijumu 3 i 4. On je našao blisku povezanost između intenziteta nakupljanja benzilgvanidina i histološkog podtipa tumora (84). Okujama, u studiji od 23 bolesnika, nije našao povezanost intenziteta nakupljanja radiofarmaka sa histološkim stadijumom neuroblastoma (85). Brans je sa saradnicima upoređivao planarne scintigrame učinjene pomoću mIBG, koristeći vizualnu skalu od 7 tačaka kod 26 bolesnika sa neuroblastomom i nije našao povezanost između intenziteta nakupljanja radiofarmaka i histologije tumora. Predložio je zato upotrebu semikvantitativnog procenjivanja planarnog scintigrama (86).

Naša studija je bodovala planarne scintigrame dobijene pomoću mIBG-J-131 ili pomoću mIBG-J-123 (89 odnosno 54 scintigrama) iako literaturni podaci ukazuju da je Kiri bodovni „skor“ planarne scintigrafije pomoću mIBG-J-123 scintigrafije senzitivniji (87). S obzirom da je benzilgvanidilna scintigrafija obavezan test pri postavljanju dijagnoze kao i pri praćenju ishoda lečenja kod dece obolele od neuroblastoma, izbor radiofarmaka je prevashodno zavisio od njegove trenutne dostupnosti. Procenjeno je da je veći rizik po decu da se ne učini ovo nuklearno-medicnsko testiranje, nego što je radijacioni rizik od radionuklida J-131. U svih ispitanika je kao premedikacija primenjivan Solutio Lugoli tri dana pre snimanja i na sam dan snimanja.

Spora intravenska aplikacija radifarmaka nije ni u jednog ispitanika izazvala neželjene adrenergičke i alergijske manifestacije.

Aplikovana aktivnost („doza“) je bila u skladu sa preporukama vodiča za radiojodidnu scintigrafiju pomoću mIBG, Evropske Asocijacije za nuklearnu medicinu (EANM), o najmanjoj dovoljnoj dozi za scintigrafsko ispitivanje (45, 54).

5.9. Semikvantitativni bodovni sistemi u proceni scintigrama učinjenih pomoću mIBG

5.9.1. SIOPEN semikvantitativni bodovni sistem

Dekarolis je u studiji 147 planarnih adrenalno simpatičkih scintigrama pomoću mIBG-J-123 učinjenih u 58 pacijenta starijih od godinu dana sa neuroblastomom u 4. kliničkom stadijumu, procenjujući ih pomoću Kiri i SIOPEN bodovnog sistema, pokazao značajnu moć inicijalnog osteomedularnog skora SIOPEN bodovnog sistema u prognozi ranog relapsa bolesti. Takođe je pokazao da se distribucija skorova oba bodovna sistema u odnosu na glavne faktore prognoze ishoda (MYCN status, uzrast, rani relaps bolesti ili smrt pacijenta) nije razlikovala među pacijentima. Pacijenti kod kojih je bolest recidivirala u okviru 18 meseci su imali veće skorove dobijene po oba bodovna sistema posle 6 ciklusa hemoterapije. Studija je nedvosmisleno pokazala odličnu interobserversku pouzdanost SIOPEN osteomedularnog skora koja ga, kao i čvrsta linearna povezanost skorova oba bodovna sistema, kvalifikuje za široku kliničku upotrebu. Ova značajna korelacija sa skorovima Kiri bodovnog sistema, najviše testiranog sistema bodovanja planarne adrenalno-simpatičke scintigrafije pomoću mIBG, preporučuje još jednom uvođenje SIOPEN bodovnog sistema u svakodnevnu kliničku praksu. Dibia je na velikoj grupi od 648 dece u 4S i 4. kliničkom stadijumu neuroblastoma pokazao učestalost pojedinih metastaskih mesta, kao i da mesto metastaze korelira sa uzrastom, biološkim osobinama tumora i dužinom preživljanja ali nije nezavistan prognostički faktor. Rezultati njegove studije su ukazali na potrebu testiranja i mekotivnog skora SIOPEN bodovnog sistema (88, 89).

Po saznanju autora studije, ovo je prvi put da su dva dela istog semikvantitativnog bodovnog sistema procenjivani jedan u odnosu na drugi.

Naša studija je ispitujući oba skora SIOPEN bodovnog sistema pokazala da postoji visoko statistički značajna povezanost između mekotivnog i koštanog segmenta SIOPEN semikvantitativnog „skora“ što se objašnjava metastatskom prirodom nekih oblika neu-

roblastoma. Veći koštani SIOPEN skorovi imaju uočljivije češće veće mekotkivne SIOPEN skorove, dok se za obrnutu situaciju ne može isto tvrditi. Ipak, 31% „pozitivnih“ mekotkivnih SIOPEN bodova je pozitivno i pri bodovanju koštanog segmenta mIBG planarne scintigrafije što jeste statistički značajno. Odlično slaganje oba bodovna sistema (Kiri i SIOPEN) planarnog mIBG scintigrama i u našoj studiji se objašnjava činjenicom da Kiri sistem ima u sebi inkorporiran i mekotkivni skor.

6. OGRANIČENJA STUDIJE

Rezultati studije su dobijeni na malom uzorku koji nije stratifikovan po uzrastu. Uključeni su scintigrami dobijeni pomoću radifarmaka (metajodobenzilgvanidina) obeleženog različitim izotopima joda (J-123 i J-131) iako je poznato da je mIBG-J123 senzitivniji test i nosi manji rizik od ozračivanja. Naranjo sa saradnicima je saopštio da ne postoji razlika u Kiri skorovima izračunatim na mIBG-J123 ili na mIBG-J131 planarnim scintigramima. (49) Na osnovu ovog saznanja odlučeno je da se u studiju uvrste scintigrami dobijeni pomoću različitih radionuklida.

Biološki markeri kao ni histološka vrsta neuroblastoma nisu bili poznati kod svih pacijenata čiji su scintigrami bodovani.

U studiji je bilo svega nekoliko inicijalnih scintigrama, a većina scintigrama je dobijena posle neke od terapijskih intervencija: operacije ili hemioterapije. To je proizvelo svega nekoliko scintigrama na kojima su prisutne metastaze na drugom mestu van osteomedularnih regija te je i povezanost kliničkog stadijuma i meko-tkivnog SIOPEN skora izostala. Ovo je donekle potkrepljeno nalazom Di Boaa koji je u grupi od 434 dece u 4. kliničkom stadijumu bolesti, starijih od godinu dana pokazao predominantno prisustvo osteomedularnih metastaza. (89)

7. ZAKLJUČNA RAZMATRANJA

Pojava SIOPEN bodovnog sistema 2009. godine, još jednog u nizu semikvantitativnih bodovnih sistema u proceni adrenalno-simpatičke scintigrafije kod dece obolele od neuroblastoma, nametnula je potrebu da se analizom dobijenih vlastitih rezultata proceni mesto ovog sistema u uslovima naše nuklearnomedicinske prakse. Ovaj bodovni sistem formira dva „skora“: mekotkivni, koji ocenjuje patološko nakupljanje radiofarmaka mIBG u mekom tkivu obolelog i skeletni (osteomedularni) „skor“, koji ocenjuje patološko nakupljanje radiofarmaka u skeletu i koštanoj srži obolelog. Sistem je dizajniran pre svega za evaluaciju scintigrama kod visoko-rizičnih pacijenata, tj. kod pacijenata kod kojih su metastazama neuroblastoma zahvaćeni kost i koštana srž. Zato ne iznenađuje što se u literaturi nalaze podaci o kliničkom testiranju samo skeletnog skora.

Kako je plan da se ovaj sistem bodovanja scintigrama dobijenih pomoću mIBG uvrsti u rutinsku upotrebu u Centru za nuklearnu medicinu Kliničkog centra Srbije, to smo testirali i njegov mekotkivni „skor“, te oba „skora“ uporedili sa „skorom“ bodovnog sistema „Kiri“ koji je najčešće ispitavan semikvantitativni sistem u kliničkom miljeu.

Dosadašnje iskustvo sa upotrebom mIBG –J-123 kao radiofarmakom izbora za simpatičko-adrenalnu scintigrafiju kod dece obolele od neuroblastoma (koji nam je dostupan unazad nekoliko godina), očekivano je bolje u odnosu na iskustvo sa mIBG-J-131. Smanjeno je vreme između aplikacije radiofarmaka i snimanja na gama kameri, smanjeno je ozračivanje pacijenata koje isporučuje radioizotop J-123, a dobijeni scintigrami su „interpretabilniji“.

Upotreba radionuklida J-123 za obeležavanje metajodobenzilgvanidina omogućila je da se kod ove dece učine i tomografski snimci upotrebom jednofotonske emisije kompjuterizovane tomografije (SPECT). S obzirom na to da je SPECT obavezan modalitet akvizicije kod rutinske simpatičko-adrenalne studije pomoću mIBG kod ovih pacijenata, to bi u doglednoj budućnosti bilo logično ispitati evaluacionu moć mekotkivnog „skora“ SIOPEN bodovnog sistema na tomografskim snimcima. Ovaj mekotkivni „skor“ pokazao bi svoju vrednost naročito u sagledavanju patološkog nakupljanja u jetri i na taj način dodatno rasvetlio dijagnostički i postterapijski metastaski obrazac nakupljanja radiofarmaka.

Neophodno je takođe, nakon što se stekne izvesno iskustvo u korišćenju SIOPEN semi-kvantitativnog bodovnog sistema u našem nuklearnomedicinskom radu, proceniti i uticaj subjektivnosti u interpretaciji scintigrama tj. odrediti interobserversku i intraobserversku pouzdanost „skorova“. Time bi sama simpatičko-adrenalna studija kao test dobila na pouzdanosti i preciznosti.

Ishod i kvalitet preživljavanja pacijenata su glavni ciljevi svakog lečenja pa i lečenja dece sa neuroblastomom. Zato se nameće potreba da se oba „skora“ SIOPEN bodovnog sistema testiraju i u tom smislu, tj. u uslovima sve većeg broja dece sa otkrivenim i lečenim neuroblastomom. S obzirom na sve bolje dijagnostičke (veći broj „bioloških“ markera neuroblastoma koji su dostupni za analizu pri postavljanju dijagnoze; precizna INSS i INPC kategorizacija pacijenata pri registraciji; članstvo u SIOPEN udruženju) kao i terapijske mogućnosti (uključujući i terapiju pomoću mIBG –J-131), uzorak za studiju bi bio kvalitetan po veličini i jasno stratifikovan.

8. ZAKLJUČCI

1. SIOPEN skorovi u osteomedularnom segmentu planarnog mIBG scintigrama su veći u dece obolele od neuroblastoma sa patološki povećanim nivoom VMA. 85% dece u 4. kliničkom stadijumu na prvoj planarnoj mIBG scintigrafiji ima povećan osteomedularni SIOPEN skor.
2. SIOPEN osteomedularni skor je veći u pacijenata u višem kliničkom stadijumu bolesti kao i kod pacijenata sa pozitivnim nalazom mijelograma.
3. Postoji povezanost između meko-tkivnog i osteomedularnog dela SIOPEN skora. 70% pacijenata sa pozitivnim osteomedularnim skorom imalo je i pozitivan meko-tkivni skor. 31% pacijenata sa pozitivnim meko-tkivnim skorom imalo je pozitivan i osteomedularni skor.
4. Postoji odlična linearna korelacija oba SIOPEN skora (osteomedularnog i meko-tkivnog) sa Kiri skorom planarnog mIBG scintigrama.
5. Povezanost između umnoženosti MYCN onkogeni i SIOPEN skorova nije uočena, verovatno zbog malog broja ispitanika testiranih na prisustvo MYCN amplifikacije.
6. SIOPEN skorovi nisu pokazali povezanost sa tumorskim markerima neuroblastoma u ovoj grupi ispitanika, kao ni sa histološkim stadijumom tumora koji je određivan po INCP kriterijumima.
7. Prva simpatičko-adrenalna scintigrafija pomoću mIBG se u dece obolele od neuroblastoma izvodi u zdravstvenoj ustanovi tercijarnog nivoa, najčešće u trenutku kada je dijagnoza na osnovu biohemijskih i histoloških pokazatelja već postavljena. MIBG scintigrafija se izvodi najčešće kod dece u 4. kliničkom stadijumu bolesti.

9. LITERATURA

1. Berthold F, Simon T. Clinical presentation. In: Cheung NK, Cohn S, editors. Neuroblastoma, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 2005; 63 -85
2. Bessho F. Incidence of neuroblastoma. Lancet 1999; 353: 70
3. Kaatsch P. Epidemiology of childhood cancer. Cancer Treat Rev 2010; 36: 277-285.
4. Schroeder H, Wachter J, Larsson H, Rosthøj S, Rechnitzer C, Petersen BL, et al. Unchanged incidence and increased survival in children with neuroblastoma in Denmark 1981-2000: a population-based study. Br J Cancer 2009; 100: 853–857.
5. Navalkele P, O’Dorisio MS, O’Dorisio TM, Zamba GK, Lynch CF. Incidence, survival, and prevalence of neuroendocrine tumors versus neuroblastoma in children and young adults: nine standard SEER registries, 1975-2006. Blood Cancer 2011; 56: 50-57.
6. Olshan AF. Epidemiology. In: Cheung NK, Cohn S, editors. Neuroblastoma. Springer – Verlag Berlin Heidelberg 2005;1- 6.
7. Marion CWH, Tashjian DB, Breur CK. Neuroblastoma update. Curr Opin Oncol 2004;17:19–23.
8. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis and treatment. Hematol Oncol Clin N Am 2010; 24: 65-86.
9. Shimada H, Nakagawa A. Pathology of the peripheral neuroblastic tumors. Lab medicine 2006; 37: 684-689.
10. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roland B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: Recommendations by the international neuroblastoma pathology committee. Cancer 1999; 86:349-363.
11. Ross RA. Cellular heterogeneity. In: Cheung NK, Cohn S, editors. Neuroblastoma, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 2005; 55 -61.
12. Schwab M. Molecular cytogenetics. In: Cheung NK, Cohn S, editors. Neuroblastoma, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 2005; 27-40.
13. Matthay KK. Neuroblastoma: a clinical challenge and biologic puzzle. C A Cancer J Clin. 1995; 45:179–192.

14. Shimada H, Ambros IM. Pathology of periferal neuroblastic tumors. In: Cheung NK, Cohn S, editors. Neuroblastoma, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 2005; 87-95.
15. Shimada H, Nakagawa A. Pathology of the periferal neuroblastic tumors Lab-medicine 2006; 37: 684-689.
16. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Strem DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castieberry RP. The international neuroblastoma pathology classification (the Shimada system) Cancer 1999; 86: 364-372.
17. Riley RD, Heney D, Jones DR, Sutton AJ, Lambert PC, Abrams KR, Young B, Wailoo AJ, Burchill SA. A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma. Clin Cancer Res 2004; 10 : 4 -12.
18. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine Metabolism : A contemporary view with implications for physiology and medicine. 2004; 56: 331–349.
19. Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. Physiol Rev 2009; 89: 535-605.
20. Sawada T. Screening methods for neuroblastoma. In: Neuroblastoma Tumor Biology and Therapy. CRC Press, 1990; 354-358.
21. Cooper EH, Pritchard J, Bailey CC, Ninane J. Serum neuron-specific enolase in children's cancer. Br J Cancer 1987; 56: 65-67.
22. Hann HWL, Levey HM, Evans AE. Serum ferritin as a Guide to therapy in neuroblastoma. Cancer Res 1980; 40: 1411-1413.
23. Di Cataldo A, Dau D, Conte M, Parodi S, De Bernardi B, Giuliano M, Pession A, Viscardi E, Luksch R, Castellano A, Bertuna G, Haupt R. Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. Diagnostic and prognostic markers in infants with disseminated neuroblastoma: a retrospective analysis from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. Med Sci Monit 2009; 15: 11-18.
24. Kushner B.H, Cohn KKM, Nai-Kong V.C, LaQualia MP, Haas-Kogan DA, Wolden SL, Grupp SA, Cheung IY, Ambros PF. Treatment of neuroblastoma. In: Neuroblastoma Cheung NK, Cohn S, editors. Neuroblastoma, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 2005; 123-192.
25. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma Lancet 2007; 369: 2106–2120.

26. Woods WG. Screening for neuroblastoma, In: Cheung NK, Cohn S, editors. Neuroblastoma, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 2005; 7-20.
27. Amundson GM, Trevenen CL, Mueller DL, Rubin SZ, Wesenberg RL. Neuroblastoma: a specific sonographic tissue pattern AJR 1987; 148: 943-945.
28. Brisse H, Edeline V, Couanet D, Zucker JM, Neuenschwander S. Strategie actuelle d'imagerie des neuroblastomes. J Radiol 2001; 82: 447-454.
29. Deitrich RB, Kangaroo H, Lenarsky C, Feig SA. Neuroblastoma : the role of MR imaging AJR 1987; 148: 937-942.
30. Boubaker A, Delaloye AE. Nuclear medicine procedures and neuroblastoma in childhood. Q J Nucl Med 2003; 47: 31-40.
31. Schilling FH, Bihl H, Jacobsson H, Ambros PF, Martinsson T, Borgström P, Schwarz K, Ambros IM, Treuner J, Kogner P. Combined (111)In-pentetreotide scintigraphy and (123)I-mIBG scintigraphy in neuroblastoma provides prognostic information. Med Pediatr Oncol 2000; 35: 688-691.
32. Kushner BH. Neuroblastoma: A Disease Requiring a Multitude of Imaging Studies. 2004; 11: 72-88.
33. Rubello D, Bui C, Casara D, Gross MD, Fig LM, Shapiro B , Functional Scintigraphy of the Adrenal Gland. Eur J Endocr 2002; 147: 13-28.
34. Shulkin BL, Wielend DM, Baro ME, Ungar DR, Mitchell DS, Dole MG. PET hydroxyephedrine imaging of neuroblastoma 1996; 37: 16-21.
35. ClinicalTrials .gov[study record detail]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine;ct2[updated 2014 December 02; cited 2014 December 3] Available from:<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02043899>
36. Sharp SE, Gelfand MJ, Shulkin BL. Pediatrics: diagnosis of neuroblastoma. Semin Nucl Med 2011; 41: 345-353.
37. Zhang H, Huang R, Pillarsetty N, Thorek DL, Vaidyanathan G, Serganova I, Blasberg RG, Lewis JS. Synthesis and Evaluation of 18F-labeled benzylguanidine analogs for targeting the human norepinephrine transporter. Eur J Nucl Med Mol Imag 2014;41: 322-332.
38. Suh M, Park HJ, Choi HS, So Y, Lee BC Lee WW. Case Report of PET/CT imaging of a patient with neuroblastoma using 18F-FPBG. Pediatrics 2014; 134: e1731 -e1734

39. Vallabhajosula S, Nikolopolou A. Radioiodinated metaiodobenzylguanidine (MIBG): Radiochemistry, biology and pharmacology. *Semin Nucl Med*; 41: 324-333.
40. Adreview-iobenguane I-123 injection: GE Healthcare, IL, Arlington Heights, Medi-Physics, Inc. March 2013
41. Tešić M, Ratković M, Dondur V, Jankov R. Kinetics of isotope exchange between [3-(iodophenyl)methyl]guanidine (mIBG) and [131I]-iodide. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 1992; 158: 183-191.
42. J131-MIBG (meta-iodobenzilguanidin) rastvor za dijagnostičku primenu (YVJ131/J10): Institut za nuklearne nauke „Vinča“, laboratorija za izotope, 2010.
43. Žagar I. Nuklearnomedicinske implikacije primene obeleženih derivata benzilgvanidina (doktorska disertacija) Beograd, Univerzitet u Beogradu 1994.
44. Koopmans KP, Neels ON, Kema IP, Elsinga PH, Links TP, de Vries EG, Jager PL. Molecular imaging in neuroendocrine tumors: molecular uptake mechanisms and clinical results. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009; 71:199-213.
45. Olivier P, Colarhina P, Fettich J, Fischer S, Froker J et al. Guidelines for radioiodinated MIBG scintigraphy in children. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: B45-50.
46. Vaidyanathan G, Zalutsky MR. No-carrier-added meta-[123I] iodobenzylguanidine: synthesis and preliminary evaluation. *Nucl Med Biol* 1995; 22: 61-64
47. Ady N, Zucker JM, Asselain B, Edeline V, Bonnin F, Michon J, Gongora R, Manil L. A new 123I- MIBG whole body scan scoring method -Application to the prediction of the response of metastases to induction chemotherapy in stage IV neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 256-261.
48. Yanik GA, Parisi MT, Shulkin BL, Naranjo A, Kreissman SG, London WB, Villablanca JG, Maris JM, Park JR, Cohn SL, McGrady P, Matthay KK. Semi-quantitative mIBG scoring as a prognostic indicator in patients with stage 4 neuroblastoma: a report from the Children's oncology group. *J Nucl Med*. 2013; 54: 541-548.
49. Naranjo A, Parisi MT, Shulkin BL, London WB, Matthay KK, Kreissman SG et al., "Comparison of 123I-Metaiodobenzylguanidine (MIBG) and 131I-MIBG Semi-Quantitative Scores in Predicting Survival in Patients with Stage 4 Neuroblastoma: A Report from the Children's Oncology Group.," *Pediatric Blood Cancer* 2011; 56: 1041–1045.

50. Matthay KK, Shulkin B, Ladenstein R, Michon J, Giammarile F, Lewington V, Pearson ADJ, Cohn SL. Criteria for evaluation of disease extent by 123I-metaiodobenzylguanidine scans in neuroblastoma: a report for the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Task Force *Br J Cancer*. 2010; 102: 1319–1326.
51. Frappaz D, Bonneau A, Chauvot P, Edeline V, Giammarile F, Siles S, Wioland M, Gomez F. Metaiodobenzylguanidine assessment of metastatic neuroblastoma: observer dependency and chemosensitivity evaluation. The SFOP Group. *Med Pediatr Oncol* 2000; 34: 237– 241.
52. Lewington V, Bar-Sever Z, Lynch T, McEwan AJB, Giammarile F, Staudenherz A, Shulkin BL, Ladenstein R. Development of a semi-quantitative mIBG reporting method system. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 53:808
53. Lewington V, Bar Sever Z, Lynch T, Giammarile F, McEwan A, Shulkin B, Staudenherz A , Ladenstein R (2009) Development of a new, semiquantitative I-123 mIBG reporting method in high risk neuroblastoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009; 36: 334
54. Notes for Guidance on the Clinical Administration of Radiopharmaceuticals and Use of Sealed Radioactive Sources .Produced by the Health Protection Agency for the Administration of Radioactive Substances Advisory Committee, March 2006; Revised 2006, 2007 (twice), 2011 and 2014) available from: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/304835/ARSAC_Notes_for_Guidance.pdf
55. Owens C, Irwin M. Neuroblastoma: the impact of biology and cooperation leading to personalized treatments. *Critic Rev Clin Lab Sci* 2012; 49: 85-115.
56. London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group *J Clin Oncol* 2005; 23: 6459-6465.
57. Cotterill SJ, Pearson ADJ, Pritchard J, Foot ABM, Roald B, Kohler JA, Imeson J. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982-1992. *Eur J Cancer*. 2000; 36: 901-908.
58. Bernstein ML, Leclerc JM, Bunin G, Brisson L, Robinson L et al. A population-based study of neuroblastoma incidence, survival, and mortality in North America. *J Clin Oncol* 1992; 10: 323-329.

59. Burgues O, Navarro S, Noguera R, Pellín A, Ruiz A, Castel V, et al. Prognostic value of the International Neuroblastoma Pathology Classification in Neuroblastoma (Schwannian stroma-poor) and comparison with other prognostic factors: a study of 182 cases from the Spanish Neuroblastoma Registry. *Virchows Archiv*. 2006; 449:410–420.
60. Ambros IM, Hata J, Joshi VV, Roald B, Dehner LP, Tüchler H, et al. Morphologic features of neuroblastoma (Schwannian stroma-poor tumors) in clinically favorable and unfavorable groups. *Cancer* 2002 Mar 5; 94:1574–1583.
61. Goto S, Umehara S, Gerbing R, Stram D, Brodeur G, Seeger R, et al. Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors. *Cancer* 2001;92: 2699–2708.
62. Shimada H; Umehara S; Monobe Y; Hachitanda Y; Nakagawa A; Goto S; Gerbing RB; Stram DO; Lukens JN; Matthay KK . International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 2001; 92: 2451-2461.
63. Joshi VV, Tsongalis GJ. Correlation between morphologic and nonmorphologic prognostic markers of Neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 824: 71-83.
64. Monsaingeon M, Perel Y, Simonnet G, Corcuff JB. Comparative values of catecholamines and metabolites for the diagnosis of neuroblastoma. *Eur J Pediatr* 2003; 162: 397–402.
65. Barco S, Gennai I, Reggiardo G, Galleni B, Barbagallo L, Maffia A, Viscardi E, De Leonardis F, Cecinati V, Sorrentino S, Garaventa A, Conte M, Cangemi G. Urinary homovanillic and vanillylmandelic acid in the diagnosis of neuroblastoma: report from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. *Clin Biochem*. 2014; 47:848-852.
66. Simon T, Hero B, Hunneman DH, Berthold F. Tumour markers are poor predictors for relaps or progession in neuroblastoma. *Eur J Canc* 2003; 39: 1899-1903.
67. Zelter PM, Marangos PJ, A.E. Evans AE, et al. Serum Neuron-Specific Enolase in Children with Neuroblastoma. (Relationship to Stage and Disease Course). *Cancer* 1986; 57:1230-1234.
68. Zeltzer PM, Parma AM, Dalton A, Siegel S, Marangos PJ, Sather H, Hammond D, Seeger RC. Raised neuron specific enolase in serum of children with met-

astatic neuroblastoma. A report from the children's cancer study group. *The Lancet* 1983; 13: 361-363.

69. Ishiguro Y, Kato K, Shimizu A, Ito T, Nagaya M. High levels of immunoreactive nervous system-specific enolase in sera of patients with neuroblastoma. *Clin Chim Acta* 1982; 121:173–180. (Abstract)
70. Ishiguro Y, Kato K, Ito T, Nagaya M, Yamada N, Sugito Nervous system-specific enolase in serum as a marker for neuroblastoma. *Pediatrics* 1983; 72: 696-700.
71. Hann HW, Evans AE, Siegel SE, Wong KY, Sather H, Dalton A, et al. Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience. *Cancer Res* 1985; 45: 2843–2848.
72. Cohn SL, Pearson ADJ, Wendy B. LondonWB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GB, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin V, Mosser i V, SimonT, Garaventa A, Castel V, and Matthay KK .The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG task force report *J Clin Oncol* 2009; 27: 289-297.
73. Hartmann O, Valteau-Couanet D, Vassal G, Lapierre V, Brugières L, Delgado V, et al. Prognostic factors in metastatic neuroblastoma in patients over 1 year of age treated with high-dose chemotherapy and stem cell transplantation: a multivariate analysis in 218 patients treated in a single institution. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 789–795.
74. Park S, Kim S, Park C-J, Jang S, Chi H-S, Koh K-N, et al. Presence of Differentiating Neuroblasts in Bone Marrow is a Favorable Prognostic Factor for Bone Marrow Metastatic Neuroblastoma at Diagnosis. *Ann Lab Med. koreamed*; 2013; 33: 89–96.
75. Morandi F, Corrias M, Pistoia V. Evaluation of bone marrow as a metastatic site of human neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2015; 1335: 23–31.
76. Seeger RC, Zeltzer PM, Rayner SA. Onco-neural antigen: a new neural differentiation antigen expressed by neuroblastoma, oat cell carcinoma, Wilms' tumor, and sarcoma cells. *J Immunol* 1979; 122:1548–1555.
77. Seeger RC, Reynolds CP, Gallego R, Stram DO, Gerbing RB, Matthay KK Quantitative tumor cell content of bone marrow and blood as a predictor of outcome in stage IV neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol* 2000; 18: 4067-4076. (Abstract)

78. Alvarado CS, London WB, Look AT, et al: Natural history and biology of stage A neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000; 22: 197-205.
79. Katzenstein HM, Bowman LC, Brodeur GM, et al: Prognostic significance of age, MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy, and histology in 110 infants with stage D(S) neuroblastoma: The Pediatric Oncology Group experience: A Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2007-2017.
80. Schneiderman J, London WB, Brodeur GM, Castleberry RP, Look TA, and Cohn SA Clinical Significance of MYCN Amplification and Ploidy in Favorable-Stage Neuroblastoma: A Report From the Children's Oncology Group *J Clin Oncol* 2008; 26: 913-918.
81. Minard V, Hartmann O, Peyroulet MC, Michon J, Coze C, Defachelle AS, et al. Adverse outcome of infants with metastatic neuroblastoma, MYCN amplification and/or bone lesions: results of the French Society of Pediatric Oncology. *Br J Cancer* 2000; 83: 973-979.
82. Iehara, T, Hosoi H, Akazawa K, Matsumoto Y, Yammamoto K, et al. MYCN gene amplification is a powerful prognostic factor even in infantile neuroblastoma de-tected by mass screening. *Br J Cancer* 2006; 94: 1510 -1515.
83. Bleeker G, van Eck-Smit BL, Zwinderman KH, Versteeg R, van Noesel MM, Kam BL, Kaspers GJ, van Schie A, Kreissman SG, Yanik G, Hero B, Schmidt M, Laureys G, Lambert B, Øra I, Schulte JH, Caron HN, Tytgat GA. MIBG scans in patients with stage 4 neuroblastoma reveal two metastatic patterns, one is associated with MYCN amplification and in MYCN-amplified tumours correlates with a better prognosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015; 42: 222-230.
84. Fendler WP, Wenter V, Thornton HI, Ilhan H, von Schweinitz D, Coppentrath E, et al. Combined Scintigraphy and Tumor Marker Analysis Predicts Unfavorable Histopathology of Neuroblastic Tumors with High Accuracy. *PLoS ONE* 2015; 10: e0132809.
85. Okuyama C, Ushijima Y, Watanabe K, Sugihara H, Nishimura T. [Iodine-123-MIBG scintigraphy in neuroblastoma; relationship between the intensity of uptake and tumor characteristics] *Kaku Igaku*. 1999; 36: 827-834. (Abstract)
86. Brans B, Laureys G, Schelfhout V, Van De Wiele C, De Potter RC, C Dhooge C, Simons M, Dierckx RA. Activity of iodine-123 metaiodobenzylguanidine in childhood neuroblastoma: lack of relation to tumour differentiation in vivo *Eur J Nucl Med* 1998; 25: 144-149.

87. Perel Y, Conway J, Kletzel M, Goldman J, Weiss S et al. Clinical impact and prognostic value of metaiodobenzylguanidine imaging in children with metastatic neuroblastoma. *Pediatr Hematol Oncol* 1999; 21:13-18.
88. Decarolis B, Schneider C, Hero B, Simon T, Volland R et al. Iodine -123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy scoring allows prediction of outcome in patients with stage 4 neuroblastoma: results of the Cologne interscore comparison study. *J Clin Oncol* 2013; 31: 944-951.
89. Dubois SG, Kalika Y, Lukens JN, Brodeur GM, Seeger RC et al: Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999; 21:181-189.

10. SKRAĆENICE

ACCIS - European Automated Childhood Cancer Information System

ADH - alkohol-dehidrogenaza

AR - aldoza-reduktaze

ATP - adenzin trifosfat

COG - Children's Oncology Group

CT- kompjuterizovana tomografija

DHPG - dihidroksifenilglikol

DOPA - dihidroksifenilalanin

DOPA L- dihidroksifenilacetaldehid

DOPAC - 3,4-dihidroksifenilacetične kiseline

DOPEGAL- 3,4-dihidroksifenilglikolaldehid

DOTA: tetra-aza-ciklododekan-N',N'',N'''-tetraacetat

DPD - dikarboksiopropan difosfonat

DTPA - dietilentriamino pentasirćetna kiselina

EFS - event-free survival - period do progresije bolesti, relapsa ili smrti iz bilo kojeg razloga

EISPONG - European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group

ELISA- enzyme-linked immunosorbent assay

ENSG- European Neuroblastoma Study Group

FDG-fluoro deoksiglukoz

GC-MS -gasna hromatografija-masena spektroskopija (gas chromatography-mass spectroscopy)

Gy- Grej, jedinica apsorbirane doze zračenja

HED - hidroksiefedrin

HEDP - hidroksietilen difosfonat

HMDP-hidroksimetilen difosfonat

HPLC- hromatografija visokih performansi pod visokim pritiskom (high-performance liquid chromatography)

HVA - homovanilinska kiselina

ICCC - International Classification of Childhood Cancer; Međunarodna klasifikacija dječjih tumora

INPC - International Neuroblastoma Pathology Classification

INRGSS -International Neuroblastoma Risk Group Staging System

INSS- International Neuroblastoma Staging System

LDH - laktatdehidrogenaza

MAO- monoaminooksidaza

MBq-megabekerel, jedinica za aktivnost SI sistema

mCi- milikiri, jedinica za aktivnost

MDP- metilen-difosfonat

MHPG - 3-metoksi-4-hidroksifenilglikola

mIBG-meta- jodobenzilguanidin

MIBI- 2-metoksi izobutil izonitril

MKI- mitotsko-karioreksni indeks

MOPEGAL -3-metoksi-4-hidroksifenilglikolaldehid

MR- magnetna rezonanca

NET- noradrenalinski transporter

NSE - neuron specifična enolaza

PET- pozitronska emisiona tomografija

pNT -periferni neuroblastni tumori

POG - Pediatric Oncology Group

SEER - US Surveillance Epidemiology and End Results

s-ferritin - serumski ferritin

SIOP - Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique

SIOPEN - International Society of Paediatric Oncology Neuroblastoma Europe

SSTR - somatostatinski receptori

TLC - hromatografija na tankom sloju (thin layer chromatography)

UZ - ultrazvuk

VMA - vanilmandelična kiselina

11. BIOGRAFIJA

Branislava Radović je rođena 2. aprila 1970. u Kosovskoj Mitrovici. Osnovnu i srednju školu završila je u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 1988, a diplomirala je u maju 1995, sa prosečnom ocenom 8,13. Diplomski rad na temu „Primena rekombinantnog humanog eritropoetina u pacijenata na kontinuiranoj peritonealnoj dijalizi (CAPD) odbranila je na katedri za internu medicinu sa ocenom deset (10). Volontersku specijalizaciju iz nuklearne medicine upisala je aprila 1997, a specijalistički ispit je položila novembra 2001. sa odličnim uspehom. Magistarsku tezu „Kvantitativna scintigrafija sakroilijačnih zglobova-metodološki aspekti i mogućnosti kliničke primene“ odbranila je u januaru 2001. U aprilu 2005. izabrana je u zvanje asistenta pripravnika na katedri za internu medicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Prištini, sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici, a od juna 2005. je kao specijalista nuklearne medicine radno angažovana u Centru za nuklearnu medicinu (na odeljenju nuklearne endokrinologije i gastrohepatologije). Član je nacionalne Grupe za neuroblastom (nacionalni ogranak evropskog Udruženja pedijatara onkologa za neuroblastom (SIOPEN), osnovanog 2008.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Branislava Radović

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

PROCENA VREDNOSTI SEMIKVANTITATIVNOG BODOVNOG SISTEMA
SIMPATIČKO-ADRENALNE SCINTIGRAFIJE U DECE OBOLELE OD
NEUROBLASTOMA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 1. septembar 2015.

Branislava Radović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Branislava Radović

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada PROCENA VREDNOSTI SEMIKVANTITATIVNOG BODOVNOG
SISTEMA SIMPATIČKO-ADRENALNE SCINTIGRAFIJE U DECE OBOLELE OD
NEUROBLASTOMA

Mentor Prof. dr Vera Artiko

Potpisani Branislava Radović


izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 1. septembar 2015.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

PROCENA VREDNOSTI SEMIKVANTITATIVNOG BODOVNOG SISTEMA
SIMPATIČKO-ADRENALNE SCINTIGRAFIJE U DECE OBOLELE OD
NEUROBLASTOMA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

①. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 1. septembar 2015.

