PL ISSN 0303 4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS

2397

OCENA ZNACZENIA WYBRANYCH WSKAŹNIKÓW PROLIFERACJI I ANGIOGENEZY W GUZACH Z GRUPY NERWIAKA ZARODKOWEGO WSPÓŁCZULNEGO DLA PROGNOZOWANIA KLINICZNEGO

ELŻBIETA ADAMKIEWICZ-DROŻYŃSKA

ROZPRAWA HABILITACYJNA

TOM XXXVI
2 0 0 6
SUPLEMENT 5

ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXVI
2006
SUPLEMENT 5

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Elżbieta Adamkiewicz-Drożyńska

OCENA ZNACZENIA WYBRANYCH WSKAŹNIKÓW PROLIFERACJI I ANGIOGENEZY W GUZACH Z GRUPY NERWIAKA ZARODKOWEGO WSPÓŁCZULNEGO DLA PROGNOZOWANIA KLINICZNEGO

The evaluation of selected proliferation and angiogenesis markers in neuroblastoma group tumors for clinical prognosis

Rozprawa habilitacyjna

Klinika Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii
Akademii Medycznej w Gdańsku

Kierownik kliniki:
prof. dr hab. n. med. Anna Balcerska

Gdańsk 2006

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek
sekretarz redakcji - dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak,
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Akademia Medyczna w Gdańsku
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@amg.gda.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published in Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303-4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

Praca została wykonana częściowo w ramach projektu grantowego KBN nr 6PO5E09121.

Część uzyskanych wyników badań przeprowadzonych w ramach pracy habilitacyjnej została opublikowana w następujących artykułach załączonych do niniejszej pracy:

1. Drożyńska E., Rachoń D., Myśliwska J., Iżycka-Świeszewska E., Balcerska A., Bubała H., Chybicka A., Kołtan S., Stolarska M., Słociak M., Wieczorek M., Wysocki M. Serum concentrations of angiogenic cytokines in neuroblastoma patients. Polish J Environ Stud 2005; 14, supl 2, part 2: 508-13,
2. Drożyńska E., Iżycka-Świeszewska E., Niedźwiecki M., Balcerska A., Perek D., Wachowiak J. A correlation of microvascular density and proliferative activity to clinical characteristics in neuroblastoma. Neoplasma 2006; 3: 247-52,

Pozostałe wyniki badań nie były dotychczas opublikowane.

Podziękowania

Wyrażam ogromną wdzięczność i szacunek Pani Profesor dr hab. n. med. Annie Balcerskiej, kierownikowi Kliniki Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii AMG, która zainteresowała mnie onkologią dziecięcą. Pani Profesor, z którą pracuję od wielu lat, wprowadzała mnie w tajniki tej specjalności, umożliwiała szkolenia naukowe i stworzyła warunki do przeprowadzenia badań i powstania niniejszej pracy.

Wyrazy wdzięczności kieruję do Pana Profesora dr n. med. Janusza Limona i Pani dr Iwony Kardaś za przeprowadzenie w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki AMG badań cytogenetycznych, których wyniki analizowane były w niniejszej pracy. Szczególne podziękowanie składam Panu Profesorowi Januszowi Limonowi za życzliwe i cenne uwagi, które pomogły mi w ostatecznej redakcji pracy.

Dziękuję Pani Profesor dr n. med. Jolancie Myśliwskiej za wykonanie badań immunologicznych.

Panu Profesorowi dr n. med. Andrzejowi Hellmannowi dziękuję za wyrażenie zgody na przeprowadzenie badań ploidii w Pracowni Cytometrii Kliniki Hematologii AMG i Panu dr Krzysztofowi Lewandowskiemu za ich wykonanie w tej pracowni.

Pani dr Ewie Iżyckiej-Świeszewskiej serdecznie dziękuję za wykonanie badań immunohistochemicznych i pozytywną stałą stymulację do realizacji poszczególnych etapów pracy.

Dziękuję także kierownikom ośmiu ośrodków hematologii i onkologii dziecięcej w Polsce za wyrażenie zgody na wykorzystanie materiału klinicznego pochodzącego od pacjentów z rozpoznaniem neuroblastoma i przeprowadzenie ankiet klinicznych.

Dziękuję również moim Koleżankom i Kolegom z Kliniki Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii AMG za atmosferę pełną życzliwości, która ułatwiła mi realizację pracy.

Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do zebrania materiału wykorzystanego w przedstawianej pracy.

Pracę dedykuję Mojej Rodzinie

SPIS TREŚCI

SPIS SKRÓTÓW **11**

1. WSTĘP **13**

1.1. WPROWADZENIE 13

1.2. OBRAZ KLINICZNY I LECZENIE ZWOJAKA ZARODKOWEGO WSPÓŁCZULNEGO 14

1.3. CZYNNIKI PROGNOSTYCZNE 19

1.3.1. Czynniki kliniczne *19*
1.3.2. Czynniki histologiczne *23*
1.3.3. Czynniki immunohistochemiczne *26*
1.3.4. Czynniki genetyczne *28*
1.3.5. Czynniki molekularne *37*

1.4. ANGIOGENEZA (AG) W ROZWOJU NOWOTWORÓW 38

2. CEL PRACY **47**

3. MATERIAŁ I METODY **48**

3.1. MATERIAŁ KLINICZNY I METODY BADAWCZE 48

3.1.1. Pacjenci i dane kliniczne *48*
3.1.2. Badania biochemiczne *51*

3.2. BADANIA HISTOLOGICZNE 51

3.3. BADANIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE 53

3.3.1. Metoda badania i kryteria oceny aktywności proliferacyjne guzów Nb *54*
3.3.2. Metody badania i kryteria oceny wskaźników angiogenezy w guzach Nb *54*

3.4. METODA BADANIA AKTYWNOŚCI CYTOKIN VEGF I bFGF W SUROWICY KRWI (TEST ELISA) 55

3.5. BADANIA GENETYCZNE 56

3.5.1. Analizy cytogenetyczne *57*
3.5.2. Metody badania ploidii komórkowej *58*

3.6. METODY STATYSTYCZNE 59

4. WYNIKI **61**

4.1. BADANIA KLINICZNE 61

4.1.1. Podsumowanie *70*
4.1.2. Zastosowana terapia i osiągnięty efekt leczenia *70*

4.2. BADANIA HISTOLOGICZNE 76

4.2.1. Odpowiedź na leczenie w zależności od typu histologicznego guza *77*
4.2.2. Ocena zależności cech klinicznych choroby nowotworowej od budowy morfologicznej guzów grupy zwojaka zarodkowego *78*
4.2.3. Podsumowanie *81*

4.3. BADANIA GENETYCZNE 81
4.3.1. Badania cytogenetyczne 81
4.3.2. Badania ploidii DNA 84
4.3.3. Charakterystyka kliniczna pacjentów z guzami Nb różniącymi się markerami genetycznymi 86
4.3.4. Podsumowanie 95
4.4. BADANIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE 95
4.4.1. Aktywność proliferacyjna w tkankach guzów Nb 95
4.4.2. Podsumowanie 107
4.5. BADANIA WSKAŹNIKÓW ANGIOGENEZY 108
4.5.1. Gęstość naczyń 108
4.5.2. Ekspresja czynnika VEGF i jego receptora Flk-1 w tkankach guzów Nb .. 122
4.5.3. Wskaźniki angiogenezy w surowicy 126
4.5.4. Podsumowanie 128
4.6. WYNIKI BADAŃ PROLIFERACJI I ANGIOGENEZY GUZÓW NB W ODNIESIENIU DO CZYNNIKÓW PROGNOSTYCZNYCH W GRUPIE PACJENTÓW ZMARŁYCH 129
4.7. ANALIZA STATYSTYCZNA PRAWDO-PODOBIEŃSTWA PRZEŻYCIA 131
4.7.1. Analiza wieloczynnikowa 132
4.7.2. Analiza jednoczynnikowa 135
5. DYSKUSJA 147
6. WNIOSKI 165
7. STRESZCZENIE 166
8. SUMMARY 170
9. PIŚMIENNICTWO 174
10. ZAŁĄCZNIKI 193
10.1. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA 193
10.2. WZÓR ANKIETY DANYCH KLINICZNYCH 193
10.3. NEUROBLASTOMA 204
11. ANEKS: PRACE OPUBLIKOWANE 207

SPIS SKRÓTÓW

ADR	doxorubicyna
AG	angiogeneza
amp	amplifikacja
Ang 1 i 2	angiopoetyna 1 i 2
bFGF	zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor*)
CBDCA	karboplatyna (*carboplatin*)
CCG	*Cancer Cooperative Group*
CD44	przezbłonowy glikoproteid na powierzchni komórek, zwany antygenem zagnieżdżania, należący do cząsteczek kompleksu różnicowania (*cluster of differentiation*)
CDDP	cisplatyna (*cisplatin*)
CHT	chemioterapia
13-cis RA	analog kwasu retinoinowego (*13-cis-retinoic acid*)
CR	całkowita remisja (*complete remission*)
CYC	cyclofosfamid (*cyclofosphamide*)
DDX1	onkogen należący do DEAD box
DF	typ różnicujący się zwojaka zarodkowego (*differentiating type*)
dmin	acentryczny malutki chromosom (*double minute chromosome*)
del(1p)	delecja krótkiego ramienia chromosomu 1
DOD	zgon z progresji choroby (*death of disease*)
DOPA	dihydroksyfenyloalanina (*dihydroxyphenylalanine*)
ES	okres wolny od objawów choroby, od zakończenia leczenia *(event free survival)*
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu *(epidermal growth factor)*
F	ferrytyna (*ferritin*)
FISH	fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (*fluorescence in situ hybridization*)
FGFb	zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor*)
FH	typ histologiczno-prognostyczny guza „korzystny" (*favourable histology*)
Flk-1	receptor błonowy dla VEGF (*fetal liver kinase-1*)
G-CSF	czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów (*granulocyte colony stimulating factor*)
GM-CSF	czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i monocytów (*granulocyte-monocyte colony stimulating factor*)
GNB	nerwiak zwojowokomórkowy (*ganglioneuroblastoma*)
GN	zwojakonerwiak (*ganglioneuroma*)
HGF	czynnik wzrostu hepatocytów (*hepatocyte growth factor*)
HIF1 i HIF2	geny transkrypcyjne indukowane niedotlenieniem (*hypoxia inducible factors*)
hsr	region o zatartej strukturze prążkowej (*homogeneously staining region*)
HVA	kwas homovanilinowy (*homovanilic acid*)
ICAM	międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna (*intercellular adhesion molecule*)
ICE	schemat leczenia: ifosfamid+ karboplatyna+ etopozyd
IGF	insulinopodobny czynnik wzrostu (*insulin-like growth factor*)
IL-1,IL-6,IL-8, IL-10, IL-12	interleukiny 1,6,8,10 i 12 (*interleukins*)
INPC	*International Neuroblastoma Patological Classification*
INRC	*International Neuroblastoma Response Classification*
INSS	*International Neuroblastoma Staging System*
IP	indeks proliferacyjny (*proliferation index*)

LDH	dehydrogenaza kwasu mlekowego (*lactate dehydrogenase*)
NAG	onkogen ulegający amplifikacji wraz z onkogenem *NMYC*
M-CSF	czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów *(macrophage colony stimulating factor*)
MEN2	zespół mnogich nowotworów gruczołów dokrewnych (*multiple endocrine neoplasia*)
Metoda Southern	technika hybrydyzacji DNA
MKI	indeks mitotyczno-kariorektyczny (*mithosis-kariorhexis index*)
MRD	choroba resztkowa (*minimal residual disease*)
MRP1	białko oporności wielolekowej (*multidrug resistance protein*)
MEIS 1	gen w chromosomie 2p
MVD	gęstość naczyń (*microvascular density*)
NSE	enolaza neurospecyficzna (*neurospecific enolase*)
NMYC	onkogen ulegający amplifikacji w zwojaku zarodkowym współczulnym, zlokalizowany w chromosomie 2,23-24
OS	przeżycie całkowite (*overall survival*)
PDGF	czynnik wzrostowy pochodzenia płytkowego (*platelet derived growth factor*)
POG	*Pediatric Oncology Group*
PNET	prymitywny nowotwór neuroektodermalny (*primitive neuroectodermal tumor*)
raf	rodzina onkogenów komórkowych
ras	rodzina onkogenów komórkowych
RET-	receptory powierzchniowe dla neurotrofin
RB	gen supresorowy
SHEP2IN	gen supresorowy zlokalizowany w chromosomie 1p,35-36
SRO	*short region of overlap*
src	rodzina onkogenów komórkowych
TF	czynnik guzowy (*tumor factor*)
TGF	transformujący czynnik wzrostu (*transforming growth factor*)
TIE 1 i 2	receptory kinaz tyrozynowych obecne na śródbłonku (*tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains*)
TNFα	czynnik martwicy nowotworu α (*tumor necrosis factor α*)
Trk A,B,C	transbłonowe receptory neurotrofin
TP53	gen *supresorowy kodujący białko p53*
PR	częściowa remisja (*partial remission*)
POO	typ niskozróżnicowany zwojaka zarodkowego (*poorly differentiated type*)
PDGF	czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (*platelet derived growth factor*)
UH	typ histologiczno- prognostyczny guza „niekorzystny" (*unfavourable histology*)
UICC	*International Union Against Cancer*
UN	typ niezróżnicowany zwojaka zarodkowego (*undifferentiated type*)
VCAM-1	cząsteczka adhezyjna na powierzchni komórek
VCR	vinkrystyna (*vincristine*)
VEGF	czynnik wzrostu komórek śródbłonka naczyniowego (*vascular-endothelial growth factor*)
VMA	kwas vanilinomigdałowy (*vanillylmandelic acid*)
VP-16	etopozyd (*etoposide*)
VM-26	teniposyd (*teniposide*)
VHL	gen supresorowy kodujący zespół von Hippla i Landaua
WNP	wskaźnik naczyniowo-proliferacyjny (*vascular-proliferative index=VPI*)
WUN	współczulny układ nerwowy

1. WSTĘP

1.1. WPROWADZENIE

Zwojak zarodkowy współczulny – neuroblastoma (Nb) wywodzi się z części prymitywnych komórek grzebieni struny nerwowej, które są prekursorami układu współczulnego. Nowotwór ten po raz pierwszy został opisany przez Virchowa w 1864 roku. Jest najczęściej występującym pozaczaszkowym guzem litym wieku dziecięcego i stanowi 7-10% z wszystkich rozpoznań chorób nowotworowych u dzieci [71]. Zachorowalność na ten nowotwór w wieku od 0 do 15 roku życia określa się na 1/100000 dzieci rocznie [88,19,191]. W Polsce rocznie rozpoznaje się 100-120 nowych zachorowań na Nb [128]. Guz ten rozwija się głównie u niemowląt i małych dzieci. U 40% chorych rozpoznawany jest w okresie niemowlęcym [228], a 90% tych guzów rozwija się przed 5 rokiem życia [19]. Średni wiek w momencie diagnozy wynosi 22 miesiące [191]. W przeważającej części przypadków Nb rozwija się sporadycznie, a rodzinne występowanie tego nowotworu jest opisywane jedynie u 1-2% chorych z tym rozpoznaniem [20,132].

Nb stanowi jeden z najbardziej zadziwiających nowotworów złośliwych ze względu na specyficzne właściwości biologiczne i trudno przewidywalny przebieg choroby. Rozpoznanie tego nowotworu nadal pozostaje wyzwaniem terapeutycznym, ponieważ odległe wyniki leczenia chorych z postacią zaawansowaną klinicznie są oceniane jako niezadowalające [116].

Zjawiskiem niezwykłym w przebiegu Nb jest zdolność do spontanicznego lub występującego pod wpływem stosowanej chemioterapii dojrzewania tkanek nowotworowych od postaci złośliwej do łagodnej, jaką prezentuje zwojakonerwiak (*ganglioneuroma*). Częstość tego zjawiska nie została dotychczas określona. Proces samoistnego dojrzewania zazwyczaj prowadzi do powstania guza łagodnego, natomiast dojrzewanie tkanek guza pod wpływem chemioterapii, częściej doprowadza do formy niecałkowicie dojrzałej nerwiaka zwojowego (*ganglioneuroblastoma*) [4]. Niektóre guzy Nb, zwłaszcza te, które ujawniają się w wieku niemowlęcym mają zdolność do samoistnej remisji [7,91].

Tym, co wyróżnia Nb spośród innych guzów litych wieku dziecięcego, jest ogromna różnorodność przebiegu klinicznego począwszy od samoistnych regresji obserwowanych w niektórych przypadkach, poprzez typ guzów wrażliwych na umiarkowaną terapię, aż do postaci bardzo agresywnych, z szybkim rozsiewem nowotworu i opornością na stosowane intensywne leczenie onkologiczne [19,195]. Z uwagi na tę różnorodność przebiegu klinicznego, opisaną w licznych usystematyzowanych badaniach od dawna dąży się do wyodrębnienia podtypów nowotworu różniących się prognostycznie [206].

1.2. OBRAZ KLINICZNY i LECZENIE ZWOJAKA ZARODKOWEGO WSPÓŁCZULNEGO

Obraz kliniczny

Zlokalizowana postać zwojaka zarodkowego współczulnego często przebiega bezobjawowo, a wykrycie procesu nowotworowego bywa przypadkowe [178]. U części chorych wstępne objawy kliniczne bywają niecharakterystyczne, takie jak gorączka (u 28% chorych) i stopniowa utrata masy ciała (u 21% chorych). Objawy bólu, o mechanizmie głównie uciskowym, są uzależnione od lokalizacji guza pierwotnego lub jego przerzutów i obserwuje się je u 34% chorych [228].

Niektóre z objawów tego nowotworu są charakterystyczne i ułatwiają rozpoznanie [191,228,274]. Stwierdza się je jedynie w niewielkiej grupie chorych z rozpoznaniem Nb, a należą do nich:

- objawy porażenia kończyn dolnych w guzach klepsydrowatych (4% chorych);
- oporna na leczenie biegunka z zaburzeniami gospodarki wodno-elektrolitowej, spowodowana wytwarzaniem przez komórki nowotworowe enterohormonu VIP (4%);
- ostra encefalopatia z oczopląsem i objawami móżdżkowymi (2-8%);
- zespół Hornera w przypadku nacieków nowotworowych na zwój rzęskowy (1-7%);
- incydenty nadciśnienia, zaczerwienienia skóry i zlewnych potów na skutek produkcji katecholamin przez komórki Nb (0-2%)

Wśród objawów choroby z obecnością przerzutów zazwyczaj dominują te, które zależą od ognisk przerzutowych nowotworu, a więc: mielosupresja w przypadku zajęcia szpiku, bóle brzucha w wyniku licznych przerzutów w obrębie jamie brzusznej, bóle i patologiczne złamania kości, czy też powiększenie i bolesność wątroby. Gwałtowne i znaczne powiększenie rozmiarów wątroby u młodych niemowląt może doprowadzać do zagrażającej życiu niewydolności oddechowo-krążeniowej [217,228].

Leczenie

W latach 60-tych jedynie u 24% pacjentów z rozpoznaniem Nb osiągano 5-letnie przeżycie. Dzięki postępowi w diagnostyce i terapii, do lat 90-tych nastąpiła poprawa wyników leczenia i obecnie 5-letnie przeżycia uzyskuje się u 55% pacjentów z tym rozpoznaniem [19].

Zróżnicowany przebieg kliniczny zwojaka zarodkowego współczulnego wymaga wyboru z szerokiego spektrum stosowanych metod odpowiednio dostosowanej dla określonego chorego intensywności terapii. W grupie pacjentów o dobrym rokowaniu dąży się do ograniczenia leczenia onkologicznego. Jednocześnie intensyfikuje się terapię w grupie pacjentów z agresywnym przebiegiem choroby, wprowadzając dodatkowo leczenie celowane w niektóre poznane mechanizmy biologiczne. Stąd zaistniała potrzeba precyzyjnego określania grup ryzyka w przebiegu tej choroby [188]. Aktualnie stosowane podziały pacjentów z rozpoznaniem Nb na grupy ryzyka opierają się na ocenie uznanych czynników prognostycznych: klinicznych, jak wiek pacjenta w momencie diagnozy i stadium zaawansowania klinicznego choroby; biologicznych - do których należy stopień ploidii DNA, obecność onkogenu *NMYC* oraz cech histologicznych wg kryteriów zaproponowanych przez Shimada [232]. Niektóre protokoły terapeutyczne w kryteriach prognostycznych uwzględniają dodatkowo ocenę poziomu w surowicy LDH i ferrytyny [96,97,187,217]. Marker diagnostyczny tego nowotworu - katecholaminy oceniane w momencie diagnozy w surowicy, bądź w moczu są słabym wskaźnikiem prognozy [191]. Dodatkowo uznawanymi biologicznymi markerami prognostycznymi są aktywność glikoproteiny CD44 i receptorów Trk A na powierzchni komórek nowotworowych oraz aktywność telomeraz. Spośród markerów cytogenetycznych podkreśla się prognostyczną wartość obecności del(1p) i częściowej trisomii chromosomu 17q w komórkach Nb. W aktualnych protokołach leczenia Nb stosowanych przez SIOP przyjęto klasyfikację grup ryzyka opartą o wiek, płeć i obecność amplifikacji onkogenu *NMYC* (amp *NMYC*). Uwzględnienie obecności amp *NMYC* w klasyfikacji prognostycznej jest pierwszym w onkologii przykładem klinicznego zastosowania markera genetycznego dla stratyfikacji terapeutycznej chorych (tab. 1) [35,47,274].

Tab. 1. Prognostyczne grupy ryzyka w zwojaku zarodkowym współczulnym stosowane przez SIOP.

Tab. 1. Prognostic risk groups in neuroblastoma according to SIOP.

Grupa ryzyka *Risk group*	**Charakterystyka chorych** *Patients characteristic*
Niskiego *Low risk*	Pacjenci z nowotworem w stadium I, II oraz IVs, bez amp *NMYC* *Patients with neoplasm in I,II and IVs stage, without MYCN amp*
Pośredniego *Median risk*	Pacjenci w stadium klinicznym III oraz niemowlęta w stadium IV, bez amp *NMYC* *Patients in stage III and infants in stage IV, without amplification of MYCN*
Wysokiego *High risk*	Pacjenci powyżej 1 roku życia w IV stadium klinicznym choroby oraz wszyscy w stadium II lub III, u których stwierdzono guzy z amp *NMYC* *Patients > 1 year old in stage IV and all the patients in stage II and III, with MYCN amp*

Żaden z dotychczas proponowanych podziałów Nb nie wydaje się być doskonały i ostateczny, gdyż wznowy choroby zdarzają się zarówno u pacjentów z chorobą zlokalizowaną z grupy niskiego ryzyka, także w I stadium choroby jak i w grupach pośredniego i wysokiego ryzyka [7]. W większości ośrodków onkologicznych stosowaną obecnie metodą leczenia chorych z grupy niskiego ryzyka jest radykalne operacyjne usunięcie guza pierwotnego i w grupie tej wieloletnie przeżycia dotyczą ponad 95% chorych [19,179]. Guzy pośredniego ryzyka są leczone kompleksowo, z zastosowaniem różnych wielolekowych schematów chemioterapii konwencjonalnej. W tych schematach wykorzystywane są cytostatyki wymienione w tabeli 2 w skojarzeniu z terapią miejscową – operacyjnego usunięcia guza resztkowego. Niektóre protokoły zalecają ponadto radioterapię na lożę po guzie. Taka forma leczenia okazała się mało skuteczna w guzach wysokiego ryzyka [88]. Podejmowane próby poprawienia skuteczności terapii tej grupy chorych zmierzają obecnie w dwóch kierunkach. Z jednej strony intensyfikuje się chemioterapię, z zastosowaniem terapii mieloablacyjnej w guzach wysokiego ryzyka, powtarzanej dwu a nawet trzykrotnie [88,160,196,197]. Z drugiej strony równolegle trwają badania nad wprowadzaniem nowych form terapii celowanej z zastosowaniem leków hamujących mechanizmy biologiczne decydujących o rozwoju tego nowotworu. Wśród tych metod w protokołach klinicznych znalazły już zastosowanie analogi kwasu retinoinowego, stymulujące różnicowanie komórek neuroblastoma oraz immunoterapia z zastosowaniem przeciwciał anty GD2- przeciw swoistemu antygenowi, który jest obecny na powierzchni większości komórek Nb [19,274].

Tab. 2. Cytostatyki stosowane w leczeniu zwojaka zarodkowego współczulnego.
Tab.2. Cytostatics used in Nb treatment.

Grupa	Cytostatyki
Antracykliny/ *Antracyclines*	adriamycyna, pirarubicyna/ *adriamycin, pirarubicin*
Leki alkilujace/ *Alkylating agents*	cyclofosfamid, ifosfamid, melfalan, thiotepa/ *cyclofosphamide, ifosphamide,melphalan, thiotepa*
Pochodne platyny/ *Platinum agents*	cykloplatyna, cisplatyna/ *cycloplatin, cisplatin*
Alkaloidy Vinci rosea/ *Vinca alkaloids*	vincristyna/ *vincristin*
Epipodofilotoksyny/ *Epipodophyllotoxins*	etopozyd, tenipozyd/ *etopozide, tenipozide*
Taksany/ *Taxans*	topotecan, irinotecan/ *topotecan, irinotecan*
Inne/ *Others*	daktynomycyna/ *dactinomycin*

W niektórych ośrodkach wykorzystywane są metody leczenia celowanego izotopami jodu połączonymi z metajodobenzylguanidyną (MIBG) - związkiem, który jest wychwytywany wybiórczo przez komórki Nb [162,270]. W fazie badań przedklinicznych znajdują się różne formy leczenia celowanego, między innymi szczepionki nowotworowe z immunomodulatorami lub formy terapii genowej blokujące ekspresję genów np. onkogenu *NMYC* lub hamujące aktywność telomeraz. W fazie badań przedklinicznych znajdują się także preparaty modulujące oporność wielolekową, inhibitory apoptozy oraz inhibitory angiogenezy, jak np. TNP-470 [98,274].

Dotychczasowe odległe wyniki leczenia grupy najwyższego ryzyka są złe. Nawet w przypadku stosowania terapii mieloablacyjnych z autologicznym przeszczepem komórek krwiotwórczych, 10-letnie przeżycie uzyskuje zaledwie 30% chorych [116]. Dotychczasowy postęp w leczeniu tej grupy chorych polega jedynie na wydłużeniu czasu przeżycia, z większą szansą na przeżycie długoletnie bez objawów choroby. Wyniki leczenia opublikowane przez różne ośrodki przedstawia tabela 3 [18,45,61,116,125,133,181,229,248].

Odpowiedź na leczenie w Nb zależy w znacznym stopniu od właściwości histologicznych i biologicznych guza. Od czasu, gdy w 1993 zostały przez Brodeura i wsp. określone kliniczne, biologiczne i histologiczne kryteria prognostyczne, wiedza na temat biologii tego nowotworu znacznie się rozbudowała [32]. Prowadzone badania molekularne wnikają coraz głębiej w mechanizmy kancerogenezy i dotyczą takich zjawisk jak proliferacja, apoptoza, inwazyjność oraz angiogeneza. Aktualnie prowadzone badania zmierzają do określenia znaczenia tych procesów dla ukształtowania się określonego fenotypu zwojaka zarodkowego współczulnego. Kolejne nowe informacje w tym zakresie stanowią szansę dla opracowania bardziej skutecznych i celowanych w te mechanizmy metod terapii.

Tab. 3. Wyniki leczenia chorych z zaawansowaną postacią zwojaka zarodkowego pochodzące z różnych ośrodków.

Tab. 3. Treatment results of Nb patients with advanced stage of disease in different oncological centers.

Protokół/Ośrodek *Protocol/Center*	**Rodzaj terapii** *Type of treatment*	**Grupa ryzyka** *Risk group of patients*	**3 letni EFS*** *3 yrs EFS*	**5 letni EFS*** *5 yrs EFS*	**3 letni OS**** *3 yrs OS*	**5 letni OS**** *5 yrs OS*
German Neuroblastoma Trial NB 97 (publ. 2003 r.)	Protokół z terapią mieloablacyjną *Protocol with myeloablative therapy*	> 1 roku, IV stadium *>1 year old, IV stage*	-	33%	-	44%
Italian protocol ICGNB 92 (publ. 2003 r.)	Protokół z terapią mieloablacyjną *Protocol with myeloablative therapy*	> 1 roku, IV stadium *>1 year old, IV stage*	-	17%	-	28%
Austrian Protocol A-NB879 (publ. 1996 r.)	Protokół z terapią mieloablacyjną *Protocol with myeloablative therapy*	> 1 roku, IV stadium *>1 year old, IV stage*	51%	-	-	-
USA/ Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (publ. 2003 r.)	Protokół z terapią mieloablacyjną i anty-GD2 *Protocol with myeloablative therapy and anti GD2*	Pacjenci wysokiego ryzyka *High pisk patients*	-	-	6/12 pacjentów bez progresji choroby/ *Patients without PD*	-
USA Protokol CCG-3391 (publ. 2000 r.)	Randomizacja: CHT konwencjonalna vs. terapia mieloablacyjna *Randomization: conventional CHT vs. myeloablative therapy*	Niemowlęta w IVstadium + amp *NMYC/ Infants in stage IV + MYCN amp*	17%	-	-	-
USA/ Massatchuset (publ 2003r)	Protokół z podwójną terapią mieloablacyjną *Protocol with double myeloablative therapy*	Pacjenci wysokiego ryzyka *High risk patients*	63%	-	-	-
USA /Chicago Pilot Study (pub. 2002 r.)	Protokół z potrójną terapią mieloablacyjną *Protocol with triple myeloablative therapy*	Pacjenci wysokiego ryzyka *High risk patients*	57 +/- 11%	-	79 +/-10%	-
Japonia protokół JANB 85 (publ. 1999 r.)	Protokół z terapią mieloablacyjną *Protocol with myeloablative therapy*	Pacjenci wysokiego ryzyka *High risk patients*	-	EFS 10 lat 0% najdłuższe przeżycie 8,5 lat	-	OS 10 lat 28,9%
China/Sun-Yat Sen University (2003 r.)	Protokół z CHT konwencjonalną *Protocol with conventional CHT*	> 1 roku, IV stadium/ *>1 year old, IV stage*	-	-	22% (2 letni OS) *(2 years OS)*	-
Turky/ Protokol IPOG-NBL-92 (publ 2003)	Protokół z CHT konwencjonalną *Protocol with conventional CHT*	> roku, IV stadium *>1 year old, IV stage*	-	5%	-	6%

CHT-chemioterapia, PD-progresja choroby, OS-czas przeżycia od rozpoznania, EFS-czas przeżycia od końca leczenia
CHT - chemotherapy, PD - progresion disease, OS - overall survival, EFS - event free survival

1.3. CZYNNIKI PROGNOSTYCZNE

1.3.1. Czynniki kliniczne

Stadium zaawansowania choroby

Pierwszą ocenę stopnia zaawansowania klinicznego Nb wprowadziła Evans i wsp. w 1971r. Już w tej pierwszej klasyfikacji wśród rozsianych postaci tego nowotworu wyodrębniona została grupa o bardzo dobrym rokowaniu – tzw. stadium IVs [70]. Ta podstawowa skala zaawansowania klinicznego ulegała kolejnym modyfikacjom. Pojawiły się klasyfikacje chirurgiczno-patologiczne tj. klasyfikacja oparta na ocenie TNM zaproponowana przez UICC oraz klasyfikacja przyjęta przez amerykańską grupę onkologów dziecięcych *Pediatric Oncology Group* (POG) w 1983 roku [100,191]. Od 1988r powszechnie uznana została używana do chwili obecnej międzynarodowa klasyfikacja kliniczna wg *International Staging System* (INSS.) [32,191]. Uwzględnia ona podział na cztery stadia główne oraz stadium IVs – szczególną postać rozsianą rozpoznawaną u niemowląt (tab. 4) [32,71].

Tab. 4. Stadia zaawansowania klinicznego zwojaka zarodkowego współczulnego wg INSS.
Tab. 4. Clinical stages of neuroblastoma according to INSS.

Stadium *Stage*	**Charakterystyczne cechy kliniczne** *Clinical characteristic*
I	guz zlokalizowany, całkowicie usunięty, węzły chłonne nie zajęte *tumor limited to site of origin, totaly removed, lymph notes not involved*
II	guz zlokalizowany, niecałkowicie usunięty, zajęte węzły chłonne po tej samej stronie linii pośrodkowej *tumor limited, not completely removed, lymph nodes involved on the same side*
III	guz przekracza linię pośrodkową ciała, obustronnie zajęte węzły chłonne *tumor extends to contralateral side, lymph notes involved on both sides*
IV	obecne przerzuty do odległych narządów *metastases present*
IVs	wiek pacjenta < 1 roku życia, obecne przerzuty do wątroby i/ lub skóry, szpiku *patient > 1 year of age, metastases to the liver, skin or bone marrow present*

W Nb, podobnie jak we wszystkich innych złośliwych guzach litych, stopień zaawansowania choroby nowotworowej jest ważnym i niezależnym czynnikiem prognostycznym. Najmniejsze szanse na wyleczenie mają pacjenci z przerzutami odległymi w IV stadium zaawansowania. Szczególna postać kliniczna Nb – stadium IVs z obecnością odległych przerzutów występuje wyłącznie u niemowląt. W tej postaci ognisko pierwotne Nb osiąga niewielkie rozmiary (nieprzekraczające linii pośrodkowej ciała), a przerzuty odległe stwierdza się w szpiku kostnym, skórze i wątrobie. Stadium IVs zostało wyodrębnione jako dobrze rokujące, gdyż Nb w tym stadium cechuje szczególna skłonność do samoistnej regresji. Wyniki leczenia tej postaci przy zastosowaniu mało intensywnej chemioterapii są bardzo dobre i przekraczają 90% trwałych wyleczeń [177,217].

Wiek

Odmienny przebieg kliniczny tego nowotworu u niemowląt jest cechą, niespotykaną w innych guzach złośliwych. Guzy rozwijające się w wieku niemowlęcym charakteryzują się w większości znaczną chemiowrażliwością i skłonnością do regresji [244]. Wyniki leczenia Nb rozpoznanego w stadium IV u niemowląt są lepsze niż u dzieci starszych, gdyż długotrwałe całkowite remisje stwierdza się u 50-75% takich pacjentów [187,245]. Niepowodzenia leczenia niemowląt z tym rozpoznaniem dotyczą najczęściej pacjentów w pierwszym trymestrze życia, kiedy gwałtownie rozwijający się guz może spowodować objawy zagrażające życiu: niewydolność oddechowo-krążeniową spowodowaną podparciem przepony przez olbrzymią wątrobę z licznymi przerzutami oraz współistniejące zaburzenia krzepnięcia i krwotoki do rozwijającego się guza nowotworowego [73,229]. Pokonanie tych trudności stwarza duże prawdopodobieństwo wyleczenia nawet najmłodszych pacjentów. Gorsze rokowanie mają też niemowlęta z obecnością przerzutów do kości [167]. Najbardziej niekorzystnym markerem Nb w tym wieku jest stwierdzenie obecności amp *NMYC* [274] - długoletnie przeżycia wolne od wznowy w takich przypadkach uzyskuje się jedynie u 28% niemowląt [119,275]. Te guzy, które ujawniają się powyżej 1 roku życia prezentują cechy większej agresywności i często charakteryzują się narastającą opornością na leczenie. **W zwojaku zarodkowym współczulnym wiek jest zatem ważnym i niezależnym czynnikiem rokowniczym, który jest uwzględniany nie tylko w klasyfikacji klinicznej, lecz także w klasyfikacji prognostyczno-morfologicznej guza** [191].

Lokalizacja ogniska pierwotnego

Lokalizacja ogniska pierwotnego Nb jest związana z anatomicznym usytuowaniem układu współczulnego. Najczęstszym miejscem rozwoju tego nowotworu są nadnercza (40% guzów) i jama brzuszna (25%), ale nowotwór ten może rozwijać się także w śródpiersiu (15%), okolicy kręgosłupa szyjnego (5%)

i w miednicy (5%) [226]. Pierwotne ognisko Nb zlokalizowane wewnątrzczaszkowo występuje wyłącznie sporadycznie. **Na podstawie spostrzeżeń klinicznych uznano, iż Nb z pierwotną lokalizacją śródpiersiową charakteryzują się łagodniejszym przebiegiem i lepszym rokowaniem** [173]. Fakt ten może być związany z częściej występującą w tej lokalizacji korzystną prognostycznie budową morfologiczną tkanki nowotworowej. Ponadto przypuszcza się, że guzy zlokalizowane w śródpiersiu rozwijają się z embrionalnie odmiennych komórek prekursorowych [52]. Ognisko pierwotne Nb zlokalizowane w jamie brzusznej jest zazwyczaj trudniejsze diagnostycznie, co opóźnia rozpoznanie i podjęcie leczenia. Bogata symptomatologia kliniczna guzów nowotworowych w lokalizacji śródpiersiowej ułatwia wcześniejszą diagnozę i może pozytywnie wpłynąć na osiągane wyniki leczenia [52,163].

Przerzuty

Większość pierwotnych ognisk Nb charakteryzuje skłonność do szybkiego tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych i różnych odległych narządów, w tym najczęściej: do kości (80%), szpiku (65%), wątroby, płuc i ośrodkowego układu nerwowego [191]. **We wczesnych obserwacjach klinicznych zauważono, że obecność przerzutów do kości jest szczególnie niekorzystnym czynnikiem rokowniczym** [41].

Markery biochemiczne jako wskaźniki prognozy

Postęp w badaniach biochemicznych w latach 80-tych pozwolił na identyfikację markerów Nb oznaczanych w surowicy krwi, bądź w moczu jako kolejnych wskaźników prognozy. Wskaźniki biochemiczne odgrywają ważną rolę wspomagającą dla wcześniej zidentyfikowanych klinicznych czynników prognostycznych. Spośród wielu proponowanych markerów biochemicznych szerokie zastosowanie znalazły tylko takie, które mogły być oznaczane w większości laboratoriów szpitalnych. Należą do nich:

1. **Dehydrogenaza kwasu mlekowego (LDH)** - marker martwicy komórek jest niespecyficznym wskaźnikiem aktywności nowotworu nie tylko w Nb, ale także w innych rozrostach nowotworowych (w guzach zarodkowych i w hematologicznych chorobach rozrostowych) [198]. Podwyższone stężenie LDH w surowicy krwi stwierdza się u 77-83% pacjentów z rozpoznaniem Nb. Stężenie tego enzymu w surowicy krwi koreluje z szybkością wzrostu nowotworu [198,219]. **Udowodniona została silna korelacja podwyższonego stężenia LDH z niekorzystnym przebiegiem choroby i od 1992 roku amerykańska grupa *Pediatric Oncology Group* (POG) zaliczyła ten marker do jednego z najważniejszych biochemicznych czynników rokowniczych** [98].

2. **Ferrytyna** - rozpuszczalna glikoproteina produkowana przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego, znalazła zastosowanie w określaniu grup ryzyka w wielu protokołach terapeutycznych Nb. Podwyższone jej stężenie w surowicy krwi przekraczające 142 ng/ml stwierdza się u połowy pacjentów. Większość tych chorych (66%) prezentuje III i IV stadium kliniczne choroby. Jednocześnie większość pacjentów ze stwierdzanym niskim stadium zaawansowania choroby i w stadium IVs wykazuje prawidłowe stężenie ferrytyny w surowicy krwi [97]. Badania wskazują, iż część komórek neuroblastoma posiada zdolność produkowania i sekrecji ferrytyny. Przypuszcza się, że **niekorzystny wpływ wysokiego stężenia ferrytyny w surowicy krwi chorych z Nb może być wynikiem jej supresyjnego działania na układ immunologiczny pacjentów**, poprzez hamowanie zarówno odporności nieswoistej jak i swoistej komórkowej. To zahamowanie odpowiedzi immunologicznej może ułatwiać rozwój choroby nowotworowej [98].

3. **Enolaza neurospecyficzna (NSE)** jest nie tylko uznanym wskaźnikiem rokowniczym, ale również diagnostycznym. Jest to enzym związany z komórkami wywodzącymi się z układu neuroektodermalnego. Jej stężenie w surowicy przewyższający 100 ng/ml koreluje z niekorzystnym przebiegiem choroby. Zależność ta jest najsilniej wyrażona w odniesieniu do wieku niemowlęcego [280].

4. **Katecholaminy** są ważnym wskaźnikiem diagnostycznym, gdyż komórki Nb które wywodzą się z komórek prekursorowych układu sympatycznego posiadają potencjalne możliwości ich produkowania. Stąd też charakterystyczną właściwością zwojaka zarodkowego jest podwyższony poziom katecholamin w surowicy krwi pacjenta, jak też ich metabolitów wydalanych z moczem tj kwasu vanilinomigdałowego (**VMA**) i homowanilinowego (**HVA**). Szlak metaboliczny syntezy katecholamin może być niekomletny, zwłaszcza w mniej dojrzałych komórkach i wówczas z komórek nowotworowych uwalniane są pośrednie produkty syntezy katecholamin, jak dihydroksyfenoloalanina (DOPA), czy dopamina. W komórkach Nb o cechach większej dojrzałości częściej produkowane i uwalniane są końcowe produkty syntezy katecholamin, czyli adrenalina i noradrenalina. Podwyższony poziom katecholamin lub produktów ich metabolizmu nie jest silnym wskaźnikiem prognostycznym. Natomiast zwiększona ilość kwasu HVA na niekorzyść VMA, którą odzwierciedla stosunek HVA/VMA >1 jest czynnikiem rokowniczym świadczącym o niedojrzałości komórek Nb [98,236,279]. **Najbardziej niedojrzałe morfologicznie postacie guzów Nb nie posiadają zdolności produkowania katecholamin i w takich przypadkach poziom katecholamin w surowicy krwi pacjentów pozostaje prawidłowy [98].**

1.3.2. Czynniki histologiczne

Zwojak zarodkowy współczulny wywodzi się z prekursorów układu nerwowego współczulnego (WUN). Fizjologiczny rozwój i stopniowe dojrzewanie różnych elementów WUN, z którego wywodzi się Nb mogą być jedną z przyczyn różnorodności biologicznej tego nowotworu.

Fizjologiczny rozwój tego układu można podzielić na trzy zasadnicze etapy [175]:

Etap I – oddzielania się komórek prekursorowych WUN od pierwotnej cewy nerwowej i migracji w okolicę grzbietową wzdłuż przebiegu aorty.

Etap II – przekształcania się komórek prekursorowych w komórki zwojów przykręgowych i pierwotnych splotów przedkręgowych otaczających główne naczynia brzuszne. Część tych komórek nabiera zdolności odpowiedzi na glukokortykoidy i z nich powstają nadnercza. Komórki te tracą właściwości neuronalne i zaczynają produkować substancje o właściwościach endokrynnych. Pozostałe komórki, które nie osiągnęły w migracji tkanki docelowej, ulegają apoptozie.

Etap III – dojrzewania komórek prekursorowych w miejscach ich ostatecznej lokalizacji i nabywania fenotypu komórek chromochłonnych ze zdolnością produkcji neurotransmiterów.

Prawidłowy przebieg kolejnych etapów dojrzewania układu współczulnego jest kontrolowany przez dwa główne szlaki sygnalizacyjne: szlak neurotrofin działających poprzez receptory TRK oraz szlak czynników pochodzących z rodziny neurotrofin glejowych działających przez system receptorów RET [54].

Proces kancerogenezy może rozpocząć się na różnych etapach fizjologicznego dojrzewania części współczulnej układu nerwowego. W Nb wykazano zaburzenia w obu szlakach kontrolujących prawidłowy rozwój tego układu [54].

Klasyfikacja morfologiczna guzów typu neuroblastoma

Guzy typu neuroblastoma zbudowane są z dwóch podstawowych populacji komórek. Są to komórki szeregu neuroblastycznego oraz komórki podścieliska (Schwanna). Guzy te prezentują histologicznie szerokie spektrum obrazów, będących wyrazem różnicowania, dojrzewania i różnych proporcji obydwu wymienionych składowych. Komórki szeregu neuronalnego zależnie od stopnia dojrzałości przedstawiają obraz od prymitywnych drobnych, okrągłych komórek *(„round blue cells”)*, aż do dojrzewających komórek zwojowych lub dojrzałych gangliocytów. Populacja komórek podścieliska osłonkowego typu Schwannian może być obecna w postaci pojedynczych komórek lub stanowi pole zrębu dla komórek zwojowych, a nawet staje się dominującą populacją w guzie. Klasyfikacja morfologiczna guzów neuroblastycznych opiera się na ocenie stopnia dojrzałości i ilości podścieliska w guzie [231].

Rola i pochodzenie komórek Schwanna w guzach Nb nie jest do końca poznana. Ambros i wsp. uznaje, iż są to komórki prawidłowe, pochodzące z nerwów obwodowych w otoczeniu, naciekające tkankę nowotworową [4], choć badania innych autorów sugerują nowotworowe pochodzenie tych komórek. Uważają oni, że neuroblasty i komórki Schwanna wywodzą się ze wspólnego prekursora tkanki nowotworowej lub wywodzą się z mesenchymy naczyniowej [172,208]. Komórki Schwanna pełnią różnorodne funkcje, zależnie od fenotypu mielinizacyjnego i niemielinizacyjnego. Przede wszystkim tworzą osłonkę wokół aksonu, mogą produkować elementy błony podstawnej i białka macierzy pozakomórkowej. Uważa się, że podścielisko z komórkami Schwanna poprzez liczne czynniki parakrynne pozostaje w ścisłych interakcjach z neuroblastami w kontekście regulacji ich proliferacji, angiogenezy, dojrzewania i wzrostu guza [4,5,50].

Opracowanie idealnej morfologicznej systematyki guzów Nb jest trudne, ze względu na ich znaczną heterogenność. Dodatkową komplikacją jest zróżnicowana budowa morfologiczna w obrębie tego samego guza, gdzie często sąsiadują z sobą pola o różnej dojrzałości histologicznej. Wyrazem tych trudności są kolejne zmieniające się klasyfikacje guzów neuroblastycznych ulegające zmianom i kształtujące się przez wiele lat.[141].

Pierwsze próby klasyfikacji podjęli w latach 60-tych i 70-tych Beckwith-Martin i wsp., Huges i wsp., Makinen i wsp. [13,109,232]. Proponowane przez nich kryteria diagnostyczne odnosiły się do cech i zmian jakościowych w obrębie guza bez oceny ilościowej, co stanowiło ograniczenie w obiektywności i powtarzalności metody.

W roku 1984 Shimada i wsp wprowadzili system klasyfikacyjny morfologiczno-prognostyczny, uwzględniający morfologię guza i ilość podścieliska z elementami oceny ilościowej. Ocenie podlegał stopień dojrzałości komponentu neuroblastycznego i rozwoju podścieliska osłonkowego. W systemie Shimada wyróżnione zostały guzy ubogo- i bogatopodścieliskowe. Dla celów prognostycznych jako istotne elementy włączono ponadto indeks mitotyczno-kariorektyczny [232]. System klasyfikacji morfologiczno-klinicznej dzielił guzy na korzystne i niekorzystne prognostycznie. Shimada podzielił guzy Nb na dwie grupy: bogato- i ubogopodścieliskowe w zależności od przewagi neuroblastów lub komórek Schwanna. W grupie bogatopodścieliskowej wyróżnione zostały: typ dobrze zróżnicowany (z przypadkowym układem neuroblastów w dominującym podścielisku, mieszany (z obecnością gniazd niedojrzałych neuroblastów) i guzkowy (z obecnością odgraniczonych guzków neuroblastycznych w podścielisku). W grupie ubogopodścieliskowej podział zależał od stopnia różnicowania neuroblastów i aktywności mitotycznej komórek. Uzupełnienia klasyfikacji Shimada dokonał Joshi, który wprowadził dodatkowy element w ocenie morfologii guza, jakim jest obecność zwapnień w tkance Nb [114].

Ostatnią przyjętą w 1999 roku jest klasyfikacja zaproponowana przez międzynarodowy komitet *International Neuroblastoma Pathology Committee* (INPC) - przyjęta i zaakceptowana do klasyfikacji WHO (tab. 5) [222]. System ten zawiera elementy klasyfikacji Shimada, poszerzone o dodatkowe kryteria kliniczno-patologiczno-morfologiczne [231,232]. Wg tej klasyfikacji szczegółowo określone zostały trzy podstawowe kategorie histologiczne guzów z grupy zwojaka zarodkowego współczulnego:

- **neuroblastoma** – zwojak zarodkowy współczulny,
- **ganglioneuroblastoma** – nerwiak zwojowokomórkowy,
- **ganglioneuroma** – zwojakonerwiak.

W klasyfikacji INPC dodatkowo ocenia się aktywność mitotyczną. Korzystnym czynnikiem rokowniczym pozostał też wiek pacjenta < 1,5 roku życia w guzach typu Nb i guzkowym typie GNB. Klasyfikacja zaleca również ocenę nieprawidłowości genetycznych, jak amp *NMYC*, del(1p) i ploidia DNA [222].

Nadal jednak opisywane są takie obrazy morfologiczne Nb, które trudno jest zaszeregować do przyjętego systemu jak np. przypadki wielkokomórkowego guza Nb opisane przez Tornuczky [256].

Tab. 5. Prognostyczna klasyfikacja morfologiczno-patologiczna INPC oparta o system Shimady [231].

Tab. 5. Prognostic classification related to morphological and pathological criteria of INPC according to Shimada classification.

Grupa prognostyczna *Prognostic group*	Wiek pacjenta *Age of patient*	Podścielisko *Stroma*	Typ histologiczny *Histological type*	Aktywność proliferacyjna Nb (MKI*) *Proliferative activity (MKI)*
„korzystna" *„favorable"*	każdy wiek *every age*	Bogate *Stroma rich*	bez struktur guzkowych *without nodular structures*	-
	<18 mies życia/ *< 18 months of age*	Ubogie *Stroma poor*	niezróżnicowany *undifferentiated*	MKI < 4%
			różnicujący się *differentiating*	
	< 5 lat *< 5 years old*	Ubogie *Stroma poor*	dobrze zróżnicowany *well differentiated*	MKI <2%
„niekorzystna" *„unfavorable"*	każdy wiek *every age*	Bogate *Stroma rich*	budowa guzkowa *nodular structure*	-
	każdy wiek *every age*	Ubogie *Stroma poor*	niezróżnicowany *undifferentiated*	MKI >4%
			różnicujący się *differentiating*	
	>18 mies *> 18 months of age*	Ubogie *Stroma poor*	niezróżnicowany *undifferentiated*	MKI >2%
	>18 mies *> 18 months of age*	Ubogie *Stroma poor*	różnicujący się *differentiating*	MKI 2% - 4 %
	>5 lat *> 5 years of age*	Ubogie *Stroma poor*	dobrze zróżnicowany *well differentiated*	MKI <2%

MKI* = indeks mitotyczno-kariorektyczny/ *mitotic-karriorhexis index*

Ostatnia klasyfikacja INPC z podziałem na korzystną i niekorzystną histologię okazała się niezależnym i znamiennym wskaźnikiem rokowniczym [231].

1.3.3. Czynniki immunohistochemiczne

Szybki rozwój badań immunohistochemicznych rozszerzył diagnostykę histologiczną nowotworów oraz zwiększył możliwości bardziej precyzyjnej klasyfikacji guzów Nb do określonego typu morfologiczno-klinicznego. Metody immunohistochemiczne pozwalają ocenić obecność ekspresji nie tylko określonych białek charakterystycznych dla poszczególnych typów nowotworów, lecz również białek, które biorą udział w zasadniczych dla rozwoju nowotworu zjawiskach, jakimi są proliferacja, apoptoza, angiogeneza, inwazyjność [95,162,200, 250,278]. Stwierdzenie aktywności typowych dla Nb markerów immunohistochemicznych, takich jak: białko S-100, synaptofizyna, NSE, chromograniny, neurofilamenty, VIP, Leu 7 jest pomocne w ocenie stopnia zróżnicowania neuronalnego tkanki Nb i jest charakterystyczne dla guzów o korzystniejszym przebiegu [191,250].

1.3.3.1. Aktywność proliferacyjna

Rozrost guza jest wypadkową procesów proliferacji i apoptozy komórek. Oba te zjawiska są zdeterminowane przez współdziałanie wielu czynników molekularnych, które kontrolują cykl komórkowy. Procesy zarówno proliferacji jak i apoptozy u ssaków znajdują się pod kontrolą tego samego genu c-myc i wszystkie komórki w fazie podziałowej wykazują ekspresję tego genu. Ekspresja c-myc jest podtrzymywana przez tzw. czynniki przeżycia, które zostały zidentyfikowane jako IGF i PDGF. W przyjętym modelu konkurencji apoptozy i proliferacji czynniki te działają poprzez hamowanie szlaku metabolicznego prowadzącego do apoptozy, dzięki czemu otwiera się szlak metaboliczny proliferacji komórek [201].

Wzmożona proliferacja komórek, przejawiająca się wysokim indeksem proliferacyjnym, jest charakterystyczną cechą większości guzów złośliwych i stanowi wartościową informację prognostyczną w wielu nowotworach. Stopień aktywności proliferacyjnej jest wynikiem działania kompleksu czynników molekularnych mających wpływ na cykl komórkowy. Te czynniki, podobnie jak i cały metabolizm komórkowy pozostają pod kontrolą genomu komórki [94].

Miernikiem aktywności mitotycznej stosowanym w klasyfikacji morfologicznej jest indeks mitotyczny, wyznaczany przez liczbę mitoz stwierdzanych na 5000 komórek nowotworowych w preparatach histologicznych [231]. Ocenę proliferacji można też przeprowadzić metodą cytometrii przepływowej z identyfikacją i określeniem liczby komórek w określonej fazie cyklu podziałowego [24].

Immunohistochemiczna ocena aktywności proliferacyjnej tkanek stała się możliwa od czasu odkrycia antygenów proliferacyjnych w jądrach komórkowych, do których należą Ki-67 oraz PCNA. Antygen proliferacyjny jądra

komórkowego PCNA jest składnikiem δ-polimerazy DNA i był pierwszym antygenem wykorzystywanym w badaniach immunohistochemicznych do oceny kinetyki komórek nowotworowych oznaczanym w materiale tkankowym utrwalonym w bloczkach parafinowych [94,272]. Jego największa aktywność ujawnia się w późnym okresie fazy G1 i w fazie S cyklu komórkowego [157]. PCNA okazał się antygenem o mniejszej specyficzności w stosunku do cyklu komórkowego i mniej czułym wskaźnikiem prognozy niż później wykryty antygen Ki-67 [211]. Ki-67 wykryto dzięki zidentyfikowaniu autoprzeciwciał w surowicy chorych z toczniem rumieniowatym i w chorobach rozrostowych [123,169].

Ki-S5 – przeciwciało znakujące antygen jądrowy Ki-67 jako pierwszy opisał Gerdes i wsp. Antygen ten jest obecny w jądrze komórkowym jedynie w okresie proliferacji komórek [86]. W dalszych badaniach Gerdes wykazał, że ten antygen pojawia się we wczesnym etapie fazy G1 i jest wykrywany w kolejnych fazach S,G2,M cyklu, natomiast nie jest wykrywalny w fazie spoczynkowej G0. Przypuszcza się, że Ki-67 jest syntetyzowany na początku cyklu pod wpływem mitogenów. Badania ostatnich lat sugerują, że bierze on aktywny udział w kontroli czasu mitozy [218]. Ze względu na obecność Ki-67 we wszystkich fazach podziałowych komórki, badania immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał Ki-S5 p/w temu antygenowi stanowią podstawę oceny frakcji proliferacyjnej w tkankach [86]. Oznaczanie antygenu Ki-67 może być przeprowadzane w tkankach utrwalonych w bloczkach parafinowych, dzięki czemu możliwe jest oznaczanie aktywności proliferacyjnej tkanek w badaniach retrospektywnych [48]. **Procent komórek pozytywnie znakowanych przeciwciałem Ki-S5 wyznacza frakcję proliferacyjną populacji komórek nowotworowych i ta wartość jest nazywana indeksem proliferacyjnym** [90].

Pierwsza praca wykazująca wartość prognostyczną aktywności proliferacyjnej (z zastosowaniem przeciwciał p/w antygenowi PCNA) w guzach Nb została opublikowana w roku 1993 przez Kawasaki i wsp [120]. Indeks proliferacyjny waha się w tej grupie guzów w szerokich granicach od 0 do 82% [130]. Stwierdzono współzależność aktywności proliferacyjnej i typu morfologicznego guzów Nb. W zależności od typu morfologicznego Nb komórki znakowane Ki-67 mogą występować w skupieniach – tak to się dzieje w guzach o budowie złożonej lub są one równomiernie rozproszone i intensywnie znakowane w guzach niezróżnicowanych i niskozróżnicowanych [130,165].

Wykazano związek aktywności proliferacyjnej z niektórymi prognostycznymi markerami genetycznymi w tym guzie: ploidią DNA i amp *NMYC*. W guzach aneuploidalnych Nb stwierdza się niższy indeks proliferacyjny [89]. Ocena proliferacji w guzach z obecnością amp *NMYC*, wykazała znamiennie wyższy wskaźnik proliferacji [86].

Rudolph i wsp. udowodnili, że **wysoki indeks proliferacyjny stanowi w guzach typu Nb niezależny czynnik prognostyczny u pacjentów > 1 roku życia**

[211]. Guzy w IV stadium zaawansowania klinicznego u chorych > 1 roku życia mają znamiennie wyższy wskaźnik proliferacji niż guzy mniej zaawansowane [211]. Opublikowane w 2003 roku wyniki badań Kramsa i wsp. potwierdzają rolę prognostyczną indeksu proliferacyjnego, gdyż IP > 10% wiąże się z krótszym EFS i OS pacjentów [129]. Natomiast wysoka aktywność proliferacyjna guzów rozwijających się u pacjentów poniżej 1 roku życia nie ma takiego znaczenia [86,88].

1.3.4. Czynniki genetyczne

Podstawę rozwoju nowotworów złośliwych stanowią specyficzne aberracje chromosomalne z aktywacją określonych onkogenów i unieczynnieniem genów supresorowych. Zmiany w genotypie komórki zmieniają jej cechy biologiczne. W następstwie w komórce pojawiają się nowe właściwości, które decydują o agresywności nowotworu. Za nowe właściwości biologiczne odpowiedzialne są produkty białkowe zmienionego genomu, a badanie ich aktywności bywa pomocne w prognozowaniu przebiegu choroby [95,214].

Zmiany chromosomalne stwierdzane w Nb mogą mieć charakter liczbowy lub strukturalny. Zmiany liczbowe w postaci zwiększenia liczby chromosomów (hiperdiploidia), spotykane w części tkanek Nb, okazały się jednym z czynników warunkujących przebieg kliniczny tej choroby. W ogromnej większości zwojaków zarodkowych współczulnych występują też zmiany strukturalne pod postacią [266]:

- amplifikacji fragmentów DNA,
- utraty fragmentów chromosomów (delecje),
- obecności niepełnej trisomii,
- obecności dodatkowych całych chromosomów lub ich utraty.

Ten nieprawidłowy materiał genetyczny determinuje różnorodny przebieg kliniczny Nb i pewne zmiany genetyczne uznane są za ważne czynniki prognostyczne [148,152].

Mimo zidentyfikowania aktywności wielu genów zaangażowanych w proces kancerogenezy w Nb, dotychczas nie została wykryta pojedyncza swoista mutacja genowa lub aberracja chromosomalna, która inicjuje ten proces [35,255].

Ploidia komórkowa

W roku 1984 Look po raz pierwszy zwrócił uwagę, że część guzów Nb posiada zwielokrotniony materiał genetyczny (DNA). Badania metodą cytometrii przepływowej wyróżniły wśród postaci niemowlęcych guzy hiperdiploidalne i diploidalne [144]. Badania Look'a i wsp. określiły częstość występowania

guzów Nb o różnej ploidii: guzy diploidalne występują z częstością 34%, hiperdiploidalne 65% i hipodiploidalne u 1% chorych [145].

W tym samym okresie Kaneko i wsp. przeprowadzili badania ploidii metodą cytogenetycznej oceny kariotypu i wyróżnili w Nb trzy najczęściej występujące typy ploidii: okołodiploidię, okołotriploidię i okołotetraploidię [117]. Udowodniona została prognostyczna wartość ploidii komórkowej u niemowląt [6,27,145]; przeważa pogląd, iż niemowlęta z guzami triploidalnymi stanowią odrębną grupę o bardzo dobrym rokowaniu [27]. U pacjentów starszych, powyżej 1 roku życia prognostyczna wartość tego parametru jest mniejsza, gdyż niezależnie od ploidii przebieg choroby w większości przypadków bywa niekorzystny [95].

Dalsze badania dotyczące korelacji ploidii z innymi czynnikami prognostycznymi w zwojaku zarodkowym pozwoliły znaleźć związek między występowaniem diploidii i tetraploidii, a obecnością amplifikacji onkogenu ***NMYC*** w guzie**. Potwierdzona została także silna korelacja diploidii z wiekiem i stadium zaawansowania choroby** [6].

Amplifikacja onkogenu NMYC

NMYC należy do rodziny protoonkogenów, które kodują białka jądrowe i tworzą heterodimery z białkiem MAX przez pętlę HLHZip. Powstały kompleks MYC-MAX uaktywnia dużą grupę genów zależnych od onkogenu *NMYC* i pobudza szereg specyficznych szlaków metabolicznych zaangażowanych w cykl podziałowy komórki [276]. Jednocześnie kompleks ten wpływa na zahamowanie apoptozy i pobudza transformację nowotworową. Czas życia białka *NMYC* jest krótki i wynosi 20-30 min [146].

W warunkach fizjologicznych ekspresja onkogenu *NMYC* jest ograniczona do wczesnego okresu embrionalnego. Onkogen ten jest czynnikiem transkrypcyjnym, fizjologicznie aktywnym w okresie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego, zwojów kręgowych, płuc, i nerek [240]. Prawdopodobnie odgrywa też ważną rolę w prawidłowym rozwoju układu sercowo-naczyniowego, gdyż jego brak powoduje ciężkie wady tego systemu [170].

Różnego typu zaburzenia genetyczne prowadzące do nieprawidłowej ekspresji genu *NMYC* spowodowane jego amplifikacją lub translokacją chromosomalną są spotykane nie tylko w Nb, lecz w różnych innych nowotworach i wskazują na jego potencjał onkogenny. Amplifikację tego onkogenu sporadycznie stwierdza się w drobnokomórkowym raku płuc, w siatkówczaku i pęcherzykowej postaci mięśniakomięsaka [146].

Amplifikacja, czyli selektywne zwiększenie liczby kopii genu jest zjawiskiem genetycznym, w którym dochodzi do aktywacji i zwiększenia potencjału onkogennego protoonkogenów w procesie kancerogenezy [226]. W wyniku tego

zjawiska dochodzi do nadprodukcji w komórce nowotworowej specyficznych produktów białkowych. Nieoczekiwane amplifikacje onkogenów pojawiają się w wielu nowotworach u ludzi i zostały uznane za jeden z ważniejszych mechanizmów towarzyszących kancerogenezie w guzach litych [226,238].

Proces amplifikacji może ujawniać się w dwojaki sposób:

- w miejscu usytuowania pierwotnego genu, wewnątrzchromosomalnie (amplifikacja „*in situ*") np. w guzach sutka amp11q13,
- w regionach odległych od stałego miejsca amplifikowanego onkogenu, wewnątrz – lub zewnątrzchromosomalnie jak to się dzieje w Nb.

Dla guzów pochodzenia neuronalnego najbardziej charakterystyczna jest amplifikacja *NMYC* (amp *NMYC*), która szczególnie często (21-30%) występuje w guzach Nb [27]. Początkowo amp *NMYC* była identyfikowana jako acentryczne, podwójne malutkie chromosomy (dmin) [56] oraz regiony wewnątrzchromosomalne o zatartej strukturze prążkowej *„homogenously staining regions"*= hsr [21,143]. Rozwój badań cytogenetycznych umożliwił dokładne zbadanie materiału ulegającego amplifikacji. W 1983r Schwab i wsp. nazwali amplifikowany materiał onkogenem *NMYC* ze względu na jego podobieństwo do onkogenów myc. Miejscem pierwotnej lokalizacji onkogenu *NMYC* jest chromosom 2p23-24 [220]. W poszczególnych guzach amplifikowany region posiada różne rozmiary od 100 kb do ponad 1 Mb [220]. Różne rozmiary amplikonu zależą od dodatkowych genów koamplifikujących, które występują zawsze łącznie z amplifikacją *NMYC*. Dotychczas zidentyfikowano geny *DDX1 i NAG*. Prowadzone są badania nad identyfikacją kolejnych dwóch genów [88].

Amp *NMYC* nie zachodzi w miejscu jego stałej lokalizacji na chromosomie 2,23-24 [223]. Badania cytogenetyczne w liniach komórkowych Nb ujawniły jednoczesną obecność komórek nowotworowych i komórek z amplifikacją pozachromosomalną onkogenu *NMYC* i komórek bez amplifikacji pozachromosomalnej. Nasuwa to przypuszczenie, iż w procesie powstawania amplifikacji dochodzi do niekontrolowanych replikacji i rekombinacji z powstaniem struktur pozachromosomalnych, które mogą integrować się z materiałem różnych chromosomów. W obrębie tych chromosomów może następować dalsza amplifikacja [55]. Częstym miejscem takiej integracji *NMYC* z chromosomami jest długie ramię chromosomu 17 [182].

Poznane następstwa molekularne amplifikacji *NMYC* obejmują:

1. hamowanie białek indukujących apoptozę oraz zmniejszenie wrażliwości komórek na działanie leków indukujących apoptozę [277],
2. pobudzenie ekspresji genów zaangażowanych w procesy transkrypcji, translacje i proliferację komórkową [224],
3. stymulowanie angiogenezy zarówno w badaniach na hodowlach komórkowych jak i w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach z Nb poprzez

hamowanie aktywności różnych inhibitorów angiogenezy, jak activina A należąca do rodziny TGFb czy cytokina IL-6 [226],

4. hamowanie aktywności białek szkieletowych komórki (nestyny) i białek macierzy pozakomórkowej oraz ich regulatorów, co ułatwia rozrost nowotworu i tworzenie przerzutów [251],
5. hamowanie aktywności wielu genów supresorowych, między innymi zlokalizowanego w regionie 1p35-36 genu supresorowego *SHEP 21N* [262],
6. wpływ na szlaki metaboliczne indukowane przez neurotrofiny i ich receptory Trk z nasileniem działania proliferacyjnego tych czynników, bez większego wpływu na różnicowanie komórek [250],
7. wzrost oporności na leki przez stymulację ekspresji białka MRP1 [151].

Amp *NMYC* dotyczy 10% wszystkich guzów zlokalizowanych oraz guzów w stadium IVs [195]. W niektórych pracach częstość występowania amp *NMYC* w stadium IVs stwierdzono aż w 30% przypadków, ale zjawisko to odgrywa mniejszą rolę prognostyczną w tym szczególnym stadium klinicznym [225]. Badania Tonini i wsp. ujawniły, iż guzy z amplifikacją w stadium IVs nie zawsze kojarzą się z agresywnym przebiegiem klinicznym [255]. Zauważyć należy, że amp *NMYC* nie jest jedynym wskaźnikiem agresywnego przebiegu Nb, gdyż nie we wszystkich guzach o agresywnym przebiegu klinicznym amp *NMYC* jest obecna [30].

W badanych tkankach poszczególnych guzów Nb stwierdza się różną liczbę kopii *NMYC* od dwu do kilkuset. Ta różnorodność liczby kopii wynikać może z tendencji do utraty lub nierównego podziału części materiału acentrycznych malutkich chromosomów (dmin) w trakcie kolejnych podziałów [56]. Jako wskaźnik zwiększonej agresywności guza przyjęto liczbę kopii *NMYC* > 10 i ta liczba definiuje amplifikację *NMYC*. Badania kliniczne przeprowadzone przez Valent w 2002 r sugerują, że liczba kopii *NMYC* w komórkach Nb 2-7 nie wiąże się ze wzrostem agresywności guza i jego szybką progresją, natomiast może wpływać hamująco na zjawisko apoptozy [261]. **Stwierdzono, że amp *NMYC* występuje zarówno w guzie pierwotnym jak i w przerzutach oraz wznowach nowotworu u tego samego chorego** [33].

Ekspresja *NMYC* nie jest równoległa do liczby kopii tych genów, gdyż niektóre guzy bez amp *NMYC* wykazują różne poziomy ekspresji tego onkogenu [233]. Co więcej, wysoki poziom ekspresji *NMYC* u niemowląt nie jest wskaźnikiem złej prognozy, a niski poziom ekspresji *NMYC* u pacjentów > 1 roku życia nie musi być wskaźnikiem korzystnym. Potwierdzają to niezależne badania przeprowadzone w różnych ośrodkach [25,158,159]. Tak więc poziom ekspresji tego genu badany metodą RT-PCR nie może być uznanym niezależnym czynnikiem prognozy.

Wśród metod wykrywania amp *NMYC* stosowane są metody: PCR, Southern Blot i FISH [27]. Żadna z wymienionych metod nie jest doskonała. Metoda Southern blot ocenia amp *NMYC* bez uwzględnienia heterogenności guza. Metoda FISH ocenia *NMYC* w pojedynczych komórkach guza bez możliwości obliczenia liczby kopii w przypadku znacznej ich liczby. Ekspresja onkogenu *NMYC* oceniana ilościową metodą RT-PCR umożliwia ocenę ekspresji, ale nie jest odpowiednikiem liczby kopii *NMYC* [233]. W chwili obecnej metoda FISH zyskała największą aprobatę, ze względu na małą ilość tkanki potrzebną do jej wykonania i możliwość oceny stopnia amplifikacji na poziomie komórkowym [27].

Spośród biologicznych markerów Nb amplifikacja onkogenu *NMYC* jest jednym z najsilniejszych wskaźników agresywności guza, niezależnie od obrazu klinicznego choroby nowotworowej. Marker ten posiada szczególną wartość prognostyczną w guzach o niskim stadium zaawansowania klinicznego, gdyż wyodrębnia część guzów o szczególnie agresywnym charakterze.

Amplifikacje innych genów w zwojaku zarodkowym

W obrębie niektórych guzów zwojaka zarodkowego współczulnego stwierdzono amplifikowany materiał chromosomalny pochodzący z innych miejsc jak np. *MDM2* z chromosomu 12q, czy gen homebox *MEIS1* z chromosomu 2p15 identyfikowany w postaci hsr w chromosomie 1p [55,216].

Amplifikacja *MDM2* stwierdzana w Nb zawsze zachodzi w obrębie chromosomu 12q, co może wskazywać na odrębną patogenezę molekularną amp *MDM2* i amp *NMYC*. W niektórych guzach identyfikowane są obie te amplifikacje jednocześnie. Tłumaczy się to szczególnie nasiloną niestabilnością genomową takich guzów, choć nie wyjaśniono dotąd, dlaczego amplifikacja dotyczy tylko tych dwóch genów [226].

Utrata materiału chromosomalnego – delecje

Regiony chromosomalne ulegające utracie w Nb są szczegółowo analizowane w poszukiwaniu genów supresorowych. W zwojaku zarodkowym występują delecje dotyczące różnych chromosomów: 1p, 2q, 3p, 4p,9p,11q, 14q, 16p i 19q [171,225]. Dotąd nie zidentyfikowano stałego, występującego w każdym guzie genu supresorowego, który ulega delecji. Prawdopodobnie wynika to z heterogenności Nb lub też z udziału większej liczby genów supresorowych w jego rozwoju [225]. Taki mechanizm kancerogenezy sugerowany jest także w innych nowotworach [159].

Aberracje chromosomowe pod postacią delecji w zwojaku zarodkowym najczęściej dotyczą różnych regionów krótkiego ramienia chromosomu 1 [51].

Delecja chromosomu 1p

Chromosom 1 jest największym ludzkim chromosomem i zawiera materiał genetyczny stanowiący 8,3% całej długości ludzkiego genomu [243]. Aberracja chromosomalna w krótkim ramieniu chromosomu 1 - del(1p) po raz pierwszy została opisana w 1977 r. przez Brodeura i wsp. [34]. Del(1p) należy do często spotykanych nieprawidłowości strukturalnych i stwierdzana jest w 19-36% tych guzów [30].

Aberracje dotyczące chromosomu 1 występują często w różnych typach guzów litych u ludzi, a także w komórkach nowotworowych niektórych chorób rozrostowych [80]. Poza zwojakiem zarodkowym, obecność del(1p) stwierdza się w komórkach mięśniakomięsaka, w raku jelita grubego, raku sutka, płuc, HCC, szyjki macicy, raku z komórek Merkela, nowotworach u chorych z zespołem MEN2, gruczolakoraku trzustki, guzach germinalnych, guzach mózgu, czerniaku złośliwym i innych [51]. Znacząca rola tego chromosomu w kancerogenezie została poparta badaniami eksperymentalnymi na modelach doświadczalnych. Zazwyczaj jednak del(1p) nie jest jedyną aberracją, a jedną z wielu stwierdzanych w badanych guzach. Okazuje się, że w poszczególnych guzach różne regiony krótkiego ramienia chromosomu 1 ulegają utracie. Wskazuje to na możliwość obecności w utraconej części chromosomu różnych genów, które mogą mieć wpływ na czynność wzrostu komórek. Schwab i wsp. sugerują, że aberracja dotycząca chromosomu 1 nie stanowi początku procesu kancerogenezy, lecz raczej bierze udział w dalszych jej etapach [221].

W guzach zwojaka zarodkowego współczulnego ze stwierdzaną del(1p), najmniejszy region w tym chromosomie, który stale ulega delecji (SRO) zlokalizowany został metodą analizy utraty heterozygotyczności (LOH) mikrosatelitarnego DNA w krótkim ramieniu chromosomu 1 w regionie między markerami mikrosatelitarnymi D1S214 a D1S468 [51,155,156]. Badania kliniczne wskazują na udział tej aberracji w rozwoju Nb, gdyż zostali zidentyfikowani pacjenci z wrodzoną del(1p) i zrównoważoną translokacją t (1,17)(p36;q11-12), u których we wczesnym okresie życia rozwinęły się guzy Nb. Obserwacje te zaowocowały szeregiem badań w poszukiwaniu genu supresorowego w regionach chromosomu 1, które ulegają delecji. Stwierdzono występowanie dwóch różnych regionów ulegających delecji: tzw. małe wewnętrzne delecje z zachowaniem większości telomeru i większe delecje z utratą dystalnego odcinka telomeru [34]. Te odkrycia sugerują możliwość występowania genów supresorowych zaangażowanych w proces kancerogenezy zlokalizowanych w różnych regionach na krótkim ramieniu chromosomu 1. Badania Hijama i wsp. wskazują nawet na możliwość występowania trzech różnych genów supresorowych w obrębie chromosomu 1p [104].

Del(1p) często towarzyszy amp *NMYC* (w 62%) lub ją poprzedza. Obie te nieprawidłowości genetyczne wpływają na wspólne drogi metaboliczne [9,242]. Przypuszcza się, że produkty genów w obrębie del(1p) mogą brać udział w regulacji aktywności genu *NMYC* [242]. Współwystępowanie amp *NMYC* i del(1p)

stwierdzono jedynie w guzach z typem większej delecji tego chromosomu [249]. Ponadto dziedziczone allele z del(1p) pochodzące od ojca często współwystępują z amp *NMYC*, zaś allele z obecną del(1p) pochodzące od matki są skojarzone z guzami bez tej amplifikacji [225].

Maris i wsp. [153] stwierdzili, że ta aberracja chromosomalna jest związana nie tylko z guzami rozsianymi, ale występuje także w części guzów zlokalizowanych, charakteryzujących się innymi korzystnymi czynnikami prognostycznymi. **Opublikowane zostały także prace, w których udokumentowano związek del(1p) z wyższym ryzykiem nawrotu choroby, ale nie ze skróconym czasem przeżycia** [153].

Częściowe delecje innych chromosomów

Wśród delecji powtarzających się w Nb, poza del(1p), często występują też delecje chromosomów 3p, 4p, 9p, 11q, 14q [241].

Określona została częstość występowania następujących aberracji chromosomalnych w Nb:

- del(3p) 26 - 19% guzów
- del(11q23) 29 - 44% guzów
- del(1p36) 29% guzów

Podkreślany jest związek del(11q) i del(3p) z bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym Nb [240]. Natomiast nie stwierdzono znaczenia rokowniczego del(14q) w zwojaku zarodkowym [166].

Aberracje chromosomu 17

Nieprawidłowy chromosom 17 w guzach Nb po raz pierwszy opisano we wczesnych latach 80-tych [27]. Udział aberracji chromosomu 17 został dogłębnie zbadany techniką porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH) [264]. Wykazano, że **najczęściej spotykaną nieprawidłowością genetyczną w zwojaku zarodkowym jest częściowa trisomia tego chromosomu stwierdzana w około 50% - 75% guzów pierwotnych** [28,149]. Trakhtenbrot i wsp. opisali występowanie aberracji chromosomu 17 w Nb, prowadzące do trisomii w trzech różnych regionach ramienia długiego17q11.2, 17q21.1 oraz 17q21.3. Zwiększenie liczby kopii chromosomu 17 często występuje w guzach okołotriploidalnych [257].

Dodatkowy fragment chromosomu 17 (częściowa trisomia 17q)

Często występującą i powtarzającą się w zwojaku zarodkowym aberracją są translokacje między 1p i 17q. [43,87]. Duża część takich guzów wykazuje obecność trisomii, a nawet hexasomii 17q21-ter. Niezrównoważona translokacja z dodatkowym materiałem chromosomalnym na długim ramieniu chromosomu 17 stała się w latach 90-tych przedmiotem zainteresowania w aspekcie

prognozowania. Częstym partnerem tej translokacji jest krótkie ramię chromosomu 1, a także chromosom 11q, ale również spotykane są i inne fragmenty pozostałych chromosomów [150]. Ten dodatkowy materiał chromosomalny posiadający długość około 20 Mb i zawierający około 200 genów stwierdzany jest w znacznej części guzów Nb. Tak znaczna liczba genów jest przyczyną trudności w identyfikacji tych, które mogą odgrywać ważną rolę w progresji nowotworu [147]. Kolejne prace dotyczące wartości prognostycznej częściowej trisomii 17q w zwojaku zarodkowym wykazały, iż jest to aberracja występująca częściej w guzach zaawansowanych, rozwijających się u pacjentów powyżej 1 roku życia i często w skojarzeniu z innymi markerami genetycznymi tego guza: del(1p) i amp *NMYC* [147]. W kilku niezależnych badaniach potwierdzono, iż ta aberracja jest wskaźnikiem złego rokowania [29,41,147,150] niezależnie od obecności amp *NMYC*. Wpływ dodatkowego materiału chromosomalnego na agresywny rozrost nowotworu tłumaczy się efektem fuzji genów na skutek translokacji lub nadmiaru genu wynikającego z niezrównoważonej translokacji [27]. Jednakże Trakhtenbrot i wsp. w roku 2002r zakwestionowali rolę częściowej trisomii chromosomu 17q w inicjowaniu rozwoju Nb sugerując, iż aberracje dotyczące chromosomu 17 mogą być zjawiskiem wtórnym w kancerogenezie zwojaka zarodkowego współczulnego. Hipotezę tę poparli badaniami ewolucji zmian dotyczących chromosomu 17 w tym samym guzie Nb w trakcie jego rozwoju. Był to guz triploidalny, który początkowo nie miał zmian w chromosomie 17, a dopiero w pewnym etapie jego rozwoju pojawił się dodatkowy materiał chromosomalny w regionie 17q11.2. Podobną ewolucję aberracji w chromosomie 17q w czasie rozwoju nowotworu zaobserwowali w innych guzach di- i tetraploidalnych [257].

Miejsce złamania w częściowej trisomii chromosomu 17 lokalizuje się najczęściej w prążku 17q11-21 [216]. Przypuszcza się, że istotną rolę we wzroście agresywności nowotworu odgrywa zachwiana równowaga między dwu lub więcej genami, która powstaje w wyniku translokacji, gdyż rokowanie w przypadku duplikacji całego chromosomu 17 w przeciwieństwie do częściowej trisomii 17q jest korzystne. Prowadzone są obecnie badania nad identyfikacją tych genów. Spodziewać się można, że będą to geny zaangażowane w kontrolę cyklu komórkowego i dojrzewanie neurogenne komórek [27]. Wśród genów zlokalizowanych w 17q szczególne zainteresowanie skupia się obecnie wokół: genu *nm23,* który pełni rolę supresora przerzutowania i genu *surviviny* - gdyż jej wysoka aktywność została zaobserwowana w guzach pierwotnych Nb o niekorzystnym przebiegu klinicznym [110]. Istotne dla prognozowania okazało się miejsce pęknięcia na chromosomie 17q. Pęknięcia proksymalne do genu *ERBB2* wiążą się z mniejszą agresywnością guza niż zlokalizowane dystalnie [147].

Anomalie dotyczące chromosomu 17q spotyka się nie tylko w Nb. Występują one także w wielu innych nowotworach (rak jajnika, rak nerki, raki głowy i szyi, rak wątroby i PNET). W wymienionych guzach aberracje chromosomu 17 są często wynikiem uformowania się izochromosomu, z towarzyszącą utratą

materiału w 17q i mutacją *TP53*. Współwystępowanie tych mutacji w Nb jest rzadkim zjawiskiem. Sądzi się zatem, że mechanizm powstawania mutacji chromosomu 17 w postaci częściowej trisomii 17q w zwojaku zarodkowym jest odmienny [27].

Jak wynika z wyżej przytoczonych danych kompleksowe wykorzystywanie nowych technik cytogenetycznych i molekularnych pozwoliło na identyfikację szerokiego spektrum aberracji chromosomalnych w zwojaku zarodkowym. Ich udział w procesach metabolicznych zachodzących w komórkach nowotworowych oraz ich wartość prognostyczna nie została do końca poznana. Nie uzyskano też ostatecznej odpowiedzi na pytanie, które z nich pełnią rolę zasadniczą i inicjującą w procesie kancerogenezy tego nowotworu, a które są zjawiskami wtórnymi [41].

Analiza współwystępowania aberracji dotyczących różnych chromosomów wykryła silne powiązania między występowaniem amp *NMYC* i del(1p) oraz między częściową trisomią 17q, del(1p) i amp *NMYC* [41]. Natomiast utrata materiału 11q odwrotnie koreluje z amp *NMYC* [29]. Również stwierdza się odwrotną korelację obecności del(14q) z obecnością zarówno amp *NMYC,* jak i del(1p) [219]. W różnych innych guzach złośliwych wykryto współzależność między utratą 11q, 14q i 3p, bez obecności innych aberracji. Na tej podstawie zidentyfikowano odrębną podgrupę postaci zaawansowanych Nb z obecnością delecji 11q, 14q i 3p i bez del(1p) lub amp *NMYC* [266].

Poszukiwania aberracji chromosomalnych przy pomocy nowoczesnych metod badawczych pozwoliły ujawnić „ukryte" submikroskopowe aberracje chromosomalne tj. zrównoważoną translokację krótkiego ramienia chromosomu 2 prowadzącą do występowania dodatkowego materiału w chromosomie 2 z utratą części różnych innych chromosomów (np. chromosomu1p lub 11q). Ujawniono też obecność dmin pochodzących z długiego ramienia chromosomu 16, w którym zlokalizowany jest gen *ATBF1* kodujący czynnik transkrypcyjny dla prawidłowej neurogenezy [156].

Podejmowane są również próby uporządkowania i wprowadzenia podziału Nb na podgrupy w zależności od genetycznych markerów prognostycznych. W roku 2001 Vandesompele i wsp.[266] zaproponowali 6 podgrup genetycznych w oparciu o wyniki analizy CGH:

1. Nb bez zmian chromosomalnych;
2. Nb z utratą lub obecnością dodatkowych całych chromosomów (głównie stwierdzane w I i II stadium klinicznym);
3. Nb z obecnością niepełnej trisomii chromosomu 17 jako jedynej aberracji chromosomalnej;
4. Nb z niepełną trisomią chromosomu 17 oraz towarzyszącymi innymi zmianami cytogenetycznymi jak del(1p) lub amp *NMYC*;

5. Nb z obecnością del(11q), bez innych aberracji (u pacjentów w IV stadium klinicznym);
6. Nb ze stwierdzaną utratą materiału genetycznego w chromosomach innych niż chromosom 1 (np. 3p,4p,14q).

Dotychczas nie określono klinicznego i prognostycznego znaczenia takich podziałów.

1.3.5. Czynniki molekularne

Dążenie do poznania mechanizmów molekularnych w Nb spowodowało rozwinięcie badań nad aktywnością poszczególnych genów, które mogą znacząco wpływać na przebieg choroby. Niektóre z tych genów zostały uznane za ważne dla informacji prognostycznej. Zalicza się do nich geny telomerazy, geny oporności wielolekowej, gen CD44, geny receptorów neurotrofin - Trk, geny apoptozy, geny rodziny *RAS*, receptora retinoinowego, jak i wiele innych, nad którymi obecnie prowadzone są badania [1,27,194,201].

W guzach wykazujących agresywność i szybką progresję potwierdzona została wysoka aktywność transkrypcyjna genu telomerazy [111,194]. W agresywnych postaciach Nb ujawniono wysoką ekspresję białka towarzyszącego oporności wielolekowej MRP, które występuje w ścisłej zależności od obecności amp *NMYC* [25]. Gen CD44 jest odpowiedzialny za syntezę glikoproteiny, która bierze udział w adhezji komórkowej. Stwierdzono niską ekspresję tej glikoproteiny w guzach zaawansowanych [1,53]. W zwojaku zarodkowym szczególnie częste jest występowanie spontanicznej regresji, która może być wynikiem zjawiska apoptozy i różnicowania się komórek. Prowadzone są badania dotyczące aktywności genów zaangażowanych w ten proces. Zaobserwowano zahamowanie aktywności kaspazy 8 – kluczowego ogniwa kaskady apoptozy w guzach z amp *NMYC*. [249]. Badania nad genami *RAS* w Nb udowodniły pozytywną korelację ekspresji *H-ras* z niskim stadium zaawansowania i długim przeżyciem chorych. Geny te są genami transkrypcyjnymi dla receptorów Trk. Ligandem Trk A, B i C - receptorów z rodziny kinazy tyrozyny, są neurotrofiny [176]. Wysoka ekspresja TrkA w komórkach zwojaka zarodkowego – koreluje z niskim stadium i skłonnością do apoptozy [225]. W guzach o fenotypie agresywnym, z obecnością amp *NMYC* stwierdza się niską ekspresję TrkA i wysoką ekspresję TrkB [150]. Ocena ekspresji *H-ras*/TrkA została zaakceptowana jako czynnik prognostyczny w określaniu grup ryzyka w Nb w niektórych protokołach terapeutycznych. Wprowadzenie oceny ekspresji genów Trk pozwala zidentyfikować guzy w stadium II i IVs bez obecności amp *NMYC*, ale z wysoką ekspresją Trk B o niekorzystnym przebiegu klinicznym [248].

Jednym z poznanych czynników stymulujących dojrzewanie komórek Nb jest kwas retinoinowy. Połączenie kwasu retinoinowego z jego receptorem na komórce zwojaka zarodkowego stymuluje dojrzewanie neuronalne tych komórek.

Wyniki badań sugerują, iż redukcja aktywności receptorów kwasu retinoinowego jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [242].

Mimo wielu zgromadzonych informacji dotyczących roli niektórych genów i mechanizmów molekularnych w procesie rozwoju tego nowotworu, dotąd nie zidentyfikowano genu, którego zmiany aktywności ujawniają się we wszystkich guzach Nb i który byłby genem inicjującym kancerogenezę w tym nowotworze. Pomimo zgromadzonych tak licznych markerów prognostycznych istnieją takie przypadki Nb, których przebieg kliniczny jest nadal zaskakujący. Dlatego też, prowadzi się intensywne badania molekularne, które głębiej pozwolą wyjaśnić biologię i zachowanie tego nowotworu.

1.4. ANGIOGENEZA (AG) W ROZWOJU NOWOTWORÓW

Rozrost nowotworu zależy nie tylko od zdolności proliferacyjnej komórek, ale także od zdolności tworzenia nowej sieci naczyń, czyli angiogenezy (AG) [79]. Nowo utworzone naczynia w tkance nowotworowej zapewniają odpowiednie zaopatrzenie w tlen i substancje odżywcze potrzebne do wzrostu nowotworu. Stanowią one również niezbędny element w procesie powstawania przerzutów [16,67]. Zainteresowanie zjawiskiem AG rozpoczęło się w latach 70-tych, kiedy po raz pierwszy Folkman zauważył, że rozwój sieci naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu jest niezbędny do zwiększenia jego wymiarów powyżej 1 cm [77,79].

W warunkach fizjologicznych proces tworzenia nowych naczyń zachodzi jedynie w okresie rozwoju wewnątrzmacicznego i kształtowania narządów oraz cyklicznie w błonie śluzowej macicy [11,59,84,202]. W zmianach patologicznych zjawisko AG stwierdza się w stanach przewlekłego zapalenia, łuszczycy, retinopatii cukrzycowej, w procesie gojenia się ran, zmianach niedokrwiennych i przede wszystkim w guzach nowotworowych w czasie ich gwałtownego wzrostu [137].

W guzach nowotworowych jest to proces złożony, w którym biorą udział komórki nowotworowe, komórki śródbłonka i podścielisko nowotworu za pośrednictwem licznych czynników wzrostu i czynników pobudzających oraz hamujących AG. Kolejne etapy tego procesu obejmują: trawienie błony podstawnej przez enzymy proteolityczne i przebudowę podścieliska. Ułatwia to inwazję, migrację i proliferację komórek śródbłonka. Tworzy się wówczas tzw. pączek naczyniowy i formują się struktury cewkowe. W dalszej kolejności powstają niedojrzałe ścianki nowych kapilarów, które stabilizowane przez komórki mięśni gładkich i pericyty zakotwiczają się w tkance nowotworowej. Proces AG kończy się dojrzewaniem naczyń [140]. W guzach nowotworowych proces ten przebiega nieprawidłowo w wyniku nieprawidłowego współdziałania czynników pro- i antyangiogennych, z przewagą procesów pobudzających tworzenie naczyń. W efekcie tworzy się sieć naczyń odmiennych od tych, które występują w warunkach

fizjologicznych. Naczynia te zwykle mają nieprawidłową strukturę, poszerzone i kręte kształty, a słabe ścianki naczyń często stają się przyczyną miejscowych krwawień [15].

Zjawisko angiogenezy jest indukowane bodźcem środowiskowym, jakim jest niskie stężenie tlenu (tak jak to się dzieje w warunkach fizjologicznych), bądź też zachodzi pod wpływem zmian ekspresji określonych onkogenów i genów supresorowych, które uaktywniają proangiogenne szlaki metaboliczne w komórkach nowotworowych. Hipoksja tkanki nowotworowej pobudza aktywność dwu kluczowych regulatorów transkrypcji (*hypoxia inducible factors*: HIF1α i HIF2α), które w komórkach indukują odpowiednie geny [271]. Do genów indukowanych w ten sposób należą onkogeny komórkowe z rodzin *src, raf, ras* [58,67].

Fenotyp angiogenny komórki może być kształtowany również jako wynik mutacji niektórych genów supresorowych np. genu *TP53*. Badania molekularne wskazują, że w różnych typach nowotworów tworzenie nowej sieci naczyń regulowane jest przez mutacje różnych genów, a wpływ na angiogenezę wywierają odmienne w różnych nowotworach czynniki [58,76].

Niektóre onkogeny kodują białka, które pełnią funkcję czynników proangiogennych lub stymulują komórki do produkcji takich czynników, czy też enzymów pobudzających tworzenie naczyń [11]. Indukcja AG może się również odbywać dzięki utracie ekspresji genów supresorowych kodujących inhibitory AG np. trombospondyny [59]. Mutacje niektórych genów supresorowych mogą też pełnić funkcję podwójną tzn. stymulować produkcję inhibitora AG i jednocześnie bezpośrednio hamować wydzielanie czynnika proangiogennego np. VEGF. Wśród poznanych dotychczas genów supresorowych, które mają wpływ na zjawisko AG, poza genem *TP53*, wymienia się gen *RB, VHL*, a także geny zlokalizowane w chromosomie 10 w glejakach oraz geny zlokalizowane w chromosomie 17 w nowotworach z grupy Nb [140].

Tworzenie sieci naczyniowej w tkance nowotworowej zależy nie tylko od angiogennego fenotypu komórek nowotworowych, lecz także od całej sieci cytokin działających w jego mikrośrodowisku. Liczne cytokiny pojawiają się w tym środowisku w wyniku procesów nie tylko auto- lecz i parakrynnego wydzielania. Część cytokin wywiera działanie proangiogenne, inne natomiast hamują proces AG. Podścielisko nowotworu jest bogatym źródłem takich czynników proangiogennych, jak IL-1, IL-6, IL-8, TGFbeta, PDGF, IGF, TNFalfa EGF, GM-CSF i M-CSF. Są one uwalniane przez fibroblasty, makrofagi i limfocyty [131,140]. Dodatkowym mechanizmem pobudzania AG jest działanie proteaz w macierzy pozakomórkowej, które mogą uaktywniać lub hamować poszczególne cytokiny [2].

Intensywność angiogenezy zależy od wzajemnych relacji między aktywnością cytokin proangiogennych i hamujących ten proces czynników antyangiogennych. Wśród poznanych czynników hamujących wyróżnić należy polipeptydy

angiostatynę, endostatynę, fragmenty prolaktyny i czynnika płytkowego 4, trombospondynę-1, tkankowe inhibitory metaloproteinaz w macierzy pozakomórkowej oraz niektóre cytokiny (interferony, IL-10, IL-12). Niektóre z tych czynników powstają na skutek degradacji większych białek, nie posiadających właściwości antyangiogennych [76].

Wśród dotychczas opisanych kilkudziesięciu cytokin mających wpływ pobudzający nowotworzenie naczyń, do najważniejszych należą śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń (VEGF) i zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów FGFb (tab. 6). Asahara i wsp. udowodnili synergizm działania obu tych cytokin [8].

Tab. 6. Główne czynniki proangiogenne.
Tab. 6. Main proangiogenic factors.

1/ Niedotlenienie tkanki/ *Hypoxia*	
2/ Czynniki wzrostu *Growth Factors*	**VEGF** - Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu *Vascular Endothelial Growth Factor* **bFGF i aFGF** - Czynnik wzrostu fibroblastów zasadowy i kwaśny *Fibroblast Growth factor; basic and acidic* **TGFα** - Transformujący czynnik wzrostu α *Transforming Growth Factor α* **GCSF** - Czynnik wzrostu granulocytarny *Granulocyte Growth Factor* **HGF** - Czynnik wzrostu hepatocytów *Hepatocyte Growth Factor* **IGF** - Czynnik wzrostu insulinowy *Insulin Growth Factor* **PDGF** - Czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego *Platelet Derived Growth Factor* **TNF** - Czynnik martwicy nowotworów *Tumor Necrosis Factor* **EGF** - Czynnik wzrostu naskórka *Epidermal Growth Factor* **PGF** - Czynnik wzrostu łożyskowyl Placental Growth Factor
3/ Proteaz *Proteases*	**gelatynazy, aktywator plazminogenu, metaloproteinazy** *gelatynases, plasmin activator, metaloproteinases*
4/ Interleukiny *Interleukines*	**Il-1, Il-6, Il-8, Il-13**
5/ Inne *Others*	**integryny, angiopoetyna-1, endotelina, prostaglandyny E, trombopoetyna, pleotropina, histamina, angiotensyna** *integrins, angiopoetin-1, endothelin, prostaglandins E, trombopoetin, pleotropin,, histamine, angiotensine*

Komórki nowotworowe pobudzają proces tworzenia naczyń także w sposób pośredni przez wytwarzanie cząsteczek chemotaktycznych dla makrofagów, komórek tucznych, fibroblastów i limfocytów. Komórki te naciekając podścielisko

same wytwarzają liczne cytokiny, czynniki wzrostu i enzymy. Enzymy produkowane przez komórki nowotworu wydzielane są do macierzy pozakomórkowej, powodują degradację błony podstawnej i ułatwiają penetrację oraz migrację komórek śródbłonka w kierunku tkanek niedotlenionych. Należy podkreślić udział licznych cząsteczek adhezyjnych obecnych w macierzy pozakomórkowej (integryny, kadheryny, selektyny). Odgrywają one zasadniczą rolę w procesie zakotwiczania nowych naczyń w otaczającej tkance i stanowią istotny element ich ostatecznego dojrzewania [2,170]. Zainteresowanie wzbudzają integryny $\alpha v\beta 3$ i $\alpha 5\beta 5$, jako czynniki podtrzymujące przeżycie komórek śródbłonka i biorące udział w ostatecznym kształtowaniu sieci naczyniowej naczyń [36,40,68]. Prowadzone są liczne badania dotyczące udziału cząsteczki adhezyjnej VCAM-1 w formowaniu naczyń. Jest to rozpuszczalny receptor integryn $\alpha 4\beta 1$, obecny na powierzchni komórek śródbłonka, a także na powierzchni niektórych komórek nowotworowych. VCAM-1 przekazuje sygnały wzmacniające integrację komórek śródbłonka z otaczającymi pericytami [83]. W niektórych guzach nowotworowych stężenie VCAM-1 koreluje z gęstością unaczynienia nowotworu [83,193].

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF)

VEGF, główny czynnik proangiogenny aktywny wyłącznie w procesie angiogenezy, jest specyficznym mitogenem dla komórek śródbłonka oraz bezpośrednio wpływa na ekspresję jego receptorów, a zablokowanie funkcji VEGF hamuje powstawanie nowych naczyń [207].

Działanie tej cytokiny [65,75] polega na:

- pobudzaniu proliferacji komórek śródbłonka,
- zwiększeniu przepuszczalności naczyń,
- stymulacji aktywatorów plazminogenu,
- indukcji integryn αV i $\beta 3$ obecnych w podścielisku zaangażowanych w proces powstawania naczyń.

VEGF jest wytwarzany przez komórki nowotworowe. Gen *VEGF* składa się z 8 egzonów i jest zlokalizowany w prążku 21.3 chromosomu 6. Podstawowym czynnikiem indukującym syntezę VEGF jest niedotlenienie. Hipoksja stymuluje czynnik VEGF poprzez czynniki transkrypcyjne HIF-1. Poza niedotlenieniem, ekspresję VEGF nasila wiele cytokin o działaniu proangiogennym, jak bFGF, PDGF, TNF, IL-1β, IL-13 [76]. Ekspresja genu *VEGF* jest hamowana przez produkt genu supresorowego *TP53* [78].

Czynnik VEGF, posiada kilka izoform, z których dwie VEGF 121 oraz VEGF 165 są rozpuszczalnymi glikoproteinami. Inne izoformy VEGF 145, VEGF 189 i VEGF 206 pozostają w połączeniu z siarczanem heparyny jako proteoglikany na powierzchni komórek [65]. Najmniejsza, całkowicie

rozpuszczalna izoforma VEGF 121 ma silne właściwości mitogenne i zwiększające przepuszczalność naczyń [74]. Dominującą izoformą, aktywną w nowotworach jest VEGF 165. **VEGF działa poprzez specyficzne receptory głównie na powierzchni komórek śródbłonka: KDR/Flk-1, Flt-1, Flt-4, neurofiliny NRP-1 oraz NRP-2. Dwa pierwsze receptory Flk-1 oraz Flt-1 należą do rodziny kinaz tyrozyny i są zlokalizowane w śródbłonku, na powierzchni komórek nowotworowych i w niektórych komórkach podścieliska [14]. Spośród poznanych receptorów rola Flk-1 w przekazywaniu sygnałów pobudzających AG została najlepiej udokumentowana** [12,66].

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF)

Czynnik ten należy do rodziny czynników wiążących heparynę. Gen *bFGF* koduje liczne izoformy tego czynnika o różnym ciężarze cząsteczkowym [38]. Działanie bFGF ma charakter zarówno parakrynny jak i autokrynny, gdyż jest on produkowany przez komórki nowotworowe, makrofagi oraz komórki śródbłonka. Czynnik ten jest kumulowany w postaci nieaktywnej w macierzy pozakomórkowej tkanki nowotworowej, a następnie w warunkach hipoksji uwalniany przez proteazy do postaci aktywnie stymulującej rozwój naczyń. bFGF działa poprzez cztery typy receptorów zlokalizowanych na powierzchni komórek endotelium, komórek mięśni gładkich oraz monocytów i makrofagów. Stymulacja tych receptorów wyzwala kaskadę sygnałów przekazywanych przez czynniki transkrypcyjne, geny *ras* i kinazę proteinową PKC, które indukują ekspresję genu *TF*. Czynnik TF stymuluje VEGF i hamuje produkcję jednego z inhibitorów angiogenezy - trombospondyny [281]. Wykazano również, że bFGF posiada właściwości pobudzania migracji komórek śródbłonka oraz naczyniowych komórek mięśni gładkich drogą chemotaksji tych komórek. Ponadto bFGF indukuje wytwarzanie proteaz i zwiększa przepuszczalność naczyń [38,280]. bFGF moduluje także środowisko pozakomórkowe zwiększając aktywność integryn. Liczne badania potwierdziły jego udział w rozwoju wielu różnych nowotworów takich jak mięśniako-mięsak prążkowanokomórkowy, rak sutka, rak pęcherza i rak nerki [38].

Inne najczęściej identyfikowane czynniki proangiogenne w nowotworach

Angiopoetyna (Ang-1) jest ligandem receptora TIE-2 z rodziny kinaz tyrozynowych. Jest to czynnik, który odgrywa ważną rolę w interakcjach między komórkami śródbłonka a otaczającym podścieliskiem. Jego podstawowa rola polega na stabilizacji struktury nowo powstałych naczyń, a jego działanie stwierdza się w późniejszych etapach Ag [280].

Angiopoetyna-2(Ang-2) hamuje aktywność Ang-1 w przypadku jednoczesnej obecności VEGF. Jej działanie prowadzi do rozluźnienia spójności między

komórkami śródbłonka i tkanką okołośródbłonkową, co sprawia, że komórki śródbłonka stają się łatwiej dostępne dla induktorów AG [81].

Czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF) składa się z dwóch współzależnych polipeptydów: łańcucha A i B. Początkowo ta molekuła była znana jako czynnik regulujący migrację i proliferację, jednak ostatnio udowodniono jej udział w AG zarówno w badaniach *in vivo* jak i *in vitro*.

Udział innych czynników pobudzających AG takich, jak TGF, IGF, HGF, EGF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-13 i innych jest różny w zależności od typu nowotworu. Mogą one działać zarówno bezpośrednio – pobudzając tworzenie naczyń jak i pośrednio przez pobudzanie ekspresji VEGF [76,140,267,269].

Czynniki hamujące angiogenezę

W warunkach fizjologicznego budowania naczyń istnieje równowaga między stymulatorami i inhibitorami AG. W procesie kancerogenezy ta równowaga zostaje zachwiana na korzyść stymulatorów, z ograniczeniem aktywności cząsteczek hamujących AG. Wśród inhibitorów do najlepiej poznanych należą angiostatyna i endostatyna opisane po raz pierwszy przez O'Reily i wsp. w 1994 roku [37,183,184]. Innym czynnikiem o działaniu hamującym tworzenie naczyń jest trombospondyna [269]. Obecnie podejmowane są próby zastosowania tych czynników jako jednej z metod terapii angiogennej. Próby ich wykorzystania w leczeniu znajdują się w fazie badań klinicznych [212].

Metody badania angiogenezy (AG)

Istnieją różne metody oceny zjawiska angiogenezy. Dynamikę tego procesu można oceniać na modelach tkankowych i podłożach fizjologicznych (testy rogówkowe, skórne, błona kosmówkowo-omoczniowa zarodka kurzego, żele fizjologiczne). W tym celu wszczepiane są komórki nowotworowe, które pobudzają AG. Nowo wytworzone naczynia muszą spełniać określone kryteria, aby można je uznać za utworzone w procesie AG nowotworowej [186]. Te kryteria obejmują kształt, wielkość, średnicę naczyń i kierunek proliferacji do punktu wstrzyknięcia komórek. Taka metoda jest trudna do powszechnego stosowania i jest używana jedynie dla celów naukowych.

Najpowszechniej stosowaną metodą oceny AG w guzach nowotworowych jest pomiar gęstości naczyniowej (MVD) w tkankach guzów. W tym celu naczynia w preparatach tkankowych są znakowane metodą immunohistochemiczną z użyciem przeciwciał monoklonalnych reagujących ze składnikami komórek śródbłonka. Najczęściej używane są przeciwciała przeciw czynnikowi VIII, antygenowi CD31 i antygenowi CD34 [154]. Ze względu na znaczne różnice występujące w gęstości unaczynienia w różnych regionach tkanki guza, gęstość naczyń oblicza się w kilku tzw. „polach gorących" preparatu immunohistochemicznego,

czyli w polach o największym unaczynieniu [263]. Jako ostateczny wynik przyjmuje się średnią obliczoną z tych pól. Słabą stroną metody oceny gęstości naczyń pozostaje brak ostatecznej standaryzacji i subiektywny wybór pól przez badającego [267].

Alternatywną metodą oceniającą zjawisko AG w nowotworze jest oznaczanie aktywności poszczególnych cytokin o działaniu angiogennym w tkance nowotworowej metodą immunohistochemiczną, bądź oznaczanie ekspresji mRNA tych cytokin metodą PCR [193,199].

Dzięki stwierdzeniu zjawiska przenikania niektórych czynników proangiogennych do płynów ustrojowych podejmowane są próby oceny aktywności tych czynników w surowicy krwi pacjentów z chorobą nowotworową. W różnych typach zaawansowanych nowotworów u ludzi dorosłych (np. w raku nerki, raku sutka) stwierdzono podwyższone poziomy w surowicy, zarówno VEGF, jak i cząsteczek bFGF [38,186,213]. W nowotworach przewodu pokarmowego udowodniono też wysoką ekspresję innych czynników proangiogennych np. HGF, TGF, IL-8 w surowicy krwi pacjentów [99,268]. Prowadzone badania stężenia tych cytokin zarówno w surowicy, jak i w moczu w różnych nowotworach mają wyjaśnić przydatność tych oznaczeń jako markerów prognozy i ewentualnych markerów wznowy nowotworu [260].

Badania Tabone i wsp. grupy dzieci z rozpoznaniem nowotworów złośliwych o różnorodnej histologii, wykazały podwyższone stężenie cytokin VEGF i bFGF w surowicy krwi w stosunku do stężenia tych cytokin w surowicy krwi w grupie dzieci zdrowych. Stężenia obu cytokin były znamiennie wyższe u chorych w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych dzieci i korelowały z długością przeżycia bez objawów choroby [247]. Wyniki te zachęcają do dalszych badań nad przydatnością takich oznaczeń w różnych typach nowotworów wieku dziecięcego.

Ostatecznie dotąd nie udało się opracować takiej jednej metody oceny angiogenezy, która w sposób obiektywny oceniałaby ten dynamiczny proces. Dlatego Vermeulen i wsp. proponują dla oceny AG użycie kilku metod jednocześnie [267].

Mechanizmy regulujące proces angiogenezy w guzach grupy zwojaka zarodkowego

Zarówno ognisko pierwotne jak i przerzuty zwojaka zarodkowego charakteryzują się bogatym unaczynieniem, a badania histologiczne potwierdziły udział proliferacji naczyniowej w rozwoju tego nowotworu. Pierwszym, który w 1996 przeprowadził ocenę aktywności angiogenezy w Nb był Meitar i wsp. [164]. Ważną obserwacją w tej pracy było stwierdzenie w całej masie guza Nb niejednolitego unaczynienia, co nakazywało wstępnie w badaniach wyodrębnić pola

z żywą tkanką i wyeliminować strefy martwicy i zwapnień w guzach o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego. Duże wahania w intensywności unaczynienia zaobserwowano w guzach różnicujących się i guzach typu ganglioneuroblastoma. Niemniej wyliczenie i ocena gęstości naczyniowej w „gorących polach" pozwala na porównywanie zdolności do AG w różnych typach tych guzów. Meitar wykazał korelację gęstości unaczynienia w guzach Nb z aktywnością przerzutową i krótszym przeżyciem chorych [164]. Godne uwagi były obserwacje poczynione w guzach Nb w stadium IVs rozwijających się u niemowląt. Guzy te cechowała wysoka aktywność AG, a mimo to efekty leczenia tej grupy chorych z rozsiewem Nb były bardzo dobre. Badania nad biologią tego typu guzów u niemowląt pozwoliły na odkrycie unikatowych właściwości biologicznych jak duża ekspresja NGF i receptora TRK-A, które mogą zmieniać w trakcie rozrostu fenotyp angiogenny Nb [176]. Badania przeprowadzone przez Meitara wykazały także korelację intensywności unaczynienia guzów z ustalonymi już czynnikami prognostycznymi jak obecność amp *NMYC* oraz budowa histologiczna guza wg kryteriów Shimada [164].

Wyniki dalszych prac dotyczących roli AG w zwojaku zarodkowym współczulnym nie były jednoznaczne. Ribatti i wsp. stwierdzili znaczną aktywność angiogenezy w guzach wysokiego ryzyka, sugerując, że parametry unaczynienia tkanki nowotworowej mogą służyć jako markery prognostyczne w Nb [207]. Wartość prognostyczna wysokiego unaczynienia w tkankach Nb została jednak zakwestionowana następnie w pracach Canete i wsp. [40]. Rozbieżności w tych opiniach mogły być wynikiem trudności standaryzacji metod oceny unaczynienia, a także zależały od odmiennego doboru chorych o różnej charakterystyce klinicznej. Współcześnie opublikowane wyniki badań aktywności angiogenezy metodami pośrednimi oceniające aktywność integryn $\alpha v\beta 3$ i $\alpha v\beta 5$ potwierdziły znaczną aktywność tych cząsteczek w guzach Nb z grupy wysokiego ryzyka [68].

W niezależnych badaniach wykazano **aktywność głównego czynnika proangiogennego VEGF i jego receptorów zarówno w guzach pierwotnych jak i w liniach komórkowych Nb** [139,189,209]. Metodami immunohistochemicznymi, a także przy użyciu techniki PCR, stwierdzono także ekspresję innych, **poza VEGF różnych czynników stymulujących tworzenie naczyń w tkankach tego nowotworu jak bFGF, Ang-1 i Ang-2, TGFα i PDGF-A** [66]. **W innych pracach szczególną uwagę zwrócono na wysoką aktywność VEGF i bFGF, które działają synergistycznie** [10,189,209]. Fenotyp angiogenny w stadiach zaawansowanych tego nowotworu potwierdza też podwyższona ekspresja metaloproteinaz 2 i 9 [108].

Wobec wielu dowodów znacznego udziału angiogenezy w rozwoju i progresji Nb warto zwrócić uwagę na związek fenotypu angiogennego komórek Nb ze znanymi i charakterystycznymi dla tego guza zmianami genetycznymi.

Dotychczas ustalono, że nadmierna ekspresja onkogenu *NMYC* hamuje aktywność czynników hamujących AG. Zidentyfikowane zostały dwa inhibitory AG tj. activina A oraz IL-6, które są blokowane przez ten onkogen [102]. Badania Ribatti i wsp. wykazały korelację wysokiej aktywności angiogennej w guzach z nadekspresją *NMYC* [204].

Nie przeprowadzono dotąd kompleksowych badań dotyczących współzależności angiogenezy z klinicznymi, morfologicznymi i genetycznymi markerami prognostycznymi u chorych z rozpoznaniem nerwiaka zarodkowego współczulnego. Analiza tych współzależności może być kolejnym krokiem w dążeniu do określenia „czynników ryzyka" u poszczególnych chorych i optymalizacji postępowania terapeutycznego.

2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie zależności pomiędzy stopniem aktywności angiogenezy i proliferacji guzów, a uznanymi parametrami prognozy u chorych z rozpoznaniem nowotworu z grupy zwojaka zarodkowego współczulnego.

W tym celu zaplanowano następujące zadania badawcze:

1. Analizę wybranych wskaźników aktywności angiogenezy i proliferacji w guzach Nb i określenie ich związku z klinicznymi, genetycznymi i morfologicznymi czynnikami prognostycznymi.
2. Określenie znaczenia wybranych wskaźników angiogenezy oraz indeksu proliferacyjnego jako czynników ryzyka.
3. Ocenę związku pomiędzy aktywnością proliferacyjną, a gęstością unaczynienia w tkankach guzów.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. MATERIAŁ KLINICZNY I METODY BADAWCZE

3.1.1. Pacjenci i dane kliniczne

Badaniami objęto 110 chorych z rozpoznaniem guza współczulnego grupy zwojaka zarodkowego współczulnego (Nb). Wśród 110 pacjentów, 43 było diagnozowanych i leczonych w Klinice Pediatrii Hematologii, Onkologii i Endokrynologii AM w Gdańsku w okresie od 1 listopada 1993 roku do 1 czerwca 2004 roku, a pozostałych 67 pacjentów było leczonych w ośmiu ośrodkach onkologii dziecięcej w Polsce wchodzących w skład Grupy d/s Leczenia Guzów Litych (Klinika Onkologii CZD w Warszawie, Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii w Bydgoszczy, Klinika Chorób Dzieci w Łodzi, Klinika Transplantacji Szpiku, Hematologii i Onkologii Dziecięcej we Wrocławiu, II Klinika Chirurgii Dziecięcej w Katowicach, Oddział Hematologii i Onkologii Dziecięcej w Chorzowie, Klinika Hematologii i Onkologii Dziecięcej w Poznaniu i Klinika Hematologii Dziecięcej i Chemioterapii w Zabrzu). Leczenie tych 67 chorych prowadzone było w okresie od 1 stycznia 2001 do 1 czerwca 2004 roku. Uzyskano zgodę wszystkich kierowników klinik na wykorzystanie danych klinicznych chorych oraz materiału biologicznego – pobranych wycinków tkanki nowotworowej i 2 ml krwi do przeprowadzenia planowanych badań oraz zgodę Niezależnej Komisji Biotycznej do Spraw Badań Naukowych przy AMG (nr zgody: NKEBN/845/2000).

Diagnoza Nb oparta została na przyjętych międzynarodowych kryteriach diagnostycznych tego nowotworu [32]:

- na podstawie badania histologicznego tkanki nowotworowej u 69 chorych;
- na podstawie wykazania obecności komórek Nb w szpiku kostnym i podwyższonego poziomu katecholamin w moczu u 37 chorych;
- w czterech przypadkach rozpoznanie postawiono w oparciu o wyniki badań obrazowych (stwierdzono naciek nowotworowy o charakterystycznej lokalizacji – przykręgosłupowej) oraz podwyższonego u chorego poziomu katecholamin.

Dane kliniczne uzyskiwano bezpośrednio z historii chorób pacjentów Kliniki Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii w Gdańsku. Informacje z pozostałych ośrodków uzyskiwano na podstawie opracowanej przez autorkę ankiety zbiorczej (wzór w załącznikach), którą wypełniali lekarze leczący chorych z poszczególnych ośmiu ośrodków klinicznych.

Zebrane dane kliniczne obejmowały wiek chorego w chwili ustalenia rozpoznania Nb, jego płeć, stadium zaawansowania wg kryteriów INSS [45], lokalizację ogniska pierwotnego, wielkość guza z określeniem jego największego wymiaru, obecność przerzutów, zastosowane metody leczenia, odpowiedź na leczenie zgodnie z definicjami wg *International Neuroblastoma Response Classification* - INRC (tab. 7) [32] i czas przeżycia chorych od momentu rozpoznania Nb (OS).

Obserwacje pacjentów zakończono 1.06.04. Okres obserwacji chorych wahał się od 2 miesięcy do 10 lat i 9 miesięcy (średni 30 mies.; mediana 23 mies.).

Pacjenci leczeni byli w zależności od zaawansowania klinicznego nowotworu i grup ryzyka zgodnie z protokołami leczenia Nb przyjętymi przez Polską Grupę ds. Leczenia Guzów Litych (tab. 8).

Tab. 7. Definicje odpowiedzi zwojaka zarodkowego współczulnego (Nb) na stosowane leczenie wg INRC [32].
Tab. 7. The definitions of treatment response in neuroblastoma according to INRC [32].

Typ odpowiedzi (symbol) *Type of response*	Guz pierwotny *Primary tumor*	Ogniska przerzutowe *Metastases*
Odpowiedź całkowita *Complete remission* (CR)	nie stwierdza się obecności guza *no signs of tumor*	ustąpienie zmian, prawidłowe poziomy katecholamin *metastases involution, normal cathecholamines levels*
Odpowiedź częściowa *Partial remission* (PR)	zmniejszenie się rozmiarów guza i ognisk przerzutowych o >50% *decrease of tumor size and metastases size > 50%*	
Brak odpowiedzi *No response* (NR)	brak nowych ognisk, zmniejszenie się rozmiarów jakiegokolwiek ogniska o <50% lub zwiększenie o >25% *any new Nb lesions noticed, decrease of any tumor site < 50% or enlargement >25%*	
Choroba postępująca *Progression* (PR)	jakiekolwiek nowe ognisko, zwiększenie rozmiarów jakiegokolwiek istniejącego ogniska o > 25%, zajęcie pierwotnie niezajętego szpiku *new lesions present, enlargement of any site >25%, new bone marrow involvement*	
Zgon z progresji *Death of disease* (DOD)	----------	

Tab. 8. Schematy leczenia stosowane w analizowanej grupie 110 pacjentów z Nb.
Tab. 8. Treatment protocols applied to the analysed 110 patients with Nb.

Grupa ryzyka *Risk group*	Schemat/protokół *Scheme/protocol*	Stosowane cytostatyki *Cytostatics used*	Inne składowe leczenia *Other elements of treatment*
Lata 1993-2001/ *Years 1993-2001*			
Pacjenci w I° *Patients in stage I°*	---	---	radykalne usunięcie guza *complete tumor resection*
Pacjenci niskiego ryzyka (II°, IVs°, III° u niemowląt) *Low risk patients (II°, IVs°, III° in infants)*	Schemat Harrisona *Harrison's scheme*	VCR, CYC	usunięcie ogniska pierwotnego *primary tumor resection*
	CAV	VCR, ADR, CYC	usunięcie ogniska pierwotnego *primary tumor resection*
Pacjenci z chorobą zaawansowaną (III° > 1 roku życia oraz IV°) *Patients with advanced disease (III° >1 year old and IV°)*	Protokół Tokio	VCR, CYC, ADR, CDDP, DTIC	1/ usunięcie ogniska pierwotnego *primary tumor resection* 2/ radioterapia/ *radiotherapy* (nie obligatoryjnie/ *not obligatory*)
	Protokół warszawski (modyfikacja Kyushu) *Warsaw protocol (Kyushu modification)*	VM-26, ADR, CYC, CDDP, IF, DTIC, VP-16	1/ usunięcie ogniska pierwotnego *primary tumor resection* 2/radioterapia/ *radiotherapy* (nie obligatoryjnie)/ *not obligatory*)
	Inne zastosowane *Other used*	VP-16, CBDCA	1/ usunięcie ogniska pierwotnego *primary tumor resection* 2/ terapia mieloablacyjna *myeloablative therapy*
Lata 2002-2004/ *Years 2002-2004*			
Pacjenci >1 r. życia z guzami nieresekcyjnymi, bez amp *NMYC* *Patiennts > 1 year old, without amp MYCN*	SIOP 99.1 dla guzów nieresekcyjnych *SIOP 99.1 for unresectable tumors*	CADO + CBDCA/VP-16	1/ usunięcie ogniska pierwotnego *primary tumor resection* 2/ radioterapia/*radiotherapy*
Niemowlęta z Nb, bez amp *NMYC* *Infants with Nb tomor without amp MYCN*	SIOP *European Infant Nb*	CADO	1/ usunięcie ogniska pierwotnego *primary tumor resection*
Pacjenci wysokiego ryzyka *High risk patients*	*ESIOP./HR-NBL 1*	CBDCA, VP-16, VCR, CDDP, CYC,	1/ usunięcie ogniska pierwotnego *primary tumor resection* 2/ terapia mieloablacyjna BUMEL vs CEM *myeloablative therapy BUMEL vs. CEM* 3/ radioterapia *radiotherapy* 4/ leczenie choroby resztkowej (13-cis RA) *minimal residual disease therapy (13-cisRA)*

CDDP = cisplatyna, CBDCA = karboplatyna, VP-16 = etopozyd, CYC = cyklofosfamid, ADR = doksorubicyna, IF= ifosfamid, DTIC = dakarbazyna, VCR = vinkrystyna, BUMEL = busulfan + melfalan, CEM = karboplatyna + etopozyd + melfalan, 13-cisRA = kwas 13cis-retinoinowy, CADO = doxorubicyna + vincrystyna + cyklofosfamid

W przypadku niepowodzeń leczenia (progresji lub wznowy) zmieniano protokoły leczenia na terapię „drugiej linii" z wykorzystaniem różnorodnych schematów chemioterapii konwencjonalnej przedstawionych w tabeli 9.

Tab. 9. Stosowane schematy leczenia „drugiej linii" w przypadkach progresji lub nawrotów.
Tab. 9. „Second line" therapeutical schemes applied in cases of progression or relapse.

L.p. *No.*	Schematy „II linii" *„II line" schemes*
1	CDDP + VP-16
2	CBDCA + VP-16
3	Topotecan + CYC
4	ICE

CDDP=cisplatyna, CBDCA=karboplatyna, VP-16=etopozyd
CYC=cyklofosfamid, ICE=schemat: ifosfamid+cisplatyna+etopozyd
CDDP=cisplatin, CBDCA=carboplatin, VP-16=etopozide,
CYC=cyclofosphamide, ICE=scheme: ifosphamide+cisplatin+etopozide

3.1.2. Badania biochemiczne

Analizę danych klinicznych uzupełniono oceną wyników badań laboratoryjnych w momencie diagnozy: stężenia dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH) oraz ferrytyny (F) w surowicy krwi i ilości wydalanego kwasu wanilinomigdałowego (VMA) w dobowej zbiórce moczu. Badania były wykonywane rutynowo w odpowiednich laboratoriach ośrodków onkologii dziecięcej, w których byli leczeni analizowani chorzy.

3.2. BADANIA HISTOLOGICZNE

Diagnostykę histologiczną z określeniem podtypu histologicznego przeprowadzono u 104 pacjentów w materiale pochodzącym z ognisk pierwotnych nowotworu. Materiał tkankowy był pobierany w czasie zabiegu operacyjnego: resekcji nowotworu lub biopsji otwartej.

Tkanki nowotworowe pobrano przed zastosowaniem leczenia u 57 pacjentów, natomiast u 47 chorych materiał z tkanek nowotworowych uzyskano po zastosowaniu wstępnej chemioterapii. Materiał do badań histologicznych był przygotowywany do analizy morfologicznej bezpośrednio po pobraniu w przypadkach pacjentów z ośrodka gdańskiego lub w postaci bloczków parafinowych był przesyłany z pozostałych ośmiu wyżej wymienionych ośrodków onkologii dziecięcej w Polsce. Zebrany materiał był oceniany histologicznie i klasyfikowany w Zakładzie i Katedrze Patomorfologii AMG (kierownik: dr hab. Kazimierz Jaśkiewicz, prof. nadzw. AMG). Skrawki parafinowe o grubości 3-4 μm posłużyły

do przygotowania rutynowych preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną (H-E) oraz barwień immunohistochemicznych.

Guzy neuroblastoma klasyfikowano zgodnie z podziałem histologicznym wg INPC przyjętym od 1999 roku [231]. Materiał diagnozowany przed 1999 rokiem był poddany powtórnej ocenie z zastosowaniem tej klasyfikacji.

Tab. 10. Klasyfikacja dojrzałości histologicznej guzów pochodzących z neuroblastów (wg INPC, 1999 rok).

Tab. 10. Pathologic classification of (criteria for) the maturity of the neuroblastic tumors (according to INPC, 1999).

Zwojak zarodkowy współczulny *Neuroblastoma*	**Niezróżnicowany** *Undifferentiated* **Słabo zróżnicowany** *Poorly differentiated* **Różnicujący się** *Differentiating*
Nerwiak zwojowokomórkowy *Ganglioneuroblastoma*	**Typ mieszanokomórkowy** *Intermixed type* **Typ guzkowy** *Nodular type*
Zwojakonerwiak *Ganglioneuroma*	**Dojrzewający** *Maturing* **Dojrzały** *Mature*

Guzy oceniane przed zastosowaniem chemioterapii zostały podzielone na dwie kategorie: o budowie „korzystnej" (FH) i „niekorzystnej" (UH) wg zmodyfikowanego podziału prognostyczno-morfologicznego Nb przyjętego przez INPC (tab. 5).

W tym podziale oceniane były następujące kryteria morfologiczne tkanki guza:

- stopień zróżnicowania komórek nowotworowych w oparciu o obecność neuropilu i cech:
- dojrzewania zwojowego
- wielkości podścieliska z komórkami Schwanna
- obecności zwapnień.

Modyfikacja polegała na zastosowaniu oceny indeksu proliferacyjnego zamiast oceny indeksu mitotycznego w klasycznym podziale [232] wg następującego przyporządkowania:

- niska aktywność proliferacyjna: IP <20% **zamiast MKI< 100/5000**
- średnia aktywność proliferacyjna: IP=20-40% **zamiast MKI=100 -200/5000**
- wysoka aktywność proliferacyjna: IP > 40% **zamiast MKI> 200/5000**

3.3. BADANIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE

Do badań immunohistochemicznych wykorzystano materiał tkankowy utrwalony w 4% roztworze formaldehydu i zatopiony w niskotopliwej parafinie. Do tych badań wybierano reprezentatywne (pod względem obrazu histologicznego i z małą ilością martwicy) wycinki z tkanek Nb. Selekcji dokonywano w barwieniu H-E. W badaniach użyto przeciwciał mysich monoklonalnych przeciwko Ki-67 (*Monoclonal Morse Anti-Human Ki-67 Antigen-Clone MIB-1*; DAKO), przeciwciał CD34 (*Monoclonal Morse Anti-Human CD 34 Class I, Clone BL-3C5*; DAKO) i przeciwciał króliczych przeciwko VEGF oraz Flk-1 (firmy *Santa Cruz Biotechnology*). Skrawki grubości 3 μ umieszczano na szkiełkach podstawowych pokrytych 3% roztworem silanu (APEL-Sigma A3648) i przygotowywano preparaty immunohistochemiczne zgodnie z procedurami zalecanymi przez producentów odpowiednich przeciwciał.

Przygotowanie preparatów immunohistochemicznych z przeciwciałami Ki-67 i CD34

Preparaty poddawano wstępnej obróbce termicznej w temp 99,6 - 99,9°C, następnie studzono je i płukano w roztworze PBS oraz zanurzano w 3% wodzie utlenionej. Kolejno nakładano odpowiednie przeciwciała Ki-67 lub CD34 i preparaty z przeciwciałami inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie preparaty były dwukrotnie płukane roztworem PBS. Nakładano następnie przeciwciała wiążące, inkubowano i płukano preparaty ponownie. Kolejnym etapem było zanurzenie preparatów w roztworze substratu (10 mg% roztwór diaminobenzydyny), inkubacja, płukanie i ostatecznie barwienie w hematoksylinie Harrisa. Proces przygotowania preparatów kończyło odwodnienie, prześwietlenie i przykrycie balsamem kanadyjskim.

Przygotowanie preparatów immunohistochemicznych z przeciwciałami p/w VEGF oraz Flk-1

Preparaty poddawano wstępnej obróbce termicznej w cieplarce o temp 60°C, następnie odparafinowano je w ksylenie i szeregu alkoholi. Odsłonięcie epitopu antygenowego następowało poprzez gotowanie preparatów w 20% buforze cytrynianowym przez 20 minut. Kolejno zanurzano preparaty w 3% wodzie utlenionej. Na preparat nakładano pierwotne przeciwciała VEGF w rozcieńczeniu 1:200 lub Flk-1 w rozcieńczeniu 1:50 i inkubowano je przez dwie godziny. Kolejne etapy obejmowały inkubację z pośrednim przeciwciałem biotynylowanym, inkubację ze streptawidyną znakowaną peroksydazą i reakcje z chromogenem DAB pod kontrolą mikroskopu. Na zakończenie preparaty były płukane pod

bieżącą wodą, barwione hematoksyliną, odwadniane we wzrastającym szeregu alkoholi oraz zamykane w balsamie kanadyjskim.

W zgromadzonym materiale tkanek Nb oceniano **aktywność proliferacyjną** oraz **wskaźniki angiogenezy** przy użyciu wyżej wymienionych odpowiednich przeciwciał monoklonalnych.

3.3.1. Metoda badania i kryteria oceny aktywności proliferacyjne guzów Nb

Preparaty immunohistochemiczne znakowane przeciwciałami monoklonalnymi p/w Ki-67 poddawano analizie mikroskopowej pod powiększeniem 400x. Odczyny immunohistochemiczne wykonano w 90 przypadkach guzów pierwotnych Nb i do dalszych analiz zakwalifikowano 78/90. Aktywność proliferacyjną wyrażano w postaci tzw. indeksu proliferacyjnego (IP), który obliczano jako % komórek wybarwionych na przynajmniej 1000 analizowanych komórek guza w polach o największej intensywności reakcji w powiększeniu 400x przy użyciu mikroskopu Olympus BX50 z zastosowaniem komputerowego systemu zliczania komórek immunopozytywnych „Multiscan".

3.3.2. Metody badania i kryteria oceny wskaźników angiogenezy w guzach Nb

Gęstość naczyń

Dla uwidocznienia naczyń krwionośnych w tkance nowotworowej wykorzystano przeciwciała anty CD34 znakujące komórki śródbłonka. Odczyny immunohistochemiczne wykonano w 90 guzach pierwotnych, a 82/90 zakwalifikowano do dalszej analizy. Gęstość naczyń (MVD) określano liczbą naczyń krwionośnych w obszarach o największym ich zagęszczeniu („gorących polach") w obrębie ocenianego preparatu. Manualnie zaznaczono naczynia na cyfrowym obrazie preparatu. Do oznaczenia MVD posłużono się zmodyfikowaną metodą Weidnera stosowaną w badaniach angiogenezy, noszącą znamiona wysokiej powtarzalności i reprezentatywności. W powiększeniu 40x identyfikowano w preparatach „pola gorące" o najwyższej liczbie profili naczyniowych wyznakowanych chromogenem. W powiększeniu 200x dokonywano pomiarów liczby naczyń w 10 polach o najwyższym unaczynieniu za pomocą komputerowego analizatora obrazu (mikroskop Olimpus BX 50, kamera CCD-FS-2012p Bischke) z zastosowaniem programu komputerowego „Multiscan" firmy CCS.

Kryteria oceny aktywności czynnika VEGF i receptora Flk-1 w tkankach guzów Nb

W preparatach immunohistochemicznych znakowanych przeciwciałami p/w VEGF lub przeciwciałami p/w Flk-1 przeprowadzono analizę ekspresji reakcji barwnej. Dla zobiektywizowania mikroskopowej oceny jakościowej wprowadzono klasyfikację typu reakcji immunohistochemicznej, biorąc pod uwagę intensywność wybarwienia komórek oraz % komórek wybarwionych z zastosowaniem skali trójstopniowej:

- „+" słaba intensywność reakcji w > 30% komórek lub średnia intensywność reakcji w < 30% komórek;
- „++" średnia intensywność reakcji w >30% komórek lub silna intensywność reakcji w <30% komórek;
- „+++" silna reakcja w > 30% komórek.

3.4. METODA BADANIA AKTYWNOŚCI CYTOKIN VEGF i bFGF W SUROWICY KRWI (test ELISA)

Badania poziomu cytokin VEGF i bFGF w surowicy krwi metodą ELISA przeprowadzane były w Zakładzie Immunologii Katedry Histologii i Immunologii AMG – (kierownik: prof. dr hab. Jolanta Myśliwska).

Materiał do badań ELISA

Krew w ilości 2 ml była pobierana jednorazowo przy okazji wstępnych badań diagnostycznych wykonywanych u pacjentów z rozpoznaniem Nb i w grupie kontrolnej u dzieci zdrowych przy okazji kontrolnych badań laboratoryjnych.

Aktywność cytokin VEGF i bFGF metodą ELISA z zastosowaniem gotowych zestawów firmowych zawierających znakowane przeciwciała monoklonalne dla tych cytokin oznaczono w 39 próbkach surowic pobranych od pacjentów z rozpoznaniem Nb przed rozpoczęciem leczenia. Krew (2 ml) pobierano do sterylnej probówki na skrzep od pacjentów w momencie diagnozy przed rozpoczęciem leczenia. Dla porównania aktywność cytokin oznaczono również w 30 próbkach surowicy pobranej w grupie kontrolnej. Grupę kontrolną stanowiły dzieci zdrowe w wieku 4 miesięcy do 9 lat (średni wiek 4 lata 10 miesięcy; mediana 4 lata), które zgłosiły się do Poradni Chemioterapii Kliniki Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii AMG celem wykonania badań kontrolnych po leczeniu limfadenopatii na tle nieswoistych procesów zapalnych lub celem konsultacji zmian stwierdzanych na skórze (znamię barwnikowe). W wywiadzie u tych dzieci nie stwierdzano infekcji w okresie 4-8 tygodni poprzedzających badania i w badaniu fizykalnym nie stwierdzano odchyleń od normy poza

znamieniem barwnikowym na skórze. Wartości parametrów kontrolnych badań morfologii i OB u wszystkich dzieci z grupy kontrolnej były prawidłowe. Rodzice zostali poinformowani i wyrazili zgodę na pobranie dodatkowo 2 ml krwi w celu przeprowadzenia badań naukowych, przy okazji pobierania krwi dla kontroli morfologii krwi i OB.

Krew zarówno pacjentów jak i dzieci grupy kontrolnej była odwirowywana w automatycznej wirówce (3000 obrotów/min; 5 min), a surowicę przechowywano do czasu badania w temp – 70°C.

Procedura badań aktywności cytokin w surowicy metodą ELISA

Oznaczeń poziomów VEGF oraz FGFb dokonano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu komercyjnych zestawów firmy R&D Systems (Minneapolis, USA) według wskazówek producenta. Każdy z zestawów zawierał 96-dołkową płytkę opłaszczoną przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko badanej cytokinie. Przed nałożeniem badanych próbek, do każdego z dołków dodawano po 100 µl roztworu rozcieńczającego (Assay Diluent RD1W). Następnie na płytkę nanoszono badane surowice, standardy dostarczone przez producenta oraz kontrole w objętości 100 µl na dołek. Każdą surowicę badano w dwóch powtórzeniach. Tak przygotowaną płytkę inkubowano przez 2 godziny na wytrząsarce (700 rpm) w temperaturze pokojowej. Następnie każdy dołek płukano trzykrotnie odpowiednim buforem (*Wash Solution*) i dodawano po 200 µl koniugatu przeciwciał skierowanych przeciwko badanej cytokinie, który sprzężony był z peroksydazą chrzanową. Po 2 godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, dołki ponownie przepłukiwano, a następnie do każdego z nich dodawano po 200 µl substratu dla peroksydazy chrzanowej (TMB - tetrametylobenzydyna). Po 30-minutowej inkubacji z wytrząsaniem i bez dostępu światła dodawano po 50 µl kwasu siarkowego (*Stop Solution*) i mierzono absorbancję produktu barwnego reakcji enzymatycznej przy długości fali 450 nm na czytniku (Bio-Tek FL600, Bio-Tek Instruments, Inc. Winoski, USA). Na podstawie absorbancji zmierzonej w dołkach standardowych tworzono krzywą standardową i według niej obliczano stężenia badanych cytokin w próbkach eksperymentalnych.

3.5. BADANIA GENETYCZNE

Materiał do badań genetycznych stanowiły części tkanki nowotworowej pobieranej do badania histologicznego w trakcie zabiegu operacyjnego lub rozmazy szpiku nacieczonego komórkami Nb. Badania przeprowadzono w 96 przypadkach guzów nowotworowych w laboratorium cytogenetycznym Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki AMG (kierownik: prof. dr hab. Janusz Limon).

Fragmenty tkankowe pobierane w Gdańsku były dostarczane w soli fizjologicznej w jałowych probówkach bezpośrednio do laboratorium. Materiał tkankowy z pozostałych ośrodków umieszczano w jałowym naczyniu z pożywką transportową z dodatkiem antybiotyku i dostarczano do laboratorium cytogenetycznego w ciągu 24 godzin od pobrania.

3.5.1. Analizy cytogenetyczne

Analizy cytogenetyczne (łącznie 128 analiz u 96 pacjentów) przeprowadzano metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) na materiale pochodzącym z:

- hodowli komórek,
- preparatów „odciskowych" z fragmentów tkanek,
- rozmazów szpiku nacieczonego przez komórki Nb (3-4 szkiełka).

- **Hodowle komórkowe -** prowadzone były metodą krótkoterminowych hodowli in vitro opracowaną przez Limona i wsp [142]. Fragmenty tkanki nowotworowej umieszczano w szalce Petriego i rozdrabniano mechanicznie. Pociętą tkankę guza przenoszono do naczynia hodowlanego, do którego dodawano pożywkę i kolagenazę o stężeniu 200 U/ml. Tkankę w pożywce inkubowano przez 12-24 godz. w temp 37°C w warunkach 5% stężenia CO_2 i 80% wilgotności. Po wypłukaniu kolagenazy z uzyskanego materiału zakładano pierwotne hodowle w naczyniach hodowlanych. Hodowle prowadzone były w inkubatorze w warunkach podanych powyżej. Zmiana pożywki hodowlanej dokonywana była 2x tygodniowo. Obserwacja hodowli komórek była prowadzona przy pomocy odwróconego mikroskopu. Zaobserwowanie wysokiej liczby mitoz było wskazówką do utrwalenia hodowli. Utrwalone komórki były rozlewane i barwione na szkiełkach podstawowych wg metody opisanej przez Yunis i wsp [279].

- **Preparaty „odciskowe" guza -** przygotowywano z otrzymanych fragmentów świeżo pobranej tkanki nowotworowej przesyłanej w pożywce z dodatkiem antybiotyku. Przysłany materiał przecinano na dwie części. Odciski tkanki nowotworowej na szkiełkach wykonywano ze świeżo przeciętej powierzchni materiału tkankowego. Szkiełka wysuszano i w ciągu 1 tygodnia wykonywano badanie metodą FISH. Do czasu wykonania badania szkiełka były przechowywane w temp 0°- 4°C. Następnie jedną z przeciętych części materiału przesyłano do badania histologicznego, a pozostałą zamrażano.

- **Rozmazy szpiku** wykonywane były przy okazji rutynowych badań diagnostycznych szpiku. Wysuszone preparaty (3-4 rozmazy) przesyłano do laboratorium cytogenetycznego i badanie wykonywano jedynie w przypadku obecności komórek nowotworowych w wykonanych rozmazach.

Metoda FISH

Analizę wybranych aberracji chromosomalnych: del(1p) i częściowej trisomii 17q oraz amplifikacji *NMYC* techniką FISH prowadzono z wykorzystaniem odpowiednich sond DNA:

- dla del(1p36.3) - sondy specyficznej TelVysion ™1pSG (firmy *ABBOTT*) i CEP 1 (Satellite II/III) Spectrum Orange;
- dla dodatkowych kopii 17q – sondy specyficznej LSI SMS, LSI LIS 1 Spectrum Orange oraz LSI RARA Spectrum Green (firmy *Vysis*);
- dla amp *NMYC* – sondy LSI N-myc Spectrum Orange (firmy *ABBOTT*).

Preparaty z hodowli komórkowej, jak też preparaty odciskowe i rozmazy szpiku były odwadniane w szeregu alkoholi, a następnie denaturowane w 73°C i suszone w temperaturze 45-50°C. Sondy malujące były denaturowane w temperaturze 72°C, a sondy specyficzne nie wymagały denaturacji. Hybrydyzację przeprowadzano przez noc w temp 37°C. Detekcję sondy w preparacie przeprowadzano poprzez nałożenie na preparat odpowiednich przeciwciał sprzężonych z fluorochromami. Tak przygotowane preparaty analizowane były pod mikroskopem AXIOSCOP (*Zeiss*) z zastosowaniem systemu CytoVysion firmy *Applied Imaging*.

3.5.2. Metody badania ploidii komórkowej

Ploidię komórkową określono w 22 przypadkach na podstawie kariotypów sporządzonych z hodowli komórek Nb w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki AMG. Pozostały materiał pochodził z 38 tkanek nowotworowych pobranych w czasie zabiegu operacyjnego i przechowywanych w temp –80°C. Ploidię DNA oznaczano metodą cytometrii przepływowej w Pracowni Cytometrii Przepływowej Kliniki Hematologii AMG (kierownik: prof. dr hab. Andrzej Hellmann) na cytometrze przepływowym FACS Calibur przy użyciu zestawu odczynników Cycle Test™ Plus firmy Becton Dickinson (San Jose, CA, USA).

Przygotowanie zawiesiny komórek Nb do badań cytometrycznych z zamrożonych fragmentów tkanek przeprowadzono w Zakładzie Endokrynologii Ginekologicznej AMG Instytutu Położnictwa i Chorób Kobiecych. Fragmenty guzów rozmrażano w temperaturze pokojowej, następnie poddawano homogenizacji. Zhomogenizowaną tkankę guza przenoszono do jałowej probówki Eppendorfa gdzie przeprowadzano dalszą część procedury. Zawiesinę komórek wirowano przez 5 minut w wirówce z szybkością 400 g/min w temperaturze pokojowej. Do osadu komórek dodawano 250 µl buforu trypsynowego i delikatnie mieszano do uzyskania jednolitej zawiesiny. Po 10 minutowej inkubacji dodawano inhibitor trypsyny oraz enzym RNA-azę. Ponownie próbki delikatnie mieszano i inkubowano przez 10 minut, po czym dodawano zimny (2-8°C) roztwór jodku propidyny. Ponownie próbki były inkubowane przez 10 min w odpowiednich

warunkach to jest w temp 4° C i bez dostępu światła. Następnie zawiesinę komórek filtrowano przez filtr nylonowy o średnicy 50μm. Przesącz zbierano do jałowych probówek o pojemności 1,8 ml. Tak przygotowaną zawiesinę komórek w probówkach na lodzie przekazywano do Pracowni Cytometrii Przepływowej Kliniki Hematologii AMG, gdzie były poddawane analizie cytometrycznej.

Spośród 38 wykonanych badań cytometrycznych zinterpretowano 26 wyników w pozostałych 12 przypadkach na histogramie FL2-A nie stwierdzono wyraźnie wyróżniającej się populacji komórek i nie było możliwe przeprowadzenie analizy ploidii DNA. Do zliczania komórek wykorzystywano firmowe oprogramowanie cytometru- CellQUEST. Na cytogramie parametrów FL2-Area/FL2-WIDTH wyznaczono bramkę, w której mieściły się badane komórki Nb. Za docelową liczbę zliczanych komórek bramki przyjęto 30000; w części próbek możliwe było zbadanie mniejszej ilości komórek, jednakże zawsze liczba ta przekraczała 3000. Każdorazowo przed podjęciem badań kontrolowano liniowość analizatora za pomocą standardowych kulek kalibracyjnych. Procedurę kontroli przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta, a uzyskiwane wartości współczynnika zmienności mieściły się w dopuszczalnych zakresach (CV <3% dla CEN i CV < 5% dla CNT). Wzorcem komórek diploidalnych były leukocyty krwi dzieci zdrowych zgłaszających się na badania kontrolne. Każdorazowo oznaczano leukocyty krwi pobrane od dwóch osób z grupy kontrolnej. Napięcie na detektorze fluorescencji dla komórek fazy G0-1 osób zdrowych wynosiło 200; z uzyskiwanych histogramów odczytywano wartości średniego kanału fluorescencji dla badanych komórek w zawiesinie. Dzieląc uzyskaną wartość przez wartość średniego kanału fluorescencji dla grupy kontrolnej uzyskiwano wartość indeksu DNA (DI). Przyjęto wartości DI = 0,85-1,15 jako odpowiadające okołodiploidii; DI < 0,85 - hipodiploidii; DI > 1,25 i ≤ 1,75 okołotriploidii; DI >1,75 okołotetraploidii

3.6. METODY STATYSTYCZNE

Ocenę rozkładu parametrów ilościowych przeprowadzono w oparciu o analizę histogramów oraz test Shapiro-Wilka. Za względu na fakt, że rozkład analizowanych parametrów różnił się statystycznie znamiennie od rozkładu normalnego do analizy jednoczynnikowej wykorzystano testy nieparametryczne: test Manna-Whitney'a, test ANOVA Kruskal-Wallisa oraz test korelacji rang Spearmana. Krzywe przeżycia przedstawiono na wykresach Kaplana-Meiera, a do ich porównania wykorzystano test *log-rank*.

Analizę regresji wieloczynnikowej w ocenie przeżycia przeprowadzono metodą proporcjonalnego hazardu Coxa. Do porównania parametrów jakościowych wykorzystano test Persona χ^2 wprowadzając poprawkę Yatesa, gdy liczebność oczekiwana podgrupy była mniejsza od 10. W wynikach analiz statystycznych

podano obliczony poziom istotności statystycznej (p) weryfikowanej hipotezy zerowej; wartości $p<0,05$ interpretowano jako znamienne statystycznie. Obliczenia wykonano z użyciem pakietu oprogramowania statystycznego Statistica 6.1 (*StatSoft* Inc., USA).

4. WYNIKI

4.1. BADANIA KLINICZNE

Analizie klinicznej poddano 110 pacjentów z rozpoznaniem guzów z grupy nerwiaka zarodkowego, leczonych w Gdańsku oraz w ośmiu ośrodkach onkologii dziecięcej w Polsce. Liczbę analizowanych pacjentów z poszczególnych ośrodków przedstawia tabela 11.

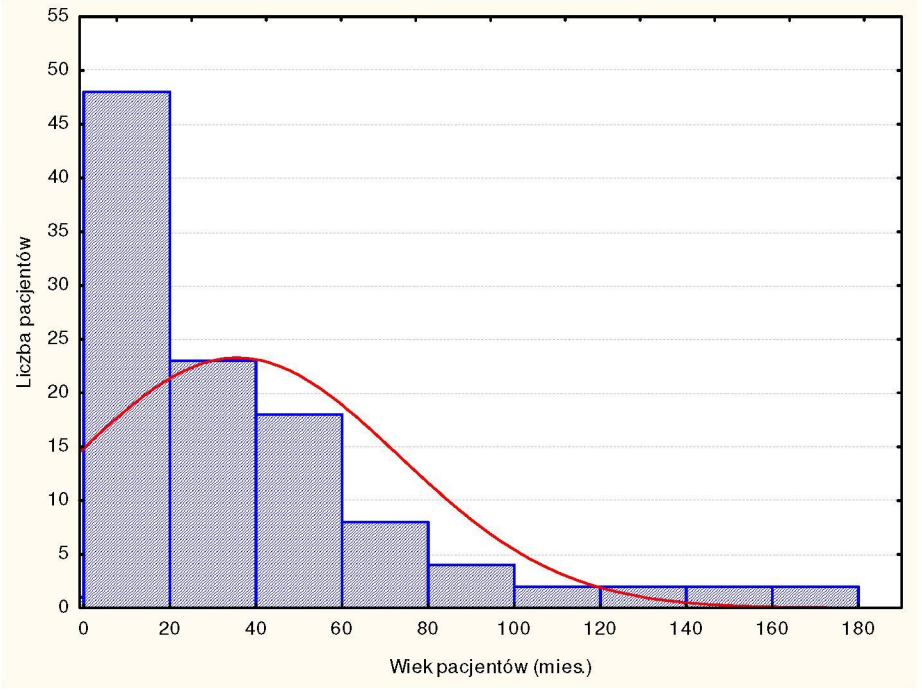
Tab. 11. Liczba analizowanych pacjentów z poszczególnych ośrodków.
Tab. 11. Number of patients from the particular centers.

L.P. *No*	Ośrodek *Center*	Liczba chorych *Number of patients*
1	Klinika Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii AM w Gdańsku	43
2	Klinika Onkologii CZD w Warszawie	17
3	Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej AM we Wrocławiu	16
4	Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii w Bydgoszczy	12
5	Oddział Onkologii w Klinice Chorób Dzieci AM w Łodzi	8
6	II Klinika Chirurgii Dziecięcej - Górnośląskie CZD MiDZ w Katowicach	5
7	Oddział Onkologii Dziecięcej w Chorzowskim Centrum Pediatrii i Rehabilitacji	4
8	Klinika Hematologii Dziecięcej ŚAM w Zabrzu	3
9	Klinika Onkologii i Hematologii i Transplantologii Dziecięcej AM w Poznaniu	2

Wiek pacjentów wahał się od 2 tygodni do 14 lat (średni 3 lata, mediana 2 lata 4 mies.), w tym liczba niemowląt wynosiła 38 (35%), dzieci w wieku 1-3 lat – 32 (29%), 3-5 lat – 20 (18%) i powyżej 5 lat – 20 (18%) (tab. 12). Rozkład wieku pacjentów przedstawiono na rycinie 1.

Tab. 12. Liczba chorych w zależności od wieku < 1 roku i ≥ 1 roku życia.
Tab.12. Number of patients according to the age : < 1 yr and ≥ 1 yr old.

Wiek *Age*	Liczba chorych *Number of patients*	%
< 1 roku *< 1 yr*	38	34,5
≥ 1 roku *≥ 1 yr*	72	65,5



Ryc. 1. Rozkład wieku badanych dzieci.
Fig. 1. Age distribution in analyzed group of children.

W badanej grupie przeważali chłopcy - 65 (59,1%) w stosunku do 45 (40,9%) dziewcząt. Częstość występowania poszczególnych stopni zaawansowania klinicznego wg Międzynarodowego Systemu Klasyfikacji Zwojaka Zarodkowego Współczulnego (INCS) przedstawiono w tabeli 13. **Pacjenci w IV stadium zaawansowania klinicznego stanowili blisko połowę wszystkich badanych - 52 chorych (47,3 %).** Pacjenci z rozpoznaniem choroby w niskim stadium zaawansowania klinicznego (I i II) lub stadium IVs stanowili 23,6% analizowanych (26 chorych).

Tab. 13. Liczebność pacjentów w poszczególnych stadiach klinicznych Nb.
Tab. 13. Number of patients in the particular clinical stages of Nb.

Stadium *Stage*	Liczba chorych *Number of patients*	*%*
I	6	5,5
II	12	10,9
III	32	29,0
IV	52	47,3
IVs	8	7,3

Lokalizację przerzutów w grupie 52 dzieci z chorobą w IV stadium zaawansowania klinicznego przedstawia tabela 14. **Najczęściej występowały przerzuty do kości (u 36/52 = 69% chorych) i do szpiku (u 30/52 = 58% chorych).** W przypadku trzech pacjentów stwierdzano przerzuty o rzadkiej lokalizacji, to jest do otrzewnej, jądra i śledziony. Ogniska pierwotne nowotworu w obu nadnerczach wykryto u jednego chorego.

Tab. 14. Częstość występowania i lokalizacja przerzutów u 52 chorych w IV stadium zaawansowania klinicznego Nb.
Tab.14. Frequency and localization of metastases in 52 patients with Nb in stage IV.

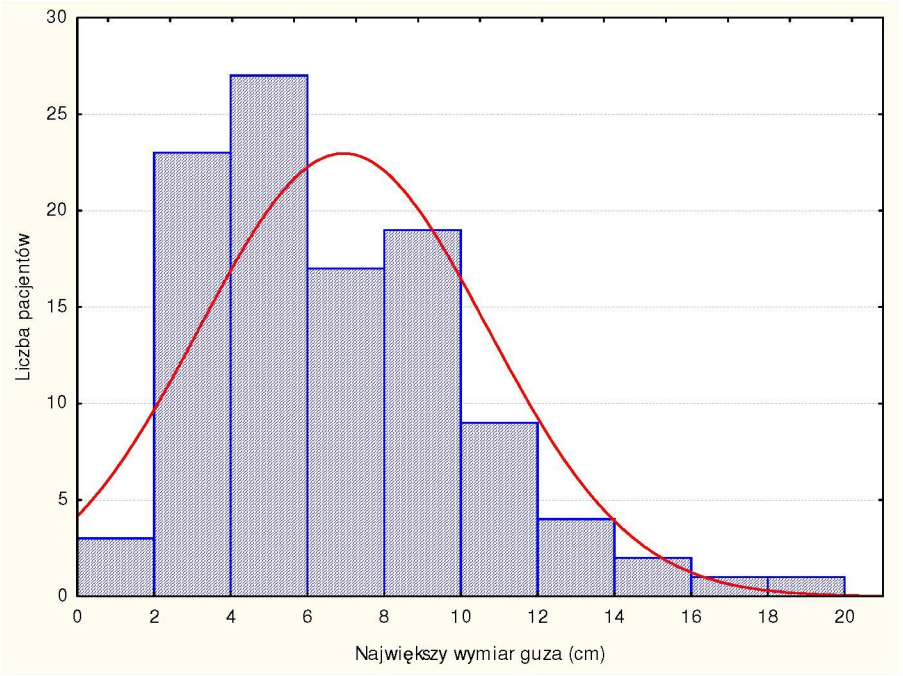
Lokalizacja przerzutu *Site of metastasis*	Liczba chorych *Number of patients*	%
Koś Kości / *Bonem*	36	69
Szpik kostny/ *Bone marrow*	30	58
Węzły chłonne/ *Lymph notes*	23	44
Wątroba/ *Liver*	12	23
Płuca/opłucna /*Lungs/pleura*	5	10
Inne/ *Other*	3	6

Lokalizacja ogniska pierwotnego nowotworu została ustalona u 108 chorych. Nie udało się ustalić ogniska pierwotnego u dwójki chorych. Rozpoznanie zostało u tych chorych ustalone na podstawie badania tkanki nowotworowej pobranej w jednym przypadku z ogniska przerzutowego do kości, a w drugim z ogniska przerzutowego do węzła chłonnego. Najczęściej nowotwór rozwijał się pierwotnie w nadnerczach - u 59 pacjentów (53,6%), lokalizacje w przestrzeni zaotrzewnowej stwierdzono u 38, w śródpiersiu u 11 chorych (tabela 15).

Tab. 15. Częstość występowania poszczególnych lokalizacji ogniska pierwotnego Nb.
Tab. 15. Frequency of the primary Nb site.

Ognisko pierwotne *Primary site*	Liczba chorych *Number of patients*	%
Nadnercza *Adrenal glands*	59	53,6
Przestrzeń zaotrzewnowa *Retroperitoneal region*	38	34,6
Śródpiersie *Mediastinum*	11	10,0
Lokalizacja nieznana *Unknown localization*	2	1,8

Wielkość ogniska pierwotnego określano przez pomiar największego wymiaru guza. Pomiary takie wykonano w badaniach obrazowych u 108 pacjentów, u których ustalona została pierwotna lokalizacja nowotworu. Zakresy wartości największych wymiarów guzów wahały się od 2 – 20 cm. Rozkład występowania różnych wielkości guza przedstawia ryc. 2. Najczęściej - u 48 chorych (43,6%) stwierdzono guzy o największym wymiarze 5 - 10 cm w momencie diagnozy. **Ponad 1/4 pacjentów w chwili rozpoznania demonstrowała duże guzy, o największym wymiarze przekraczającym 10 cm (tab. 16).**



Ryc. 2. Rozkład częstości występowania różnych wielkości guzów.
Fig. 2. Distribution of the tumor maximal size.

Tab. 16. Wielkość guzów Nb (maksymalny wymiar) w grupie 110 pacjentów.
Tab. 16. Maximal size of Nb tumors in the group of 110 patients.

Największy wymiar ogniska pierwotnego *Maximal size of tumor*	Liczba chorych *Number of patients*	%
< 5 cm	31	28,2
5-10 cm	48	43,6
> 10 cm	29	26,4
Brak danych/ *Unknown*	2	1,8

Badania biochemiczne

Wyniki wskaźników biochemicznych oznaczanych u chorych w momencie diagnozy przedstawiają kolejne tablice (tab. 17, 18, 19).

Stężenie **dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH)** w surowicy krwi przed podjęciem leczenia oznaczono u 108 dzieci. Wartość LDH wahała się w szerokim zakresie od 129 do 18280 U/l (średnio 1533,2± 2618,5 [SD]; mediana 623 U/l). Ze względu na różnice w wartościach referencyjnych dla LDH w różnych ośrodkach oraz różny zakres normy w zależności od wieku, pacjentów podzielono na 3 grupy: z prawidłową wyjściowo wartością tego parametru, wartością powyżej normy i poniżej dwukrotnej wartości normy oraz z wartością LDH równą lub przekraczającą dwukrotną wartość normy. Liczebność chorych w poszczególnych grupach przedstawia tabela 17. **Stężenie LDH w surowicy było podwyższone u 76 (69%) badanych. Wysokie wartości stężenia LDH, przekraczające dwukrotnie poziom normy stwierdzono u 42 (38%) chorych.**

Tab. 17. Częstość występowania poszczególnych zakresów stężenia LDH w surowicy krwi pacjentów w momencie rozpoznania.
Tab.17. Frequency of the different ranges of serum LDH levels at diagnosis.

Stężenie LDH *Serum LDH*	Liczba chorych *Number of patients*	%
N	32	29,1
> 1x N< 2xN	34	30,9
≥2x N	42	38,2
Brak danych/ Unknown	2	1,8

N = wartości prawidłowe dla wieku, przyjęte przez laboratorium, w którym oznaczenie przeprowadzano
N = normal level according to the age accepted by the laboratory, in which the analysis was performed

Stężenie ferrytyny w surowicy krwi przed rozpoczęciem leczenia oznaczono u 72 chorych. Zakres wartości stężeń ferrytyny wahał się od 3,7-1593,0 ng/ml (średnio 264,6+/- 276,1 [SD]; mediana 174,6) Częstość występowania poszczególnych zakresów tych wartości przedstawia tabela 18. **W przypadku 39 (65,5%) badanych stężenie ferrytyny przekraczało 142 ng/ml.**

Tab. 18. Częstość występowania poszczególnych zakresów stężeń ferrytyny w surowicy pacjentów w momencie rozpoznania choroby nowotworowej.
Tab. 18. Frequency of the different ranges of serum ferritin levels at diagnosis.

Stężenie ferrytyny *Serum ferritin*	Liczba chorych *Number of patients*	%
< 142 ng/ml	33	30,0
> 142 ng/ml	39	35,5
Brak danych/ *Unknown*	38	34,5

Wydalanie VMA w moczu dobowym oznaczono u 102 pacjentów w momencie rozpoznania. Ilość wydalanego VMA na dobę wahała się w granicach od 0,5 do 560,0 mg/dobę, średnio 35,9±96,7 mg/dobę, mediana 10,9 mg/dobę. W ocenie częstości występowania zwiększonego wydalania VMA ze względu na różne zakresy wartości prawidłowych w zależności od wieku, chorych podzielono na 3 grupy: z prawidłową wyjściowo ilością wydalanego VMA, z wartością powyżej normy i poniżej dwukrotnej wartości normy oraz z ilością równą lub przekraczającą dwukrotną wartość normy. Liczebność chorych w poszczególnych grupach przedstawia tabela 19. **Zwiększoną ilość wydalanego VMA stwierdzono u 71 (64,5%) pacjentów, a wydalanie kwasu VMA przekraczało dwukrotnie poziom normy u 51 (46,3%) chorych.**

Tab. 19. Częstość występowania poszczególnych zakresów ilości wydalanego VMA w moczu pacjentów w momencie rozpoznania choroby nowotworowej.
Tab. 19. Frequency of the particular ranges of urinary VMA excretion at diagnosis.

VMA w moczu *Urine VMA*	Liczba chorych *Number of patients*	%
N	31	28,2
> 1xN < 2xN	20	18,2
≥2x N	51	46,3
Brak danych/ *Unknown*	8	7,3

N = wartości prawidłowe dla wieku, przyjęte przez laboratorium, w którym oznaczenie przeprowadzano
N = normal level according to the age accepted by the laboratory, in which the analysis was performed

Przeprowadzona analiza zależności każdego z 3 biochemicznych wskaźników (stężenia LDH i ferrytyny w surowicy oraz ilości wydalanego VMA w moczu) od poszczególnych cech klinicznych wykazała, że podwyższone stężenie LDH w surowicy stwierdzano częściej (64/84=76%) w zaawansowanym stadium klinicznym choroby (III i IV stadium) niż w stadiach I, II (6/15=40%). Częściej podwyższone stężenie LDH występowało w przypadku lokalizacji nadnerczowej ogniska pierwotnego (45/59=76%) i w guzach większych, o średnicy > 5 cm (58/77=75%) (tab. 20).

Chorzy z większymi guzami > 5 cm średnicy częściej prezentowali zwiększone wydalanie kwasu VMA w moczu (62/81=75%). **Szczególnie często zwiększone wydalanie VMA występowało u chorych z obecnością przerzutów do kości (24/28=85%)** (tab. 21).

Wysokie stężenie ferrytyny w surowicy występowało częściej u pacjentów > 1 roku życia (28/46 = 62%) niż w wieku niemowlęcym (9/23=39%) oraz w IV stadium zaawansowania klinicznego choroby (24/32=75%) (tab. 22).

Tab. 20. Wartości stężenia LDH w surowicy krwi w zależności od parametrów klinicznych u 108 chorych.
Tab. 20. Values of serum LDH regarding to the clinical characteristics of 108 patients.

Cechy kliniczne *Clinical data*		LDH		
		N (32 chorych) (*32 patients*)	>1xN i < 2N (35 chorych) (*35 patients*)	≥2xN (41 chorych) (*41 patients*)
Wiek *Age*	< 1 rok < *1 yr*	14	9	15
	> 1 rok ≥ *1 yr*	18	26	26
Stadium zaawansowania *Stage*	I	5	0	1
	II	4	3	2
	III	7	16	8
	IV	13	12	27
	IVs	3	3	2
Lokalizacja ogniska pierwotnego *Primary site*	Nadnercza *Adrenal glands*	14	21	24
	Przestrzeń zaotrzewnowa *Retroperitoneal region*	12	5	19
	Śródpiersie *Mediastinum*	5	6	0
Maksymalna wielkość guza pierwotnego *Maximal size of primary site*	<5cm	13	11	7
	5-10 cm	10	17	21
	>10 cm	9	6	14
Lokalizacja przerzutów w IV stadium *Metastases localization in IV stage*	Kości/ *Bones*	3	6	25
	Inne/ *Others*	6	4	6

N = wartości stężenia LDH prawidłowe dla wieku, przyjęte przez laboratorium, w którym oznaczenie przeprowadzano
N = normal level according to the age, accepted by laboratory, in which the analysis was performed

Tab. 21. Ilość wydalanego VMA w moczu w zależności od parametrów klinicznych (u 102 chorych).

Tab. 21. Urinary VMA excretion regarding to the clinical characteristics (in 102 patients).

Cechy kliniczne *Clinical data*		Ilość VMA w moczu *Urinary VMA*		
		N (30 chorych) (*30 patients*)	>1xN i <2N (22 chorych) (*22 patients*)	≥2xN (50 chorych) (*50 patients*)
Wiek *Age*	<1 rok < 1 yr	14	9	14
	>1 rok ≥ *1 yr*	16	13	36
Stadium zaawansowania *Stage*	I	2	1	3
	II	8	2	0
	III	10	10	9
	IV	7	8	35
	Ivs	3	1	3
Lokalizacja ogniska pierwotnego *Primary site localization*	Nadnercza *Adrenal glands*	13	13	32
	Przestrzeń zaotrzewnowa *Retroperitoneal region*	9	3	18
	Śródpiersie *Mediantinum*	8	3	0
Maksymalna wielkość guza pierwotnego *Maximal primary tumor size*	<5cm	32	4	13
	5-10 cm	13	14	20
	>10 cm	5	4	17
Lokalizacja przerzutów w IV stadium *Metastases localization in IV stage*	Kości/ *Bones*	4	4	23
	Inne/ *Others*	3	2	10

N= ilość wydalanego VMA prawidłowa dla wieku, przyjęta przez laboratorium, w którym oznaczenie przeprowadzano

N = normal level according to the age, accepted by laboratory, in which the analysis was performed

Tab. 22. Stężenie ferrytyny w surowicy krwi w zależności od parametrów klinicznych (u 72 chorych).

Tab. 22. Serum ferritin concentration regarding to the clinical characteristics (in 72 patients.

Cechy kliniczne *Clinical data*		Stężenie ferrytyny *Serum ferritin*	
		≤142 ng/ml (*33 chorych*)	>142 ng/ml (*39 chorych*)
Wiek *Age*	<1 rok < *1yr*	20	11
	≥ 1 rok ≥ *1 yr*	13	28
Stadium zaawansowania *Stage*	I	5	0
	II	2	3
	III	14	5
	IV	9	28
	Ivs	3	3
Lokalizacja ogniska pierwotnego *Primary tumor localization*	Nadnercza *Adrenal glands*	15	23
	Przestrzeń zaotrzewnowa *Retroperitoneal region*	13	11
	Śródpiersie *Mediastinum*	4	4
	Nieznana *Unknown*	1	1
Maksymalna wielkość guza pierwotnego *Maximal primary tumor diameter*	<5cm	10	11
	5-10 cm	13	14
	>10 cm	4	13
	Nieznana/ *Unknown*	1	1
Lokalizacja przerzutów w IV stadium *Metastases localization in IV stage*	Kości/ *Bones*	5	18
	Inne/ *Others*	3	6

Grupy ryzyka

Pacjentów zakwalifikowano do 3 grup ryzyka. W podziale tym uwzględniono, poza cechami klinicznymi (wiekiem i stadium zaawansowania) obecność amplifikacji *NMYC* w guzie u 78 pacjentów, u których wyniki badań amplifikacji były znane. Pozostałych 31 chorych zakwalifikowano do grup ryzyka na podstawie dwu parametrów klinicznych. Jednego chorego nie zakwalifikowano do grup ryzyka ze względu na brak dostatecznych danych (tab. 23). Połowa chorych analizowanych należała do grupy wysokiego ryzyka.

Tab. 23. Częstość występowania poszczególnych grup ryzyka wśród pacjentów z Nb.
Tab. 23. Distribution of the particular prognostic groups of Nb patients.

Grupa ryzyka *Risk group*	Liczba chorych *Number of patients*	%
Niskiego / *Low*	31	28,2
Pośredniego/ *Intermediate*	23	20,9
Wysokiego / *High*	55	50,0
Brak danych/ *Unknown*	1	0,9

4.1.1. Podsumowanie

W analizowanej grupie pacjentów większość chorych z rozpoznaniem Nb prezentowała zaawansowaną postać choroby nowotworowej z parametrami klinicznymi niekorzystnymi prognostycznie. Podwyższony poziom biochemicznych markerów prognostycznych częściej stwierdzano u chorych powyżej 1 roku życia i w zaawansowanym stadium choroby.

4.1.2. Zastosowana terapia i osiągnięty efekt leczenia

Leczenie połowy pacjentów z chorobą w I stadium zaawansowania (4/8 chorych) lub z guzami dojrzałymi histologicznie (4 chorych) ograniczono wyłącznie do radykalnego zabiegu operacyjnego. U pozostałych pacjentów z guzami w I stadium i obecnością dodatkowych niekorzystnych histologicznych lub genetycznych czynników prognostycznych lub w stadium II zaawansowania klinicznego zastosowano krótkotrwałą, trwającą 3-6 miesięcy pooperacyjną chemioterapię o umiarkowanej agresywności z zastosowaniem cyclofosfamidu i vinkrystyny. Pacjenci z chorobą zaawansowaną (III i IV stadium kliniczne) byli leczeni kompleksowo. Protokoły leczenia tych chorych obejmowały różne schematy chemioterapii konwencjonalnej i zabieg operacyjny usunięcia pozostałej po chemioterapii masy nowotworowej. Chorzy, u których nie osiągnięto radykalności operacyjnej (20 chorych = 18,2%) byli poddawani radioterapii na lożę po guzie. Do końca roku 2002 chemioterapię mieloablacyjną z autologicznym przeszczepem komórek krwiotwórczych zastosowano u 5 pacjentów z grupy wysokiego ryzyka. Od 2002 roku w grupie pacjentów z wysokim ryzykiem wznowy terapia mieloablacyjna z autoprzeszczepem komórek krwiotwórczych była prowadzona w ramach przyjętego w Polsce międzynarodowego protokołu HR-NBL-1 ESIOP opracowanego przez Europejskie Towarzystwo Onkologii Dziecięcej w oparciu o uprzednio uzyskane wyniki leczenia takich chorych [138,161].

W ramach protokołu HR-NBL-1 ESIOP w okresie obserwacji autologiczny przeszczep szpiku zastosowano u 6 chorych. Łącznie terapię mieloablacyjną otrzymało 11 pacjentów (10%) analizowanych chorych.

Chemioterapia

Stosowane schematy chemioterapii były różnorodne w zależności od ośrodka i czasu rozpoczęcia terapii onkologicznej. Rodzaje i częstość ich zastosowania przedstawiono w tabeli 24. Najczęściej stosowane były dwa protokoły leczenia: „warszawski" – u 39 chorych oraz HR-NBL-1 –ESIOP, którym leczono 30 pacjentów zakwalifikowanych do grupy wysokiego ryzyka.

Tab. 24. Protokoły chemioterapii stosowane w analizowanej grupie 110 chorych.
Tab. 24. Treatment protocols used in the analyzed group of 110 patients.

Protokoły chemioterapii *Chemotherapy protocols*	Liczba chorych *Number of patients*	%
Protokół „Warszawski" *„Warsaw protocol"*	39	35,4
HR-NBL-1/ESIOP.	30	27,3
„Tokio"	12	10,9
Inne schematy chemioterapii konwencjonalnej *Other protocols of conventional chemotherapy*	21	19,1
Bez chemioterapii *Without chemotherapy*	8	7,3

„Tokio" [215]; Protokół „Warszawski" [190]; HR NBL-1/ESIOP [138,161].

Leczenie operacyjne

Leczenie operacyjne przeprowadzono u 104/110 pacjentów. Nie przeprowadzono zabiegu usunięcia guza u sześciu chorych. W przypadku 2/6 pacjentów z chorobą w III stadium zaawansowania klinicznego rozpoznanie postawiono na podstawie badań obrazowych i stwierdzenia podwyższonego poziomu VMA w moczu. Zastosowanie u tych chorych chemioterapii jako jedynej metody leczenia doprowadziło do remisji choroby nowotworowej. W pozostałych czterech przypadkach chorzy w IV stadium zaawansowania klinicznego w momencie zakończenia obserwacji znajdowali się w fazie indukcyjnej leczenia onkologicznego przed zabiegiem operacyjnym. Radykalny zabieg usunięcia guza przeprowadzony został u 63/110 (57,3%) leczonych.

Radioterapia

Radioterapię w dawkach od 30-40 Gy obejmującą lożę ogniska pierwotnego nowotworu zastosowano u 20 chorych (18,2%) - w tym u 16 pacjentów naświetlania zastosowano w przypadku makroskopowych pozostałości tkanki nowotworowej w ognisku pierwotnym w przypadkach zabiegów nieradykalnych, a u czterech pacjentów był to jeden z etapów leczenia w ramach programu HR NBL-1/ESIOP.

Leczenie choroby resztkowej

Terapię analogiem kwasu retinoinowego podjęto jako leczenie choroby resztkowej u dziewięciu chorych (8,2%) z chorobą w IV stadium zaawansowania klinicznego. Całość sześciomiesięcznej kuracji tym lekiem zakończono u trzech chorych. Jeden z nich (1 miesiąc po zakończonej kuracji w momencie końca obserwacji) pozostawał w całkowitej remisji choroby nowotworowej. W przypadku pozostałych dwóch pacjentów wystąpiła wznowa choroby nowotworowej w czasie odpowiednio 14 miesięcy i 30 miesięcy od zakończenia leczenia kwasem retinoinowym z szybką progresją choroby nowotworowej i zgonem. W przypadku trójki kolejnych dzieci leczonych wg protokołu HR-NBL1/ESIOP wznowa choroby nowotworowej nastąpiła w czasie podawania kwasu retinoinowego, odpowiednio 2, 3 i 4 miesiące od zakończenia radioterapii, na lożę po guzie. Trzech pozostałych chorych kontynuowało leczenie choroby resztkowej w momencie zakończenia obserwacji pozostając w całkowitej remisji choroby.

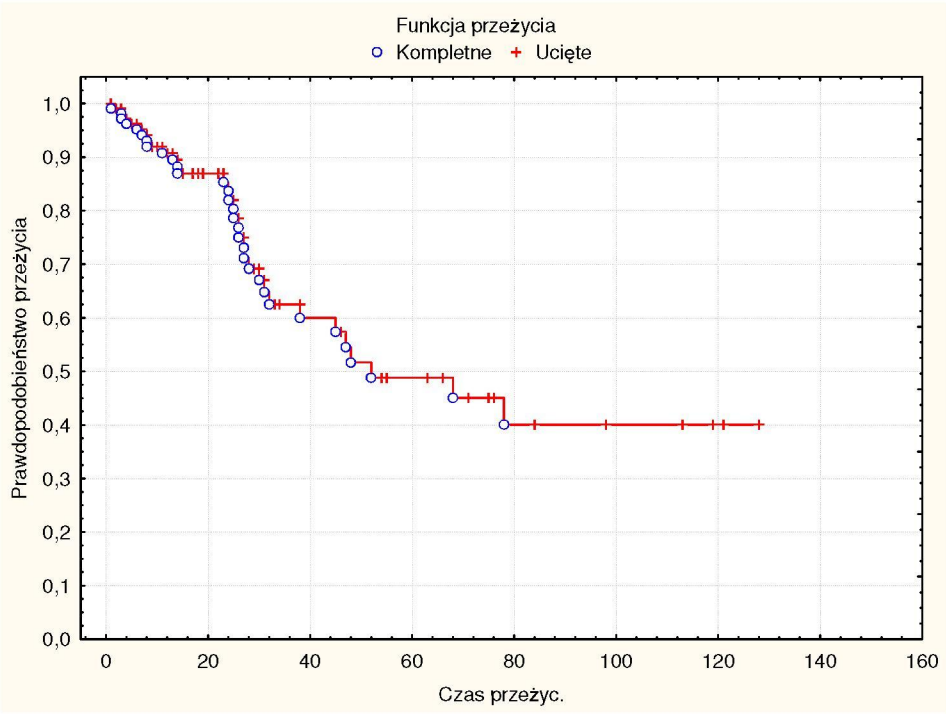
Odpowiedź na stosowane leczenie

Tabela 25 przedstawia uzyskane wyniki leczenia. Spośród 110 analizowanych chorych w momencie zakończenia obserwacji żyło 78 chorych (70,9%). Prawdopodobieństwo przeżycia dla całej grupy 110 pacjentów wynosiło 40% (ryc. 3). Wśród żyjących, 65 osiągnęło pierwszą remisję całkowitą (CR1), a u 2 pacjentów wystąpiła wznowa, z osiągniętą po leczeniu drugą remisją całkowitą (CR2). Pozostałych 11 żyjących chorych było nadal aktywnie leczonych w momencie zakończenia obserwacji, z uzyskanym efektem w postaci częściowej remisji procesu nowotworowego. Zgony na skutek progresji choroby nowotworowej wystąpiły u 32 chorych (29,1 %).

Tab. 25. Uzyskana odpowiedź na stosowane leczenie onkologiczne u 110 chorych.
Tab. 25. The acquired oncological treatment response in 110 patients.

Odpowiedź na leczenie *Treatment response*	Liczba chorych *Number of patients*	%
CR1/CR2	67	60,9
PR	11	10,0
DOD	32	29,1

CR = całkowita remisja, PR = częściowa remisja, DOD = zgon z progresji choroby
CR = complete remission, PR = partial remission, DOD = death of disease



Ryc. 3. Prawdopodobieństwo przeżycia analizowanych 110 pacjentów (miesiące).
Fig. 3. Survival probability in analyzed group of 110 patients (months).

Wznowa choroby wystąpiła w czasie od 1 miesiąca do 6 lat i 8 miesięcy (średnio po 18 miesiącach) od zakończenia terapii u 16 pacjentów (14,4%). Wszyscy chorzy ze wznową rozpoczynali leczenie w III lub IV stadium zaawansowania klinicznego choroby. Dominowały wznowy w ogniskach przerzutowych (tab. 26). W przypadku 2 chorych, u których uzyskano utrzymującą się drugą remisję, wznowa w jednym przypadku wystąpiła w szpiku kostnym, a w drugim przypadku w miąższu płuc. Czas przeżycia tych chorych od rozpoznania choroby nowotworowej wynosił u jednego 2 lata i 1 miesiąc, a u drugiego 11 lat i 1 miesiąc. Leczenie pozostałych 14/16 chorych ze wznową zakończyło się niepomyślnie.

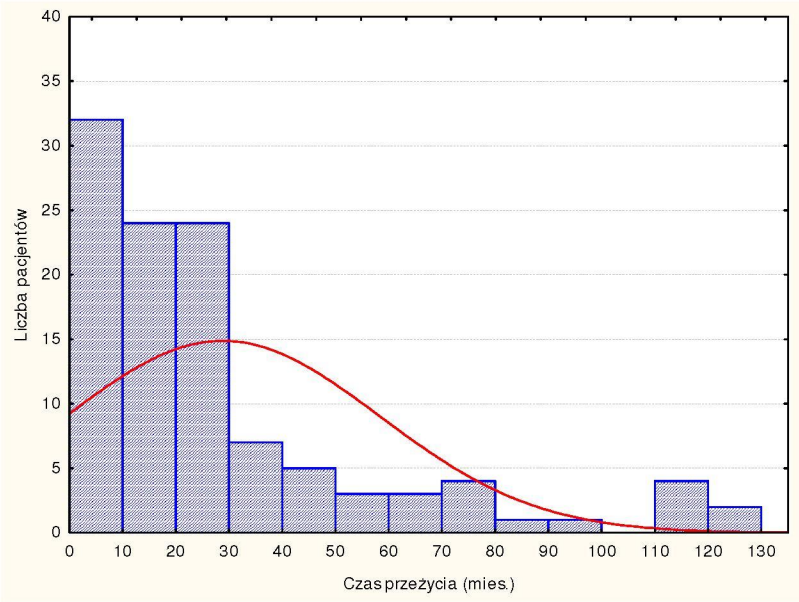
Tab. 26. Charakterystyka kliniczna 16 chorych ze wznową Nb.
Tab. 26. Patients characteristics in 16 cases of Nb recurrence.

Cechy kliniczne *Clinical data*		Liczba chorych *Number of patients*
Stadium zaawansowania *Stage*	III	3
	IV	13
Lokalizacja wznowy *Site of relapse*	Okolica guza pierwotnego *Primary tumor region*	7
	Szpik/ *Bone marrow*	4
	Płuca/ *Lungs*	2
	Ośrodkowy układ nerwowy *Central nervous system*	2
	Kości/ *Bones*	1
Efekt leczenia wznowy *Treatment response*	DOD	14
	CR2-żyje/ *CR-alive*	2

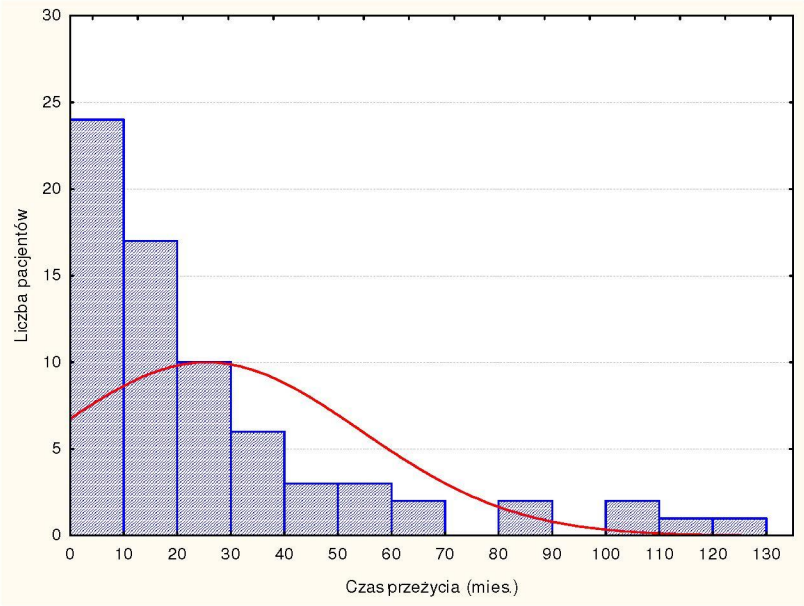
CR2 = druga remisja całkowita, DOD = zgon
CR2 = second complete remission, DOD = death of disease

Czas przeżycia

Czas przeżycia wszystkich chorych od rozpoznania (OS) wahał się od 1 miesiąca do 128 miesięcy (średnio 28,8±29,5[SD], mediana 19,0 miesięcy). Obserwowany rozkład różnił się statystycznie od rozkładu normalnego ($p<0,001$); (ryc. 4). W okresie prowadzonej obserwacji leczenie zakończyło 72 chorych. Czas przeżycia wolnego od choroby (EFS) u tych pacjentów wahał się od 0 do 128 miesięcy (średnio 25,5±28,7[SD], mediana 15,0). Rozkład wartości EFS różnił się statystycznie znamiennie od rozkładu normalnego ($p<0,001$) (ryc. 5).



Ryc. 4. Rozkład czasu przeżycia pacjentów od rozpoznania choroby nowotworowej (OS).
Fig. 4. Distribution of the Overall Survival (OS) of the patients.



Ryc. 5. Rozkład czasu przeżycia pacjentów od zakończenia leczenia, wolny od objawów choroby nowotworowej (EFS).
Fig. 5. Distribution of Event Free Survival of the patients since the end of treatment (EFS).

4.2. BADANIA HISTOLOGICZNE

Badania histologiczne guzów zostały przeprowadzone u 104/110 chorych w Zakładzie Patomorfologii AMG. Materiał biologiczny do badań histologicznych został pobrany z ogniska pierwotnego u 104/110 chorych. W pozostałych 6 przypadkach rozpoznanie Nb ustalono w oparciu o wyniki badań obrazowych, podwyższony poziom katecholamin w moczu, bądź na podstawie stwierdzenia obecności komórek Nb w szpiku kostnym.

W analizie obrazu morfologicznego guzów Nb dokonano podziału badanych tkanek na 2 grupy zależnie od stosowania u pacjentów chemioterapii przed pobraniem materiału do badań histologicznych. Do grupy I - guzów badanych przed włączeniem leczenia cytostatykami należało 57 guzów, do grupy II - 47 guzów badanych morfologicznie po wstępnej chemioterapii.

W tabeli 27 przedstawiono typy morfologiczne badanych guzów. Przeważały guzy Nb o skąpym podścielisku (79/104 guzy = 76%).

Tab. 27. Charakterystyka typów histologicznych analizowanych guzów Nb.
Tab. 27. Histological characteristic of analyzed Nb tumors.

Grupy badanych guzów *Groups of analyzed tumors*	Liczba guzów *Number of tumors*				
	Skąpopodścieliskowe *Stroma-poor*			Bogatopodścieliskowe *Stroma rich*	
	UN	POO	DF	GNB	GN
Grupa I (57 przed CHT) *(57 before CHT)*	6 (11%)	22 (39%)	21 (36%)	5 (9%)	3 (5%)
Grupa II (47 po CHT) *(47 after chemotherapy)*	5 (11%)	18 (38%)	7 (16%)	16 (33%)	1 (2%)
Łącznie/ *Total* (104)	11 (11%)	40 (38%)	28 (27%)	21 (20%)	4 (4%)

Typy skąpopodścieliskowe Nb: UN=niezróżnicowany, POO=niskozróżnicowany, DF=różnicujący się
Typy bogatopodścieliskowe Nb: GNB=nerwiak zwojowokomórkowy, GN=dojrzały zwojakonerwiak
Stroma-poor types of Nb: UN=undifferentiated, POO=poorly differentiated, DF=differentiating
Stroma-rich types of Nb: GNB= ganglioneuroblastoma, GN=ganglioneuroma

W przypadku 52/57 guzów badanych przed rozpoczęciem leczenia ocenione zostały parametry pozwalające zakwalifikować te guzy do grupy „korzystnej" lub „niekorzystnej" rokowniczo budowy histologicznej. W pozostałych 5 przypadkach brak danych (wartości MKI) nie pozwolił na dokonanie takiej kwalifikacji. Stwierdzono niewielką przewagę guzów o „korzystnej" histologii (28/52).

4.2.1. Odpowiedź na leczenie w zależności od typu histologicznego guza

Odrębnej oceny histologicznej wymagały guzy badane przed i po chemioterapii. **W grupie chorych z guzami ocenianymi przed chemioterapią – wszyscy z typem zwojaka zarodkowego o bogatym podścielisku osiągnęli remisję. Brak remisji stwierdzano najczęściej u chorych z guzami UN i POO (18/51=35% niekorzystnej odpowiedzi w guzach z tym typem histologicznym).**

W grupie chorych, u których badania tkanki nowotworowej przeprowadzono po zastosowaniu chemioterapii niepomyślne wyniki leczenia (brak całkowitej remisji lub zgon pacjenta) stwierdzano zarówno wśród chorych z guzami o skąpym podścielisku jak też z guzami o podścielisku bogatym. Spośród chorych z guzami o skąpym podścielisku zmarło lub nie osiągnęło remisji 27/79 chorych, a wśród pacjentów z guzami bogatopodścieliskowymi brak remisji całkowitej stwierdzono u 10/25 (tab. 28).

Tab. 28. Odpowiedź na leczenie w zależności od typu histologicznego guza.
Tab. 28. Treatment response regarding to the histological type of tumor.

Typ histologiczny guza *Histological type of tumor*		Odpowiedź na leczenie *Treatment response*	
		CR	PR/DOD
Grupa I (przed CHT) *Group I (before CHT)*	UN	3	3
	POO	17	6
	DF	14	5
	GNB	5	0
	GN	3	0
Grupa II (po CHT) *Group II (after CHT)*	UN	2	3
	POO	12	6
	DF	4	4
	GNB	7	9
	GN	0	1

CHT= chemioterapia, CR = całkowita remisja, PR = częściowa remisja, DOD = zgon
Typ histologiczny guza Nb: UN = niezróżnicowany, POO = niskozróżnicowany, DF = różnicujący się, GNB = nerwiak zwojowokomórkowy, GN = zwojakonerwiak
CHT = chemotherapy, CR = complete remission, PR =partial remission, DOD = death of disease
Histological type of Nb: UN = undifferentiated, POO = poorly differentiated, DF = differentiating
GNB = ganglioneuroblastoma,GN = ganglioneuroma

W ocenie odpowiedzi na leczenie w zależności od typu morfologiczno – prognostycznego znamiennie częściej całkowitą remisję uzyskano w guzach o tzw. morfologii „korzystnej" niż w grupie z guzami o morfologii niekorzystnej (86% vs. 46%) (tab. 29).

Tab. 29. Odpowiedź na leczenie w zależności od prognostycznego typu morfologicznego (w grupie 52 guzów ocenianych przed chemioterapią).
Tab. 29. Treatment response regarding to the prognostic morphological type of tumor (in 52 tumors assessed before chemotherapy).

Typ histologiczno-prognostyczny *Prognostic histological type*	Odpowiedź na leczenie *Treatment response*		
	CR	PR/DOD	P
„Korzystny" *Favorable*	24 (86%)	4 (14%)	<0,001
„Niekorzystna" *Unfavorable*	11 (46%)	13 (54%)	

CHT= chemioterapia, CR = całkowita remisja, PR = częściowa remisja, DOD = zgon
CHT = chemotherapy, CR = complete remission, PR = partial remission, DOD = death of disease

4.2.2. Ocena zależności cech klinicznych choroby nowotworowej od budowy morfologicznej guzów grupy zwojaka zarodkowego

Typ morfologiczny a wiek pacjenta

W guzach niemowlęcych zarówno w grupie badanej przed jak i po chemioterapii przeważał typ UN /POO, natomiast w guzach rozwijających się u pacjentów > 1 roku życia częściej spotykano guzy o cechach dojrzewania typu DF, GNB zwłaszcza w grupie badanej po zastosowaniu chemioterapii (tab. 30).

Tab. 30. Zależność typu histologicznego guza od wieku pacjenta.
Tab. 30. Relation between histological type of tumor and the age of patient.

Grupy guzów badanych *Groups of tumors assessed*	Wiek *Age*	Typ histologiczny *Histological type*				
		UN	POO	DF	GNB	GN
Przed CHT *Before CHT*	< 1 roku/ < *1 yr*	4	12	12	0	0
	≥ 1 roku/ ≥ *1 yr*	2	10	9	5	3
Po CHT *After CHT*	< 1 roku/ < *1 yr*	3	7	1	1	0
	> 1 roku/ ≥ *1 yr*	2	11	6	15	1

CHT= chemioterapia; Typ morfologiczny guza: UN = niezróżnicowany, POO = niskozróżnicowany, DF = różnicujący się, GNB = nerwiak zwojowokomórkowy, GN = zwojakonerwiak
CHT =chemotherapy; Histological type of Nb: UN = undifferentiated, POO = poorly differentiated, DF = differentiating, GNB = ganglioneuroblastoma, GN = ganglioneuroma

Typ histologiczny a kliniczne stadium zaawansowania Nb

W grupie guzów badanych przed chemioterapią guzy bogatopodścieliskowe (GNB i GN) rozpoznawano w niskich stadiach zaawansowania klinicznego choroby (7 guzów w stadium I i II). **W grupie guzów ocenianych morfologicznie po chemioterapii stwierdzono 15 guzów o budowie częściowo zróżnicowanej typu GNB** (tab. 31).

Tab. 31. Zależność typu histologicznego guza od stadium zaawansowania nowotworu w momencie rozpoznania.
Tab. 31. Relation between histological type of tumor and the stage of disease at diagnosis.

Grupa guzów *Group of tumors*	Stadium kliniczne choroby *Stage of disease*	Typ histologiczny *Histological type*				
		UN	POO	DF	GNB	GN
Przed CHT *Before CHT*	I i II	1	5	0	4	3
	III	2	5	7	0	0
	IV	2	8	6	0	0
	IVs	1	2	0	0	0
Po CHT *After CHT*	I i II	0	2	2	1	0
	III	2	4	5	3	1
	IV	3	10	9	10	0
	IVs	0	4	1	1	0

CHT=chemioterapia; Typ morfologiczny guza: UN=niezróżnicowany, POO=niskozróżnicowany, DF = różnicujący się, GNB=nerwiak zwojowokomórkowy, GN=zwojakonerwiak
CHT=chemotherapy; Histological type of Nb: UN=undifferentiated, POO=poorly differentiated, DF=differentiating, GNB=ganglioneuroblastoma, GN=ganglioneuroma

Tab. 32. Zależność typu histologicznego guza od stadium zaawansowania nowotworu w momencie rozpoznania.
Tab. 32. Relation between histological type of tumor and the stage of disease at diagnosis.

Grupa guzów *Group of tumors*	Stadium kliniczne choroby *Stage of disease*	Typ histologiczny *Histological type*				
		UN	POO	DF	GNB	GN
Przed CHT *Before CHT*	I i II	1	5	0	4	3
	III	2	5	7	0	0
	IV	2	8	6	0	0
	IVs	1	2	0	0	0
Po CHT *After CHT*	I i II	0	2	2	1	0
	III	2	4	5	3	1
	IV	3	10	9	10	0
	IVs	0	4	1	1	0

CHT = chemioterapia; Typ morfologiczny guza: UN=niezróżnicowany, POO=niskozróżnicowany, DF =różnicujący się, GNB=nerwiak zwojowokomórkowy, GN=zwojakonerwiak
CHT=chemotherapy; Histological type of Nb: UN=undifferentiated, POO=poorly differentiated, DF=differentiating, GNB=ganglioneuroblastoma, GN=ganglioneuroma

Typ histologiczny a obecność przerzutów do kości

Wszystkie guzy z przerzutami do kości ocenianych przed chemioterapią, należały do skąpopodścieliskowych. W grupie guzów ocenianych po chemioterapii wśród guzów z przerzutami do kości występowały różne typy morfologiczne Nb (14/25 skąpopodścieliskowych i 11/25 bogatopodścieliskowych).

Typ histologiczny a wielkość guza pierwotnego

Nie zaobserwowano zależności pomiędzy typem morfologicznym a wielkością guza pierwotnego.

Typ histologiczny a lokalizacja ogniska pierwotnego nowotworu

W grupie guzów badanych przed zastosowaniem chemioterapii niezależnie od lokalizacji występowały różne typy morfologiczne Nb. W grupie badanej po chemioterapii zaobserwowano, iż guzy w lokalizacji nadnerczowej prezentują częściej typ GNB (13/30 guzów).

Typ histologiczny a możliwość radykalnego usunięcia guza

Radykalne zabiegi usunięcia guza przed włączeniem chemioterapii przeprowadzone zostały we wszystkich przypadkach guzów o bogatym podścielisku. Blisko połowa (21/49=43%) guzów typu skąpopodścieliskowego w grupie ocenianej morfologicznie przed chemioterapią okazała się guzami nieoperacyjnymi. W grupie guzów ocenianych po chemioterapii wśród usuniętych nieradykalnie stwierdzono 4 guzy częściowo dojrzałe (GNB).

Typ histologiczny a markery biochemiczne

W grupie chorych, u których typ histologiczny guza został oceniony przed zastosowaniem chemioterapii najwyższe stężenia LDH w surowicy krwi (przekraczające dwukrotnie poziom normy) występowały wyłącznie u chorych z guzami skąpopodścieliskowymi. W grupie chorych z guzami ocenianymi po wstępnej chemioterapii stwierdzono podwyższone stężenie LDH, aż w 13/15 guzów typu GNB.

Zwiększone wydalanie kwasu VMA z moczem stwierdzano najczęściej (15/20) w przypadku chorych z guzami typu POO i DF w grupie ocenianej przed chemioterapią. Nie stwierdzano zależności wydalania VMA i typu histologicznego ocenianego po zastosowaniu chemioterapii.

Nie zaobserwowano zależności wartości stężenia ferrytyny w surowicy i typów histologicznych Nb.

4.2.3. Podsumowanie

W analizie budowy morfologicznej dokonano podziału guzów na dwie grupy: I grupę - guzów badanych przed rozpoczęciem chemioterapii i II grupę - guzów po zastosowaniu tego leczenia. Klasyfikacja prognostyczno-histologiczna możliwa była jedynie w guzach badanych przed chemioterapią (57 guzów). W drugiej grupie (47 guzów) po chemioterapii oceniano jedynie typ morfologiczny tkanki nowotworowej. W grupie I nieznacznie przeważały guzy o budowie „korzystnej". W obu grupach połowa guzów należała do guzów niskozróżnicowanych (UN i POO). W grupie II częściej stwierdzano guzy typu GNB. W wieku niemowlęcym występowała przewaga guzów o budowie niskozróżnicowanej (UN i POO). Typ GNB w grupie guzów badanych przed chemioterapią częściej występował w lokalizacji nadnerczowej i w guzach o niskim stadium klinicznego zaawansowania. Lepszą odpowiedź na leczenie uzyskano w guzach bogatopodścieliskowych.

4.3. BADANIA GENETYCZNE

4.3.1. Badania cytogenetyczne

Oznaczanie obecności trzech charakterystycznych dla Nb markerów genetycznych tj. amplifikacji onkogenu *NMYC*, delecji chromosomu 1p oraz częściowej trisomii chromosomu 17q przeprowadzono u 85/110 chorych we fragmentach tkanek nowotworowych lub rozmazach szpiku nacieczonego komórkami zwojaka zarodkowego. W 54 przypadkach badania cytogenetyczne tkanki nowotworowej były wykonane przed rozpoczęciem chemioterapii, a w 31 po wstępnej chemioterapii. Badania wszystkich trzech wskaźników cytogenetycznych zostały wykonane w 51 guzach, natomiast u 34 ze względu na małą ilość materiału była możliwa ocena cytogenetyczna tylko 1 lub 2 wskaźników. Częstość występowania badanych zmian cytogenetycznych przedstawia tabela 33.

Tab. 33. Częstość występowania zmian cytogenetycznych w badanych tkankach zwojaka zarodkowego.
Tab. 33. Frequency of the cytogenetic changes in analyzed Nb tumor tissues.

Typ nieprawidłowości cytogenetycznej *Type of cytogenetic abnormality*		Liczba guzów *Number of tumors*		
		łączna *total*	przed CHT *before CHT*	po CHT *after CHT*
amplifikacja *NMYC* (78 guzów) *MYCN amplification (78 tumors)*	obecna *present*	23 (29%)	15 (28%)	8 (32%)
	nieobecna *absent*	55 (71%)	38 (72%)	17 (68%)
del(1p) (66 guzów) *del(1p) (66 tumors)*	obecna *present*	33 (50%)	26 (55%)	7 (37%)
	nieobecna *absent*	33 (50%)	21 (45%)	12 (63%)
częściowa trisomia 17q (63 guzy) *17q gain (63 tumors)*	obecna *present*	30 (48%)	22 (48%)	8 (47%)
	nieobecna *absent*	33 (52%)	24 (52%)	9 (53%)

CHT= chemioterapia/ *CHT =chemotherapy*

NMYC

Badania oceniające liczbę kopii onkogenu *NMYC* przeprowadzone zostały we fragmentach 78 guzów Nb, w tym w 19 preparatach pochodzących z krótkotrwałych hodowli tkankowych Nb, w 41 preparatach „odciskowych" oraz w 18 preparatach z nacieczonego przez nowotwór szpiku.

Stwierdzono w 30/78 (36%) guzów Nb obecność zwiększonej >2 kopii onkogenu *NMYC*. W 7/78 (9%) guzach komórki nowotworu prezentowały liczbę kopii *NMYC* >2 i < 10, natomiast w 23/78 (29%) liczba kopii *NMYC* przekraczała 10, czyli występowała amplifikacja tego onkogenu. Amplifikację *NMYC* znaleziono w 6/19 (32%) preparatach pochodzących z hodowli komórkowych, 6/18 (33%) preparatach szpiku i 11/41 (27%) preparatach „odciskowych" (z fragmentów tkanki guza).

Delecja chromosomu 1p

Tę aberrację chromosomalną oceniono w 66 fragmentach tkanek Nb wykonując 16 badań w preparatach z krótkotrwałych hodowli komórkowych Nb, 35 badań w preparatach odciskowych oraz 15 badań w preparatach nacieczonego szpiku. Del(1p) została wykryta w 5/16 (33%) preparatach pochodzących z krótkotrwałych hodowli komórkowych, 6/15 (40%) preparatów szpiku i 20/35 (57%) preparatów odciskowych. **Łącznie obecność del(1p) stwierdzono w tkankach Nb pobranych od 31/66 (48%) pacjentów**.

Dodatkowy materiał chromosomu 17q

Analizy cytogenetycznej tej aberracji dokonano we fragmentach tkanek Nb pobranych od 63 chorych. Badania w preparatach z krótkotrwałych hodowli komórkowych Nb przeprowadzono w 18 przypadkach, w preparatach odciskowych w 28 przypadkach i w preparatach z nacieczonego szpiku w 17 przypadkach. Częściową trisomię 17q znaleziono w przypadku 6/18 (33%) w preparatach z krótkotrwałych hodowli, 6/17 (35%) preparatach szpiku i 18/28 (65%) preparatach odciskowych guza. Łącznie stwierdzono obecność częściowej trisomii 17q w 30/63 (48%) tkanek Nb.

Częstość występowania amp *NMYC* oraz częściowej trisomii 17q w grupie guzów badanych przed chemioterapią i po chemioterapii była zbliżona, natomiast del(1p) występowała rzadziej (37%) w grupie guzów ocenianych po chemioterapii niż w grupie ocenianej przed leczeniem (55%).

Współwystępowanie zmian cytogenetycznych

Współwystępowanie zmian cytogenetycznych przedstawia kolejna tabela 34.

Tab. 34. Współwystępowanie zmian cytogenetycznych w tkankach Nb.
Tab. 34. Coexistence of different cytogenetic abnormalities in Nb tissues.

Zmiana genetyczna *Genetic abnormality*			Liczba guzów *Numer of tumors*			
amp *NMYC* *MYCN amp*	del (1p) *del(1p)*	częściowa trisomia 17q *17q gain*	łącznie *total*	%	przed CHT *before CHT*	po CHT *after CHT*
-	-	-	10	19,6	5	5
-	-	+	6	11,8	3	3
-	+	-	10	19,6	3	7
-	+	+	10	19,6	5	5
+	-	-	3	5,9	3	0
+	-	+	6	11,8	2	4
+	+	-	4	7,8	3	1
+	+	+	2	3,9	2	0
Łącznie/ *Total*			51	100	26	25

„ +" zmiana genetyczna obecna; „ –" zmiana genetyczna nieobecna; CHT=chemioterapia
„ +" genetic abnormality present: „ –" genetic abnormality absent; CHT = chemotherapy

Amplifikacja *NMYC* jako jedyna z trzech badanych nieprawidłowości genetycznych występowała w 3/51 wykonanych oznaczeń. Del(1p) bez innych badanych nieprawidłowości cytogenetycznych ujawniono w 8 guzach, a częściową trisomię 17q w pięciu guzach.

Równoczesną obecność wszystkich trzech aberracji cytogenetycznych zaobserwowano jedynie w dwóch guzach. Guzy te rozpoznano u pacjentów z niekorzystnymi prognostycznie cechami klinicznymi (choroba rozsiana, wiek > 1 roku życia, duże > 10 cm średnicy guzy w ognisku pierwotnym, podwyższone wartości LDH i ferrytyny). Czas obserwacji obu chorych był krótki (3 miesiące) i w tym czasie u obu osiągnięto jedynie remisję częściową. W 10/51 (19%) guzów nie stwierdzono żadnej z trzech badanych nieprawidłowości.

Chorzy z guzami bez obecności analizowanych trzech aberracji (10 chorych) stanowili grupę niejednorodną klinicznie. Prezentowali różne stadia kliniczne choroby (pięciu chorych-stadium IV, czterech chorych - stadium III, jeden chory - stadium IVs) i różny wiek w momencie rozpoznania choroby nowotworowej. **Większość z nich (8/10 = 80%) osiągnęła całkowitą remisję choroby nowotworowej. Dwoje pozostałych w IV stadium zaawansowania, w wieku ponad 1 rok życia zmarło z progresji choroby**.

4.3.2. Badania ploidii DNA

Ploidię DNA oznaczono w 48 guzach. W 22 przypadkach ploidię określono na podstawie kariotypu komórek nowotworowych, a w pozostałych 26 przypadkach ploidię DNA oznaczono metodą cytometrii przepływowej.

W 18 badaniach cytometrycznych otrzymano wyniki w postaci graficznej z jednym „pikiem" oraz w ośmiu przypadkach z dwoma „pikami" odpowiadające dwu frakcjom komórek, z których jeden oznaczał frakcję komórek okołodiploidalnych, a drugi frakcję komórek aneuploidalnych. Przyjmowano, że komórki aneuploidalne są frakcją komórek nowotworowych w tkance guza. Przykłady otrzymanych zapisów graficznych zamieszczono w dokumentacji fotograficznej pracy (w Załącznikach).

Ploidia była odczytywana z kariotypów jako liczba chromosomów:

45-50 – okołodiploidia, 60-80 – okołotriploidia, >80 – okołotetraploidia

W cytometrii przepływowej odpowiadające wykresom wartości DI interpretowano jako:

<0,85 – hipodiploidię, 0,86-1,25 – okołodiploidię, 1,26-1,75 – okołotriploidię oraz 1,76-2,25 jako okołotetraploidię.

Tabela 35 przedstawia częstość występowania określonego typu ploidii w badanych 48 guzach.

Tab. 35. Częstość typów ploidii komórkowej w badanych 48 fragmentach tkanek Nb.
Tab. 35. Frequency of the different types of ploidy in 48 analyzed Nb tissues.

Typ ploidii *Type of ploidy*	Liczba guzów *Numer of tumors*	%
Hipodiploidia *Hypoploidy*	8	17
Okołodiploidia *Near diploidy*	25	52
Okołotriploidia *Near triploidy*	8	17
Okołotetraploidia *Near tetraploidy*	7	14
Łącznie/ *Total*	48	100

Przeważały guzy okołodiploidalne, które stwierdzono w 25/48 (52%) przypadków. Guzy okołotriploidalne stanowiły 8/48 (17%), hipodiploidalne 8/48 (17%).

Aberracje chromosomalne: del(1p) i częściowa trisomia 17q występowały z porównywalną częstością w guzach zarówno di-/tetraploidalnych, jak i triploidalnych. Amp *NMYC* występowała częściej w guzach okołodi/tetraploidalnych (6/21) niż w okołotriploidalnych (1/6) (tab. 36).

Tab. 36. Współzależność ploidii komórkowej i innych zmian cytogenetycznych w 48 guzach Nb.
Tab. 36. Relation between ploidy and other cytogenetic abnormalities in 48 analyzed Nb tissues.

Typ nieprawidłowości genetycznej *Type of genetic abnormality*	Okołodi-/tetraploidia *Near di-/tetraploidy* (32)	Okołotriploidia *Near triploidy* (8)	Hipoploidia *Hypodiploidy* (7)
amp *NMYC* *MYCN amp*	6/21 (29%)	1/6 (17%)	2/5 (40%)
del (1p) *del(1p)*	6/19 (32%)	3/7 (43%)	1/5 (20%)
częściowa trisomia 17q *17q gain*	5/16 (31%)	4/8 (50%)	2/6 (33%)

W guzach niemowlęcych z okołotriploidią nie stwierdzono obecności amp *NMYC*. Wśród niemowlęcych guzów di/tetraploidalnych w 2/5 guzów stwierdzono obecność przynajmniej 1 z badanych markerów cytogenetycznych (tab. 37).

Tab. 37. Ploidia w guzach Nb u niemowląt.
Tab. 37. Ploidy in Nb infant tumors.

Typ nieprawidłowości genetycznej *Type of genetic abnormality*	Typ ploidii *Type of ploidy*		
	Okołodi-/tetraploidia (5 guzów) *Near ploidy /tetraploidy (5 tumors)*	Hipodiploidia (1 guz) *Hypodiploidy (1 tumor)*	Okołotriploidia (4 guzy) *Near triploidy (1 tumor)*
amp *NMYC* *MYCN amp*	2/5	0/1	0/4
del(1p) *del(1p)*	2/5	0/1	1/4
częściowa trisomia 17q *17q gain*	2/5	1/1	1/4

4.3.3. Charakterystyka kliniczna pacjentów z guzami Nb różniącymi się markerami genetycznymi

NMYC

Guzy z amplifikacją *NMYC* rozwijały się głównie u pacjentów demonstrujących niekorzystne rokowniczo wskaźniki kliniczne. Przeważali chorzy > 1 roku życia (18/23=78%). Większość pacjentów (16/23 = 69%) z guzami z obecnością amp *NMYC* w momencie rozpoznania prezentowała chorobę nowotworową rozsianą. Częściej (11/24 =45%) amp *NMYC* znajdowano w guzach > 10 cm średnicy niż w guzach mniejszych. Obecność przerzutów do kości w połowie przypadków związana była z guzami o zwiększonej > 2 liczbie kopii *NMYC*. Wysokie wartości LDH w momencie rozpoznania (przewyższające dwukrotnie normę stwierdzono u 16/23 (46%) pacjentów, u których rozwijały się guzy z amp *NMYC* (tab. 38 a i b).

Tab.38a. Charakterystyka kliniczna chorych z Nb różniącymi się liczbą kopii onkogenu *NMYC* w komórkach nowotworowych.

Tab.38a. Clinical characteristics of patients with Nb and with different number of MYCN amplification.

Cechy kliniczne *Clinical characteristics*		*NMYC (%) / MYCN (%)*					
		2 kopie *2 copies*		3-10 kopii *3-10 copies*		>10 kopii *>10 copies*	
Wiek *Age*	< 1 roku	21	(73)	3	(10)	5	(17)
	≥ 1 roku	26	(54)	4	(8)	18	(38)
Stadium *Stage*	I	2	(40)	2	(40)	1	(20)
	II	6	(75)	1	(12,5)	1	(12,5)
	III	11	(73)	0	(0)	4	(27)
	IV	23	(54)	4	(9)	16	(37)
	IVs	5	(83)	0	(0)	1	(17)
Lokalizacja ogniska pierwotnego *Primary site*	nadnercza *adrenal glands*	23	(50)	7	(15)	16	(35)
	okolica zaotrzewnowa *retroperitoneal region*	17	(71)	0	(0)	7	(29)
	śródpiersie *mediastinum*	5	(100)	0	(0)	0	(0)
	nieznana *unknown*	2	(100)	0	(0)	0	(0)
Wielkość guza *Tumor size*	< 5 cm	1	(71)	2	(8)	5	(21)
	5-10 cm	20	(70)	2	(7)	7	(24)
	> 10 cm	10	(42)	3	(13)	11	(45)
Przerzuty do kości w IV^0 *Bone metastases in stage IV*	obecne *present*	14	(50)	4	(14)	10	(36)
	nieobecne *absent*	9	(75)	1	(8)	2	(17)
Zabieg operacyjny *Surgery*	radykalny lub CR bez zabiegu *complete resection or CR without surgery*	24	(62)	5	(13)	10	(25)
	nieradykalny *partial resection*	15	(71)	1	(5)	5	(24)
	guz nieoperacyjny *unresectable tumor*	8	(47)	1	(6)	8	(47)

CR = całkowita remisja / *CR = complete remission*

Tab.38b.Wartości parametrów biochemicznych u chorych z guzami Nb różniącymi się liczbą kopii onkogenu *NMYC* w komórkach nowotworowych.

Tab.38b.Biochemical findings in patients with Nb tumors with different number of MYCN copies in tumor cells.

Parametry biochemiczne *Biochemical parameters*		*NMYC/ MYCN*					
		2 kopie *2 copies*		3-10 kopii *3-10 copies*		>10 kopii *>10 copies*	
LDH w surowicy *Serum LDH*	N	14	(70)	1	(5)	5	(25)
	> 1x N< 2xN	18	(78)	3	(13)	2	(8)
	≥2x N	17	(49)	2	(6)	16	(46)
Ferrytyna w surowicy *Serum ferritin*	< 142 ng/ml	11	(50)	3	(14)	8	(36)
	≥ 142 ng/ml	21	(72)	2	(7)	6	(21)

LDH = stężenie LDH prawidłowe, > 1xN < 2N = stężenie LDH powyżej normy i poniżej 2x norma, ≥ 2x norma = stężenie LDH przekraczające dwukrotny poziom normy;

N = normal level of LDH, >1xN <2xN = serum LDH above normal level and below 2x normal level, ≥ 2xN = above 2x normal level

Del(1p)

Charakterystykę kliniczną 66 pacjentów, u których wykonano badanie tkanek nowotworowych w kierunku obecności del(1p) przedstawiają tabele 39 a i b. Nie zaobserwowano zależności klinicznych oraz biochemicznych cech Nb i występowania tej aberracji w tkankach Nb.

Tab. 39a. Wartości parametrów biochemicznych u chorych z guzami Nb różniącymi się obecnością del(1p) w komórkach nowotworowych.

Tab.39a.Biochemical findings in patients with Nb tumors differing in the presence of del(1p) in tumor cells.

Parametry biochemiczne/ *Biochemical parameters*		Del(1p) (%)			
		Obecna/ *Present*		Nieobecna/ *Absent*	
LDH w surowicy/ *Serum LDH*	N	13	(65)	7	(35)
	> 1x N< 2xN	11	(50)	11	(50)
	≥2x N	7	(30)	16	(70)
Ferrytyna w surowicy/ *Serum ferritin*	< 142 ng/ml	11	(58)	8	(42)
	≥ 142 ng/ml	11	(52)	12	(48)

N = stężenie LDH w surowicy prawidłowe, > 1xN i <2N = stężenie LDH powyżej normy i poniżej 2x norma, ≥ 2x norma = stężenie LDH przekraczająca dwukrotny poziom normy

N = normal level of LDH, >1xN <2xN = serum LDH above normal level and below 2x normal level, ≥ 2xN = above 2x normal level

Tab.39b. Charakterystyka kliniczna chorych z guzami Nb różniącymi się obecnością del(1p) w komórkach nowotworowych.

Tab.39b. Clinical characteristics of patients with Nb tumors differing in the presence of del(1p) in tumor cells.

Cechy kliniczne *Clinical data*		Del(1p) (%)			
		Obecna/ *Present*		Nieobecna/ *Absent*	
Wiek *Age*	< 1 roku/< *1 year old*	11	(50)	11	(50)
	≥ 1 roku /≥ *1 year old*	21	(48)	23	(52)
Stadium *Stage*	I	3	(50)	3	(50)
	II	6	(75)	2	(25)
	III	10	(59)	7	(41)
	IV	15	(47)	17	(53)
	Ivs	2	(50)	2	(50)
Lokalizacja ogniska pierwotnego/ *Primary tumor localisation*	Nadnercze *Adrenal glands*	16	(47)	18	(53)
	Okolica zaotrzewnowa *Retroperitoneum*	10	(43)	13	(57)
	Śródpiersie *Mediastinum*	4	(57)	3	(43)
	Nieznana *Unknown*	2	(100)	0	(0)
Wielkość guza/ *Tumor diameter*	< 5 cm	10	(53)	9	(47)
	5-10 cm	12	(46)	14	(54)
	> 5 cm	8	(42)	11	(58)
Przerzuty do kości w IV° *Bone metastases in IV°*	Obecne/ *Present*	7	(37)	12	(63)
	Nieobecne/ *Absent*	6	(43)	8	(57)
Zabieg operacyjny *Surgery*	Radykalny lub CR bez zabiegu/ *Complete resection or CR without surgery*	17	(57)	13	(43)
	Nieradykalny/ *Partial resection*	3	(25)	9	(75)
	Guz nieoperacyjny/ *Unresectable tumor*	5	(71)	2	(29)

CR – całkowita remisja, *CR- complete remission*

Częściowa trisomia 17q

Charakterystykę kliniczną chorych w zależności od obecności częściowej trisomii 17q w komorkach guza przedstawiają tabele 40 a i b. Nie stwierdzono zależności klinicznych wskaźników prognostycznych od obecności częściowej trisomii 17q w komórkach Nb. Wśród cech klinicznych zauważono jedynie

występowanie tej aberracji częściej (18/32=56%) w guzach pierwotnie zlokalizowanych w nadnerczach niż w guzach o innej lokalizacji. Nie wykazano zależności parametrów biochemicznych od obecności tej aberracji chromosomalnej w guzie.

Tab.40a.Charakterystyka kliniczna chorych z guzami Nb różniącymi się obecnością częściowej trisomii 17q w komórkach Nb.

Tab.40a.Clinical characteristic of patients with Nb tumor differing in presence of 17q gain in tumor cells.

Cechy kliniczne/ *Clinical characteristic*		Dodatkowy materiał chromosomalny w 17q / *17 q gain* (% guzów badanych/*% of analyzed tumors*)			
		Obecny/ *Present*		Nieobecny/ *Absent*	
Wiek *Age*	< 1 roku/ < *1 year old*	15	(55)	12	(45)
	≥ 1 roku/ ≥ *1 year old*	15	(43)	20	(57)
Stadium Stage	I	2	(40)	3	(60)
	II	6	(67)	3	(33)
	III	4	(33)	8	(67)
	IV	15	(48)	16	(52)
	Ivs	3	(60)	2	(40)
Lokalizacja ogniska pierwotnego/ *Primary tumor localisation*	Nadnercza *Adrenal glands*	18	(56)	14	(44)
	Okolica zaotrzewnowa *Retroperitoneum*	8	(38)	13	(62)
	Śródpiersie/ *Mediastinum*	4	(57)	3	(43)
	Nieznana/ *Unknown*	0	(0)	2	(100)
Wielkość guza/ *Tumor maximal diameter*	< 5 cm	9	(43)	12	(57)
	5-10 cm	13	(59)	9	(41)
	> 10 cm	8	(42)	11	(58)
Przerzuty do kości w IV^0 *Bone metastases in IVs*	Obecne/ *Present*	8	(40)	12	(60)
	Nieobecne/ *Absent*	7	(70)	3	(30)
Radykalność operacyjna *Surgery*	Radykalny/CR bez zabiegu/ *Complete resection or CR without surgery*	19	(54)	16	(46)
	Nieradykalny *Uncomplete resection*	5	(45)	6	(55)
	Guz nieoperacyjny *Unresectable tumor*	4	(44)	5	(56)

CR- całkowita remisja/ *CR – complete remission*

Tab.40b. Wartości parametrów biochemicznych u chorych z guzami Nb różniącymi się obecnością częściowej trisomii 17q w komórkach Nb.
Tab.40b. Biochemical findings in patients with Nb tumor differing in presence of partial trisomy17q in tumor cells.

Parametry biochemiczne *Biochemical parameters*		Częściowa trisomia 17q/ *17 q gain* (% guzów badanych/ *% of analyzed tumors*)			
		Obecna/ *Present*		Nieobecna/ *Absent*	
LDH w surowicy *Serum LDH*	N	9	(45)	11	(55)
	> 1x N< 2xN	13	(62)	8	(38)
	≥2x N	9	(38)	13	(62)
Ferrytyna w surowicy *Serum ferritin*	< 142 ng/ml	9	(45)	11	(55)
	≥ 142 ng/ml	11	(50)	11	(50)

N = stężenie LDH prawidłowe, > 1xN i < 2xN = stężenie LDH powyżej normy i poniżej 2x norma, ≥2N = stężenie LDH przekraczające dwukrotny poziom normy/
N = normal level of LDH, >1xN <2xN = serum LDH above normal level and below 2x normal level, ≥ 2xN = above 2x normal level

Charakterystyka kliniczna chorych z Nb o różnej ploidii DNA

Ploidię oceniano w komórkach Nb pobranych od 25 chorych przed rozpoczęciem leczenia i od 23 chorych po zastosowaniu chemioterapii (tab. 41).

Tab. 41. Częstości występowania poszczególnych typów ploidii DNA w guzach Nb.
Tab. 41. Frequency of the different types of DNA ploidy in Nb tumors.

Typ plodii *Type of ploidy*	Liczba guzów/ *Number of cases*	
	przed CHT/ *before CHT*	po CHT/ *after CHT*
Di-/tetraploidia/ *Di-tetraploidy* (32 guz/ *32 tumors*)	15	17
Triploidia/ *triploidy* (8 guzów/ *8 tumors*)	6	2
Hipodiploidia/ *hypodiploidy* (8 guzów/ *8 tumors*)	4	4

CHT- chemioterapia/ *CHT – chemotherapy*

Charakterystykę kliniczną chorych w odniesieniu do typu ploidii komórek Nb przedstawiają tabele 42 a i b. **Okołodi- i tetraploidia występowała częściej w guzach zaawansowanych klinicznie (III i IV stadium), guzach większych > 5cm i z podwyższonymi wartościami LDH w surowicy i VMA w moczu. Triploidia częściej występowała w guzach niemowlęcych niż w guzach u chorych powyżej 1 roku życia (28 vs 8%) i najczęściej była stwierdzana w guzach małych < 5 cm średnicy**. Hipodiploidia częściej związana była z guzami > 1 roku życia w rozsianym stadium choroby. Spośród siedmiu guzów

zlokalizowanych w śródpiersiu w trzech występowała hipodiploidia. Guzy z tym typem ploidii w większości usunięto radykalnie (6/7 guzów). Większość guzów, które nie zostały usunięte radykalnie, prezentowała di- lub tetraploidię (80% guzów usuniętych częściowo i 80% guzów nieoperacyjnych).

Tab.42a. Charakterystyka kliniczna chorych z guzami Nb różniącymi się typem ploidii DNA.

Tab.42a. Clinical characteristics of patients with Nb tumor differing in the type of DNA ploidy.

Cechy kliniczne *Clinical characteristics*		Liczba guzów z typem ploidii / *Number of tumors with particular type of ploidy* (%)					
		Di-/tetraploidia/ *Di-tetraploidy*		Triploidia/ *Triploidy*		Hipodiploidia/ *Hypodiploidy*	
Wiek *Age*	<1 roku/ *< 1 year old*	11	(61)	5	(28)	2	(11)
	> 1 roku/ *> 1 year old*	18	(69)	2	(8)	6	(23)
Stadium *Stage*	I	0	(0)	2	(100)	0	(0)
	II	5	(63)	1	(12)	2	(25)
	III	8	(80)	1	(10)	1	(10)
	IV	16	(64)	5	(20)	4	(16)
	IVs	1	(33,3)	1	(33,3)	1	(33,3)
Lokalizacja ogniska pierwotnego *Primary tumor localisation*	Nadnercze *Adrenal glands*	15	(71)	4	(19)	2	(10)
	Okolica zaotrzewnowa *Retroperitonal region*	13	(72)	4	(22)	1	(6)
	Śródpiersie *Mediastinum*	3	(43)	1	(14)	3	(43)
Wielkość ogniska pierwotnego *Primary tumor maxiaml diameter*	< 5 cm	8	(50)	4	(25)	4	(25)
	5-10 cm	17	(89)	2	(11)	0	(0)
	> 10 cm	8	(62)	2	(15)	3	(23)
Przerzuty do kości w IV^0 *Bone metastases in IVs*	Obecne/ *Present*	8	(57)	4	(29)	2	(14)
	Nieobecne/ *Absent*	2	(67)	1	(33)	0	(0)
Zabieg operacyjny *Surgery*	Radykalny lub CR bez zabiegu *Complete resection or CR without surgery*	20	(61)	7	(21)	6	(18)
	Nieradykalny *Uncomplete resection*	8	(89)	0	(0)	1	(11)
	Guz nieoperacyjny *Unresectable tumor*	4	(80)	1	(20)	0	(0)

CR – całkowita remisja/ CR – complete remission

Tab.42b.Wartości parametrów biochemicznych u chorych z guzami Nb różniącymi się stopniem ploidii DNA.

Tab.42b.Biochemical findings in patients with Nb tumor differing in a degree of DNA ploidy.

Parametry biochemiczne *Biochemical parameters*		Liczba guzów/ *Number of cases* (%)					
		Di-/tetraploidia *Di-tetraploidy*		Triploidia *Triploidy*		Hipodiploidia *Hypodiploidy*	
LDH w surowicy *Serum LDH*	N	9	(60)	4	(27)	2	(13)
	> 1x N< 2xN	10	(71)	1	(7)	3	(22)
	≥2x N	16	(84)	2	(11)	1	(5)
VMA w moczu *Urinary VMA*	N	8	(53)	4	(27)	3	(20)
	> 1x N< 2xN	5	(83)	1	(17)	0	(0)
	≥2x N	18	(72)	3	(12)	4	(16)
Ferrytyna w surowicy *Serum ferritin*	≤ 142 ng/ml	12	(71)	4	(24)	1	(5)
	> 142 ng/ml	11	(69)	4	(25)	1	(6)

N = stężenie LDH lub ilość VMA prawidłowa, > 1 x N = stężenie LDH lub ilość VMA powyżej normy i poniżej 2x norma; ≥ 2x norma = stężenie LDH lub ilość VMA przekraczająca dwukrotny poziom normy

N = serum LDH or urinary VMA in normal range, > =1xN = serum LDH or urinary VMA above normal limit but below 2 x normal limit; ≥2N = serum LDH or urinary VMA equal or above 2 x normal limit

Występowanie aberracji chromosomalnych w klinicznych grupach ryzyka

Częstość występowania dwóch badanych aberracji chromosomalnych del(1p) i częściowej trisomii 17q w grupach pacjentów będących w poszczególnych klinicznych grupach ryzyka w grupie guzów Nb ocenianych przed chemioterapią przedstawiono w tab. 43. Jak opisano we wstępie jednym z elementów klasyfikacji do odpowiedniej grupy ryzyka jest obecność amp *NMYC*.

Tab. 43. Obecność aberracji chromosomalnych del(1p) i częściowej trisomii 17q w komórkach guzów Nb u pacjentów podzielonych wg grup ryzyka.

Tab. 43. Presence of chromosome aberrations: del(1q) and 17q gain in Nb tumor cells from different prognostic groups of patients.

Grupa ryzyka *Risk group*	del(1p)/ del(1p) (%)				Częściowa trisomia 17q / 17 q gain (%)			
	Obecna/ *Present*		Nieobecna/ *Absent*		Obecna/ *Present*		Nieobecna/ *Absent*	
Niskiego / *Low*	14	(70)	6	(30)	12	(54)	10	(46)
Pośredniego/ *Intermediate*	7	(50)	7	(50)	4	(33,3)	8	(66,6)
Wysokiego/ *High*	14	(47)	16	(53)	16	(51)	15	(49)

Nie stwierdzono zwiększonej częstości występowania badanych aberracji chromosomalnych w grupach wyższego ryzyka w porównaniu z grupą niskiego ryzyka.

Wyniki leczenia w odniesieniu do prognostycznych wskaźników genetycznych

Obecność amp NMYC

Średnie przeżycie 17/68 (25%) pacjentów od momentu diagnozy (OS) w grupie z amp *NMYC* było niezamiennie krótsze i wynosiło 30 miesięcy niż w grupie 51/68 (75%) chorych bez amp *NMYC* ze średnim przeżyciem 33 miesiące. W czasie prowadzonej obserwacji (średnio 2 lata 4 miesiące) stwierdzono gorszą odpowiedź na stosowane leczenie w grupie z amp *NMYC*, gdzie całkowitą remisję uzyskało 35%, w porównaniu z grupą bez amp *NMYC*, gdzie całkowitą remisję uzyskało 63% pacjentów (tab. 44).

Tab. 44. Wyniki leczenia pacjentów w zależności od liczby kopii onkogenu *NMYC* stwierdzonych w komórkach guzów Nb.

Tab. 44. Results of treatment of the patients with different number of MYCN copies in Nb tumor cells.

Odpowiedź na leczenie *Treatment response*	*NMYC* (%)		
	2 kopie/ *2 copies* (49 chorych/ *patients*)	2-10 kopii/ *2-10 copies* (7 chorych/ *patients*)	>10 kopii/ > *10 copies* (23 chorych/ *patients*)
CR	31 (63)	6 (86)	8 (35)
PR	4 (8)	0 (0)	7 (30)
DOD	14 (29)	1 (14)	8 (35)

CR = całkowita remisja, PR= częściowa remisja, DOD = zgon

CR= complete remission, PR = partial remission, DOD = death of disease

Obecność del(1p) i częściowej trisomii 17q

Nie zaobserwowano zależności odpowiedzi na leczenie od obecności del(1p) i częściowej trisomii 17q (tab. 45). Całkowitą remisję choroby nowotworowej uzyskano z porównywalną częstością.

Tab. 45. Wyniki dotychczasowego leczenia pacjentów w zależności od obecności aberracji chromosomalnych: del(1p) i częściowej trisomii 17q w komórkach guzów Nb.
Tab. 45. Treatment results depending on the presence of the chromosome aberrations: del(1p) and 17q gain in Nb cells.

Wynik leczenia *Treatment result*	del (1p)/ *del(1p)* (%)		Częściowa trisomia 17q/ *17 q gain* (%)	
	Obecna/ *Present* (32 chorych/ *patients*)	Nieobecna/ *Absent* (33 chorych/ *patients*)	Obecna/ *Present* (30 chorych/ *patients*)	Nieobecna/ *Absent* (28 chorych/ *patients*)
CR	20 (62)	19 (57)	21 (70)	16 (57)
PR	6 (19)	2 (7)	0 (0)	1 (4)
DOD	6 (19)	12 (36)	9 (30)	11 (39)

CR = całkowita remisja, PR = częściowa remisja, DOD = zgon
CR= complete remission, PR = partial remission, DOD = death of disease

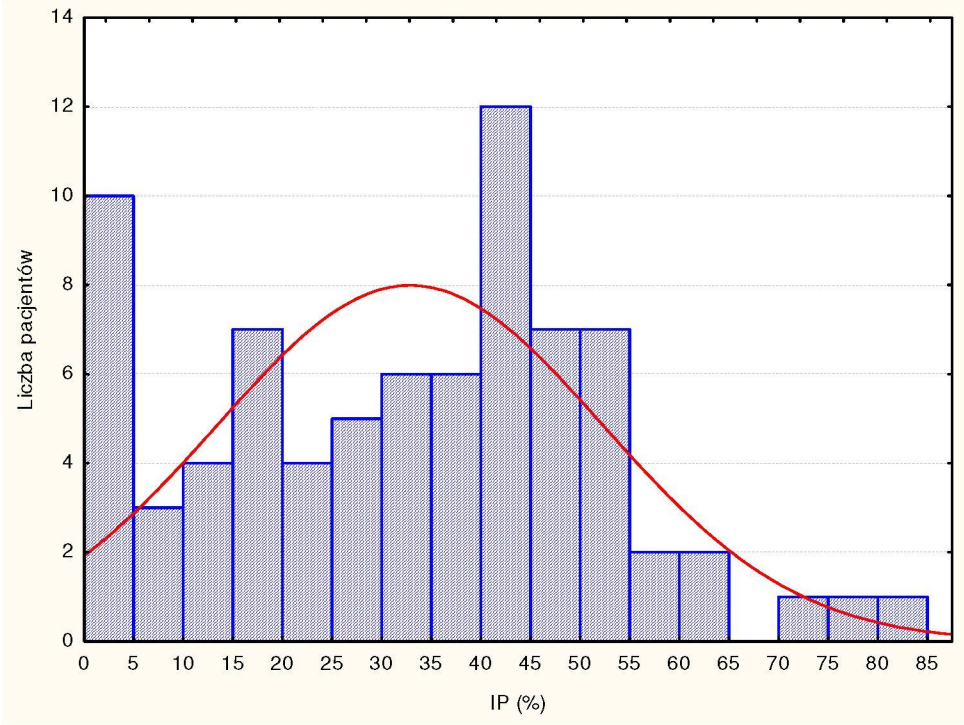
4.3.4. Podsumowanie

W badanym materiale tkanek guzów Nb stwierdzono obecność amp *NMYC* w 28%, del(1p) w 48% i częściowej trisomii 17q w 48% guzów. W 10 guzach nie wykazano żadnej z trzech badanych nieprawidłowości cytogenetycznych, a w dwóch guzach współwystępowanie wszystkich trzech anomalii. Przeważały guzy diploidalne lub tetraploidalne (32/48). Chorzy, u których rozwijały się guzy z obecnością amp *NMYC* demonstrowali niekorzystne prognostycznie cechy kliniczne Nb i nieco krótszy czas przeżycia (30 mies. vs 33 mies). Natomiast nie zaobserwowano korelacji del(1p) i częściowej trisomii 17 q z analizowanymi cechami klinicznymi.

4.4. BADANIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE

4.4.1. Aktywność proliferacyjna w tkankach guzów Nb

Aktywność proliferacyjną określaną jako indeks proliferacyjny (IP) oceniono przy pomocy odczynów immunohistochemicznych z zastosowaniem przeciwciał przeciw Ki-67 w 78 guzach. Wartości IP w tkankach Nb były zróżnicowane i wynosiły od 1,5-79,5% (średnio 32,9%+/-19,5 [SD], mediana 35,2%) wybarwionych komórek. Rozkład wartości IP różnił się statystycznie istotnie od rozkładu normalnego (p=0,02) (ryc. 6).



Ryc. 6. Rozkład wartości indeksu proliferacyjnego w analizowanej grupie78 guzów Nb.
Fig. 6. Distribution of a proliferative index in the analyzed group of 78 Nb tumors.

Aktywność proliferacyjną guzów podzielono wg wartości IP na: niską, gdy IP < 20% komórek immunopozytywnych; średnią, gdy IP = 20-40% komórek immunopozytywnych i wysoką, gdy IP > 40% komórek immunopozytywnych. Częstość występowania poszczególnych zakresów wartości IP (niskiej, średniej i wysokiej) przedstawia tabela 46. Przeważały guzy o wysokim indeksie proliferacyjnym (58% guzów).

Tab. 46. Częstość występowania poszczególnych zakresów wartości IP.
Tab. 46. Frequency of the different ranges of PI.

Zakres wartości IP/ *PI range*			Liczba guzów/ *Number of tumors*	%
Niski/	*Low*	(< 20%)	13	16
Średni/	*Intermediate*	(20-40%)	20	26
Wysoki/	*High*	(>40%)	45	58

Średnie wartości IP w guzach badanych przed chemioterapią nie różniły się statystycznie od wartości IP w guzach badanych po przeprowadzonej chemioterapii (p=0,58) (tab. 47).

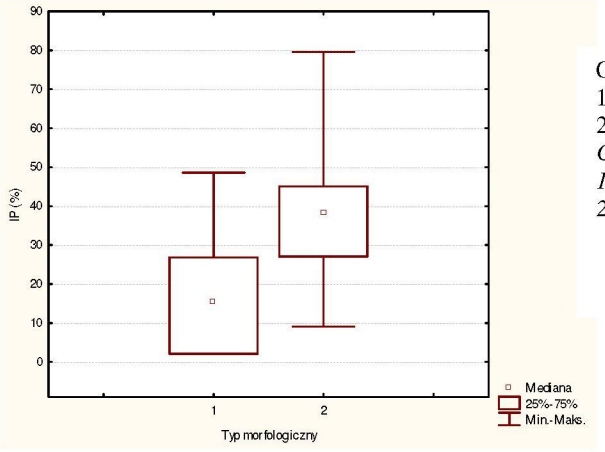
Tab. 47. Średnie wartości IP w zależności od wcześniej stosowanej chemioterapii.
Tab. 47. Mean values of PI in the groups of patients after different chemotherapy.

Grupa guzów *Group of tumors*	Liczba guzów *Number of cases*	Wartość IP/ PI values (%)				
		Średnia *Mean value*	Mediana *Median value*	Minimum *Minimum value*	Maksimum *Maximum value*	SD
przed CHT *before CHT*	41	34,4	35,6	2,0	79,6	16,5
po CHT *after CHT*	37	31,0	34,0	1,5	78,1	22,4

CHT = chemioterapia; SD = odchylenie standardowe
CHT =chemotherapy, SD = standard deviation

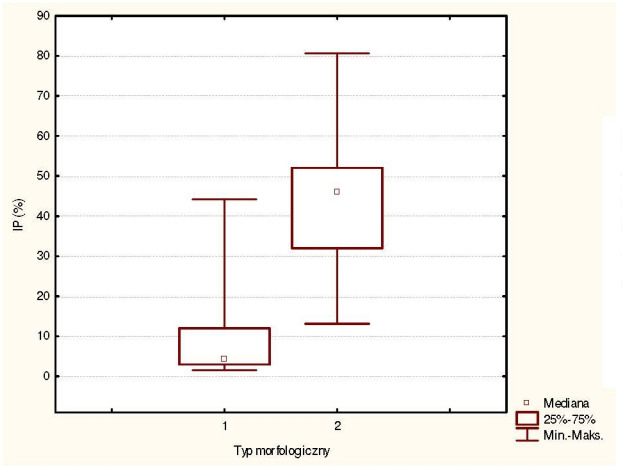
Aktywność proliferacyjna guzów w różnych typach histologicznych Nb

Guzy o niskim zróżnicowaniu, skąpopodścieliskowe wykazywały wyższą aktywność proliferacyjną. **Stwierdzono statystyczną różnicę wartości średniego IP pomiędzy guzami o skąpym podścielisku, a guzami o bogatym podścielisku zarówno w grupie badanych przed chemioterapią** (p=0,01; ryc. 7a) jak i po chemioterapii (p<0,001; ryc. 7b). W grupie tkanek Nb badanych przed chemioterapią różnice pomiędzy średnimi wartościami IP w poszczególnych typach histologicznych były nieznamienne (p=0,29, ryc. 7c). **W grupie Nb badanych po chemioterapii obserwowano statystycznie istotną różnicę (p=0,02) z najwyższymi średnimi wartościami IP w guzach typu UN i POO** (ryc. 7d).



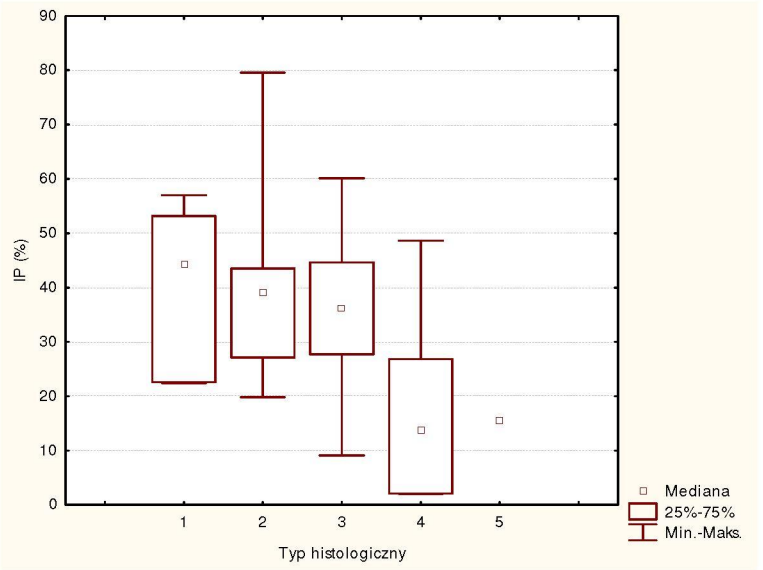
CHT- chemioterapia;
1-guzy bogatopodścieliskowe,
2- guzy skąpopodścieliskowe
CHT – chemotherapy,
1- stroma rich- tumors,
2- stroma-poor tumors

Ryc.7a. Wartości IP w guzach bogato- i skąpopodścieliskowych badanych przed CHT.
Fig. 7a. Values of PI in stroma – rich and stroma- poor tumors examined before chemotherapy.



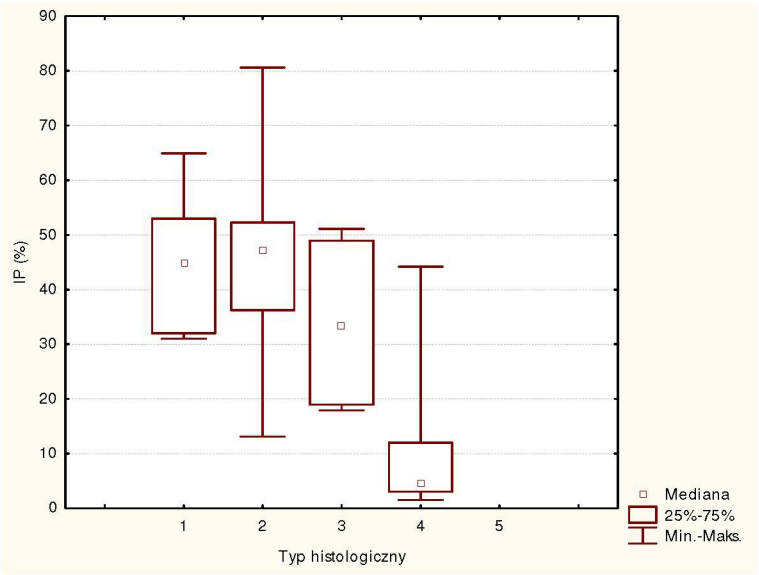
CHT- chemioterapia;
1-guzy bogatopodścieliskowe,
2- guzy skąpopodścieliskowe
CHT – chemotherapy,
1- stroma rich- tumors,
2- stroma-poor tumors

Ryc.7b. Wartości IP w guzach bogato- i skąpopodścieliskowych badanych po CHT.
Fig. 7b. Values of PI in stroma – rich and stroma- poor tumors examined after chemotherapy.



1 = typ niezróżnicowany, 2 = typ niskozróżnicowany, 3 = typ różnicujący się,
4 = nerwiak zwojowokomórkowy, 5 = zwojakonerwiak
1 = undifferentiated, 2 = poorly differentiated, 3 = differentiating, 4 = ganglioneuroblastoma, 5 = ganglioneuroma

Ryc. 7c. Zależność IP od typu histologicznego Nb w grupie ocenianej po chemioterapii.
Fig. 7c. Relation of PI and a histological type of Nb assessed after chemotherapy.



1 = typ niezróżnicowany, 2 = typ niskozróżnicowany, 3 = typ różnicujący się, 4 = nerwiak zwojowokomórkowy

1 = undifferentiated, 2 = poorly differentiated, 3 = differentiating, 4 = ganglioneuroblastoma, 5 = ganglioneuroma

Ryc. 7d. Zależność IP od typu histologicznego Nb w grupie ocenianej przed chemioterapią.
Fig. 7d. Relation between PI and histological type of Nb assessed before chemotherapy.

Charakterystyka kliniczna chorych z guzami Nb o różnej aktywności proliferacyjnej tkanki nowotworowej

Charakterystykę kliniczną Nb w odniesieniu do aktywności proliferacyjnej tkanki nowotworowej mierzonej IP przedstawia tab. 48.

Zaobserwowano tendencję do malejących wartości IP wraz z wiekiem pacjenta w momencie rozpoznania; zależność ta pozostawała na granicy znamienności statystycznej (Rs=-0,18; p=0,10; ryc. 8). IP tkanek Nb rozwijających się u pacjentów w pierwszym roku życia był wyższy niż IP w wieku > pierwszego roku życia (mediana: 35% vs 29,2%) z różnicą na granicy znamienności statystycznej (p=0,10). Nieznamiennie wyższą wartość IP=35,9% i 36,3% stwierdzono w tkankach Nb pobranych od chorych o niskim stadium zaawansowania (I^o i II^o). Były to głównie guzy rozpoznane u niemowląt. **Wysoką aktywność proliferacyjną tkanek z wartością mediana IP=38,4% stwierdzono w tkankach guzów pobranych od pacjentów w IV stadium klinicznego zaawansowania choroby.**

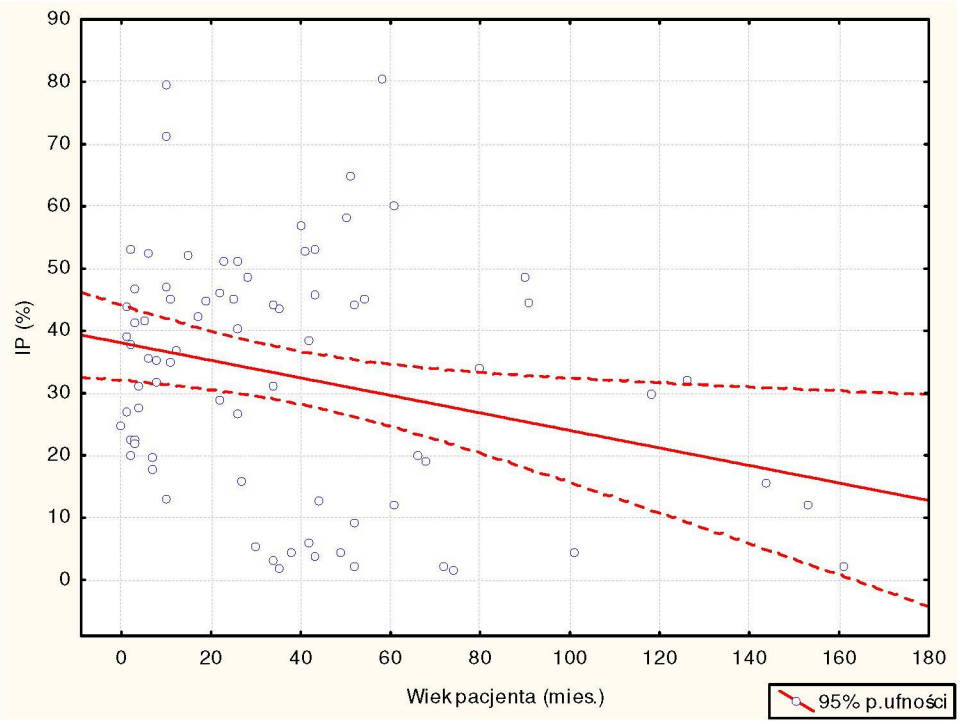
Tab. 48. Charakterystyka kliniczna pacjentów w odniesieniu do IP guzów Nb.
Tab. 48. Clinical characteristic of patients in relation to PI in Nb tumors.

Parametry kliniczne *Clinical data*	Liczba badanych guzów *Number of cases*	Mediana IP *Median PI* (%)	Wartość P *P-value*
Wiek/ *Age*: <1 roku/ < *1 year old*	27	35,0	0,10
≥1 roku/ ≥ *1 year old*	51	29,2	
Stadium zaawansowania/ *Stage*: I	3	35,9	
II	7	36,3	
III	26	36,8	0,67
IV	27	38,4	
IVs	15	32,3	
Lokalizacja ogniska pierwotnego/ *Primary tumor localisation*:			
nadnercze/ *adrenal glands*	44	29,1	0,13
okolica zaotrzewnowa/ *retroperitoneum*	24	35,5	
śródpiersie/ *mediastinum*	7	40,2	
Wielkość ogniska pierwotnego/ *Primary tumor maximal diameter*:			
< 5 cm	22	28,5	0,08
5-10 cm	33	34,2	
>10 cm	23	42,8	
W IV stadium przerzuty do kości/ *Bone metastases in IV s*:			
obecne/ *present*	25	39,1	0,36
nieobecne/ *absent*	16	33,7	
LDH w surowicy/ *Serum LDH*:			
N	18	28,6	0,11
>1xN i < 2x N	29	30,1	
≥ 2x N	30	38,1	
Ferrytyna w surowicy/ *Serum ferritin*:			
< 142 ng/ml	32	33,6	0,22
>142 ng/ml	30	28,3	
VMA w moczu/ *Urinary VMA*:			
N	18	32,0	0,58
>1x N i< 2x N	14	39,5	
≥ 2xN	42	30,7	

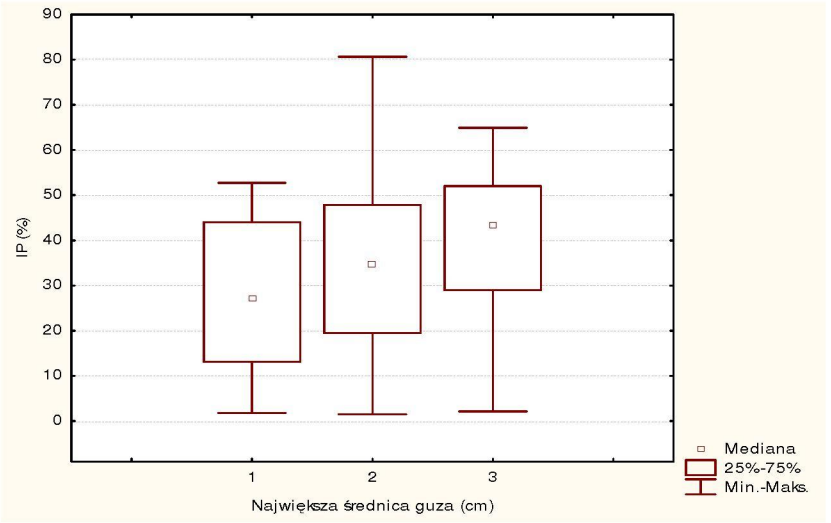
N = norma, > 1x N = wartość powyżej normy i poniżej 2x norma, ≥ 2xN = wartość równa lub przekraczająca dwukrotny poziom normy
N = normal range, >1xN = values above normal level but below 2xnormal level, ≥2xN = value equal or above 2x normal level

Różnica w aktywności proliferacyjnej w zależności od stadium zaawansowania klinicznego nie była statystycznie znamienna (p=0,67). Wśród guzów Nb z przerzutami, te, które pochodziły od chorych z obecnością przerzutów do kości charakteryzowały się nieznamiennie wyższą aktywność proliferacyjną niż guzy

pobrane od pacjentów z przerzutami pozakostnymi (mediana IP=39,1% vs 33,7%; p=0,36). Wyższą aktywność proliferacyjną stwierdzono w guzach rozwijających się w śródpiersiu niż w jamie brzusznej (mediana IP= 40,2% vs 35,5% i 29,1%). Nieznamiennie wyższe wartości IP (mediana IP=42,8%) stwierdzono w guzach o wielkości >10 cm w porównaniu z guzami mniejszymi (ryc. 9). Zaobserwowano tendencję (p=0,11) do dodatniej zależności aktywności proliferacyjnej guzów i podwyższonego stężenia LDH w surowicy krwi. Guzy z najwyższą wartością IP=38,1 % rozwijały się u pacjentów z poziomem LDH w surowicy dwukrotnie przekraczającym normę. Zaobserwowano statystycznie istotną różnicę (p=0,01) z niższym IP = 28% w guzach radykalnie usuniętych w porównaniu z wyższymi wartościami IP w przypadku guzów pierwotnych ocenianych jako nieoperacyjne lub usuniętymi nieradykalnie (ryc. 10).

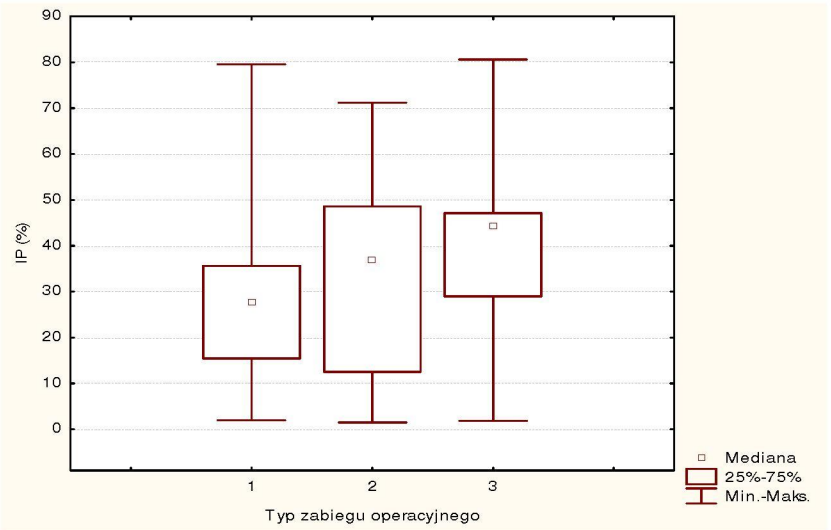


Ryc. 8. Indeks proliferacyjny (IP) w zależności od wieku pacjenta.
Fig. 8. PI vs. age of the patients.



1-największy wymiar < 5 cm, 2- największy wymiar 5-10 cm, 3-największy wymiar >10 cm
1 = maximal diameter - <5 cm, 2 = maximal diameter between 5-10 cm, 3 = maximal diameter>10 cm

Ryc. 9. Indeks proliferacyjny (IP) w Nb o różnej wielkości guza pierwotnego (p=0,08).
Fig. 9. PI in Nb tumors differing in maximal diameter (p=0.08).



1-zabieg radykalny; 2-zabieg nieradykalny; 3-guz nieoperacyjny
1-complete resection, 2-uncomplete resection, 3 - unresectable tumor

Ryc.10. Wartości IP w tkankach guza pierwotnego Nb a typ zabiegu operacyjnego (p=0,01).
Fig. 10. PI values in primary tumor tissues vs. the type of surgery (p=0,01).

Odpowiedź na leczenie chorych z Nb o różnej gęstości unaczynienia

Wśród chorych z guzami o wyższym (>20%) indeksie proliferacyjnym częściej stwierdzano niekorzystny przebieg leczenia (30% i 31% zgonów) niż u chorych z guzami o niskim indeksie proliferacyjnym (23% zgonów) (tab.49).

Tab. 49. Odpowiedź na leczenie chorych z Nb o różnym indeksie proliferacyjnym.
Tab. 49. Treatment response in patients with different PI in Nb tumors.

Efekt leczenia *Treatment result*	Indeks proliferacyjny/ *Proliverative index*					
	Niski/ *Low*: ≤20%		Średni/ *Medium*: 20-40%		Wysoki/ *High*: >40%	
CR	8	(61%)	12	(60%)	26	(56%)
PR	2	(15%)	2	(10%)	6	(13%)
DOD	3	(23%)	6	(30%)	14	(31%)

CR = całkowita remisja, PR = częściowa remisja, DOD = zgon
CR = complete remission, PR = partial remission, DOD = death of disease

Markery genetyczne a aktywność proliferacyjna tkanki nowotworowej Nb

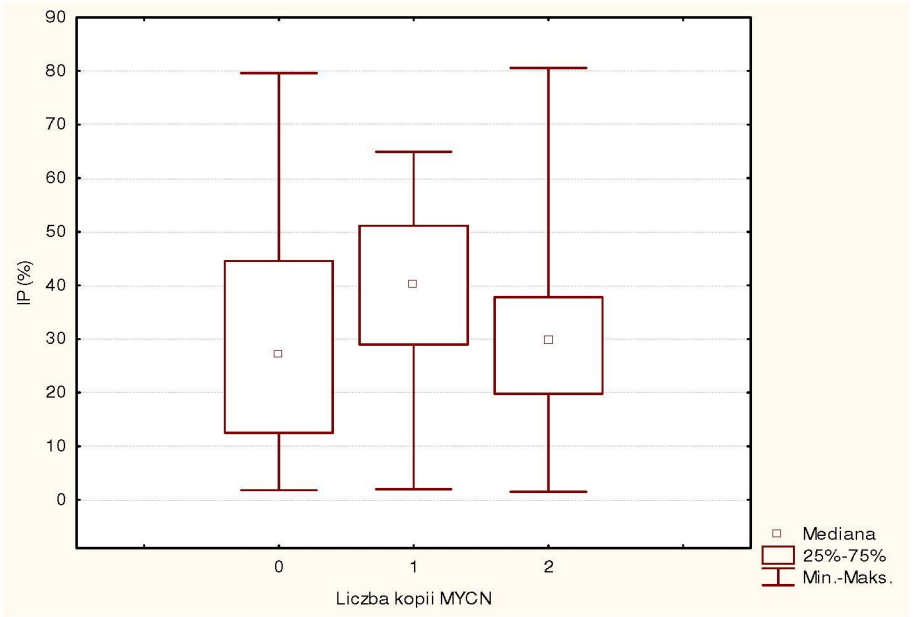
W guzach z obecnością charakterystycznych genetycznych markerów agresywności stwierdzano cechy większej aktywności proliferacyjnej w porównaniu do nowotworów, w których nie stwierdzano obecności tych markerów (tab. 50).

Najwyższy IP=37,5% znaleziono w guzach z obecnością amp *NMYC*. Aktywność proliferacyjna guzów bez amplifikacji była nieznamiennie niższa (mediana IP=27,9%; p=0,36) (ryc. 11). Wartości IP w guzach z obecnością del(1p) oraz niepełnej trisomii 17q były nieznamiennie wyższe niż bez tej aberracji (dla del(1p) - p=0,48; dla częściowej trisomii 17q - p=0,67) (ryc. 12 i 13).

Analiza zależności aktywności proliferacyjnej od typu ploidii komórkowej wykazała najniższą aktywność proliferacyjną (IP=23,5%) guzów triploidalnych (tab. 50; ryc. 14).

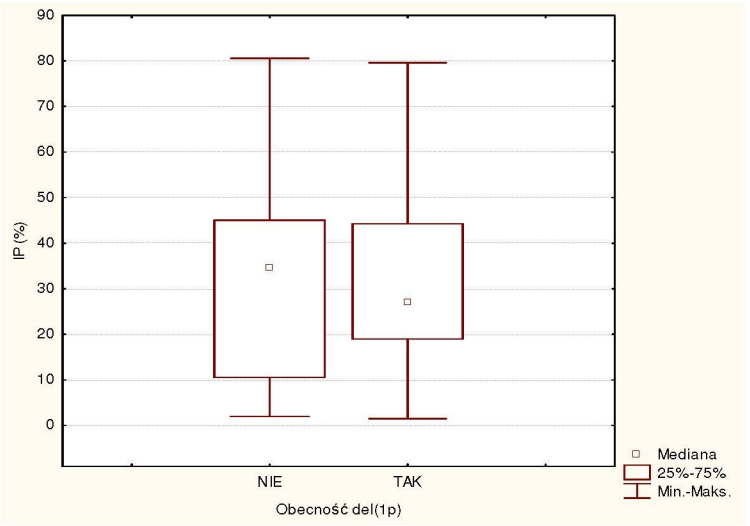
Tab.50. Markery genetyczne Nb a aktywność proliferacyjna tkanki nowotworowej Nb.
Tab. 50. Genetic markers in Nb vs. PI values in Nb tumors.

Markery genetyczne *Genetic markers*	Liczba badanych guzów *Number of tumors*	Mediana IP *Median value of PI*	Wartość P *P- value*
amp *NMYC/ MYCN amp* nieobecna / *absent* obecna / *present*	 46 21	 27,9 37,5	0,36
del(1p)/ *del(1p)* nieobecna/ *absent* obecna / *present*	 24 25	 29,0 31,6	0,48
częściowa trisomia chromosomu 17q/ *17q gain* nieobecna/ *absent* obecna / *present*	 24 25	 30,3 33,6	0,67
Ploidia/ *Ploidy* di/tetraploidia/ *di/tetraploidy* triploidia/ *triploidy* hipodiploidia/ *hypoploidy*	 18/5 5 5	 31,9 / 40,1 23,5 33,9	0,35



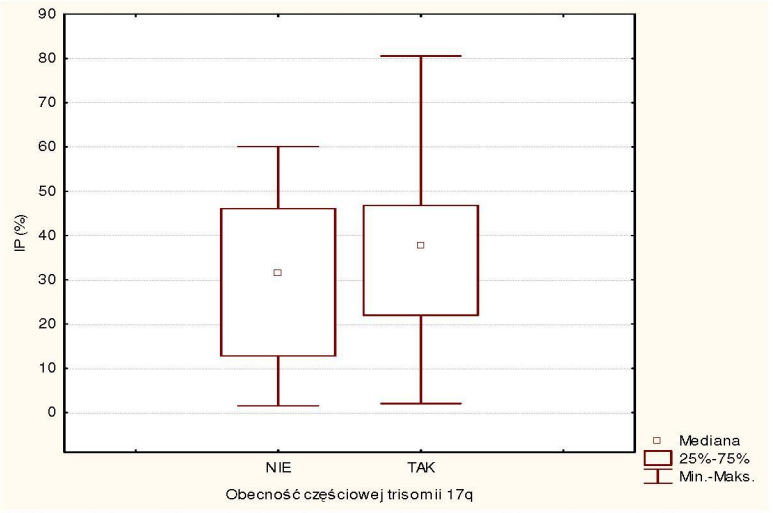
0= 2 kopie *NMYC* =2; 1 = ≥ 2 i <10 kopii; 2 = ≥ 10 kopii *NMYC*
0 =2 copies of MYCN: 2, 1= ≥ 2 copies and < 10 copies of MYCN, 2 = ≥10 copies of MYCN

Ryc. 11. Wartości IP tkanki nowotworowej w odniesieniu do liczby kopii *NMYC* w komórkach Nb (p =0,36).
Fig. 11. PI values in tumor tissue vs.number of MYCN copies in Nb cells (p=0,36).



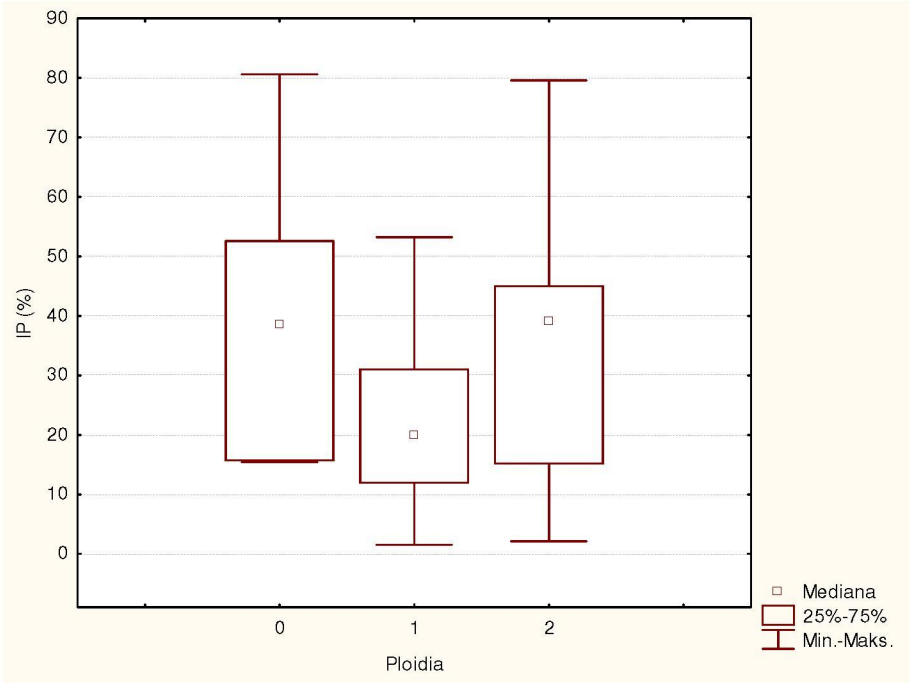
NIE - del (1p) nieobecna; TAK - del(1p) obecna
NIE – del(1p) was not detected, TAK – del(1p) was detected

Ryc.12. Wartości IP tkanki nowotworowej w odniesieniu do obecności del(1p) w komórkach Nb (p=0,48).
Fig. 12. PI values in Nb tissue vs. presence of deletion: del(1p) in Nb cells (p=0,48).



NIE -częściowa trisomia 17q nieobecna; TAK - częściowa trisomia 17q obecna
NIE- 17q gain was not detected, TAK – 17q gain was detected

Ryc. 13. Wartości IP tkanki nowotworowej w odniesieniu do obecności częściowej trisomii 17q w komórkach Nb (p=0,67).
Fig. 13. PI values in tumor tissue vs. presence of 17q gain in Nb cells (p=0,67).

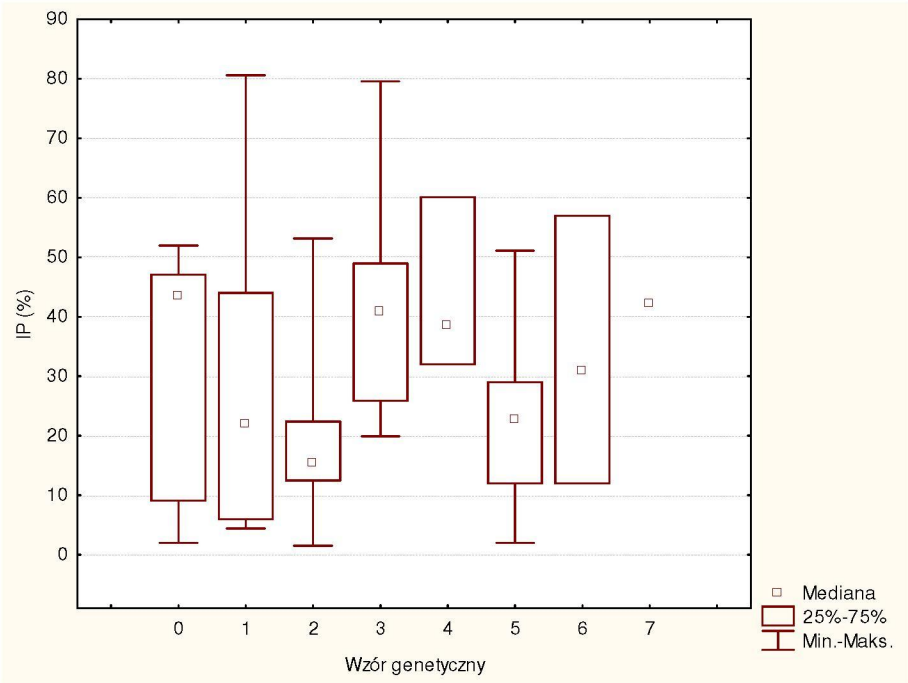


0-hipodiploidia; 1-okołotriploidia; 2- około di-tetraploidia
0- hypoploidy, 1- near-triploidy, 2- near-di/tetreploidy

Ryc. 14. Wartości IP tkanki nowotworowej w odniesieniu do stopnia ploidii w komórkach Nb (p=0,35).
Fig. 14. PI values in tumor tissue vs. degree of ploidy in Nb tumor cells (p=0,35).

Wartości indeksu proliferacyjnego w tkankach Nb o różnej kombinacji parametrów genetycznych

Analiza aktywności proliferacyjnej w zależności od obecności różnych kombinacji badanych markerów genetycznych w komórkach Nb wykazała najwyższe wartości IP (60%) w guzach z obecnością amp *NMYC* jako jedynej spośród trzech badanych aberracji genetycznych. Najniższą aktywność (IP=14%) wykazywały guzy z obecnością del(1p) jako jedynej spośród badanych zmian cytogenetycznych. Różnice wartościach IP dla poszczególnych kombinacji były na granicy znamienności statystycznej (p=0,09) (ryc. 15).



0 = nieobecna żadna z badanych zmian; 1= obecna częściowa trisomia 17q; 2 = obecna del(1p); 3 = obecna del(1p) i częściowa trisomia 17q; 4 = obecna;amp *NMYC*;5= obecna amp *NMYC* i częściowa trisomia 17q; 6 = obecna amp *NMYC* i del (1p); 7 = obecne wszystkie trzy zmiany genetyczne
0 = no changes detected, 1 = 17qgain detected, 2 = del(1p) detected,3 = 17qgain and del(1p) detected, 4 = MYCN amp was detected,5 = MYCN amp and 17q gain were detected, 6 = MYCN amp and del (1p) were detected, 7 = all above mentioned changes were detected

Ryc.15. Wartości IP tkanki nowotworowej w odniesieniu do kombinacji cech genetycznych w Nb (p=0,12).

Fig. 15. PI values in tumor tissue vs. combination of different genetic abnormalities in Nb tumor cells (p=0,12).

4.4.2. Podsumowanie

Różnice w aktywności proliferacyjnej tkanki nowotworowej w guzach przed- i po chemioterapii mierzone IP były nieznamienne. Stwierdzono wysoką aktywność proliferacyjną Nb niskozróżnicowanych i Nb rozwijających się u niemowląt. Wyższe wartości IP stwierdzono badając tkanki Nb w wyższych stadiach zaawansowania klinicznego. U chorych z guzami o wysokiej aktywności proliferacyjnej częściej wykazano podwyższony poziom LDH w surowicy. Zabiegi operacyjne były możliwe do przeprowadzenia częściej w przypadkach guzów o niższej aktywności proliferacyjnej. Gorszą odpowiedź na leczenie zaobserwowano w guzach o IP> 20%. Zaobserwowano wyższe IP w guzach z obecnością amp *NMYC*. Niższy IP stwierdzano w guzach triploidalnych.

4.5. BADANIA WSKAŹNIKÓW ANGIOGENEZY

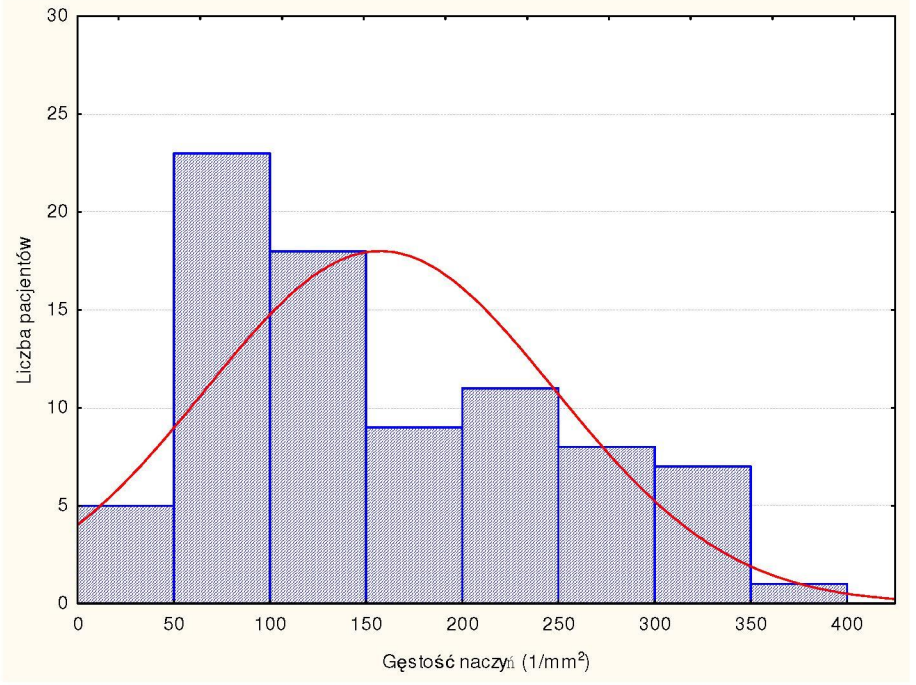
W ocenie aktywności angiogenezy wykonano badania następujących wskaźników:

- gęstość naczyń tkanki nowotworowej (82 guzów);
- ekspresję cytokiny VEGF i jej receptora Flk-1 w tkance nowotworowej (75 guzów);
- poziom cytokin VEGF i bFGF w surowicy krwi pacjentów (38 pacjentów).

4.5.1. Gęstość naczyń

Gęstość naczyń (MVD) oceniono w 82 guzach. Unaczynienie guzów było zróżnicowane. Liczba naczyń wahała się od 32 do 385 naczyń/mm^2 (średnio 157,3±90,9[SD], mediana 137). Obserwowany rozkład różnił się statystycznie istotnie od rozkładu normalnego ($p<0,001$) (ryc. 16).

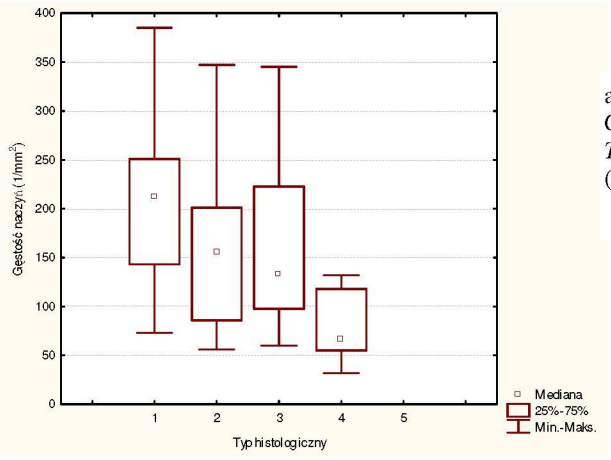
Stopień unaczynienia guzów przed i po chemioterapii był zbliżony (średnio161 naczyń/ mm^2 vs 152 naczynia/ mm^2).



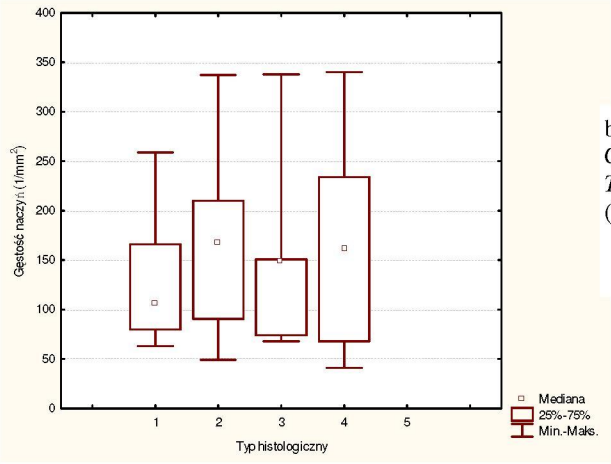
Ryc.16. Rozkład gęstości naczyń w guzach Nb.
Fig. 16. Distribution of vascular density in Nb tumors.

Gęstość naczyń w różnych typach histologicznych Nb

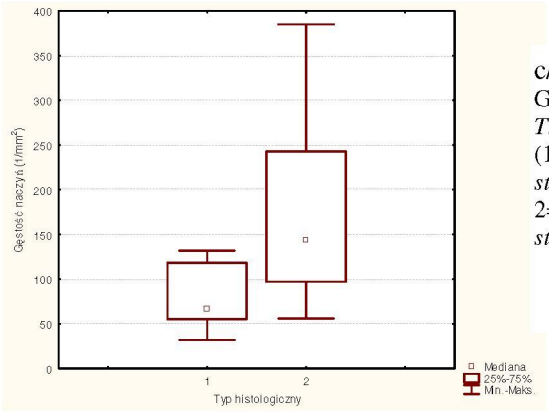
Różnice w gęstości unaczynienia w zależności od typu histologicznego w grupie guzów ocenianych przed chemioterapią pozostawały na granicy istotności statystycznej (p=0,08) (ryc.17a) **i w tej grupie guzów zaobserwowano statystycznie istotną średnio-silną ujemną korelację MVD i stopnia dojrzałości tkanki nowotworowej - z najniższą MVD (mediana = 65 naczyń/mm^2) w przypadku guzów łagodnych tzn. zwojakonerwiaków (Rs= -0,36; p<0,05). Mediana MVD = 146 naczyń/mm^2 guzów o skąpym podścielisku była znamiennie wyższa w stosunku do guzów o podścielisku bogatym** (ryc. 17c). Nie obserwowano statystycznie istotnej (p=0,77) różnicy w MVD w zależności od typu morfologicznego guza w grupie badanej po zastosowaniu chemioterapii (Rs=0,007; p>0,05) ((ryc. 17 b,d).



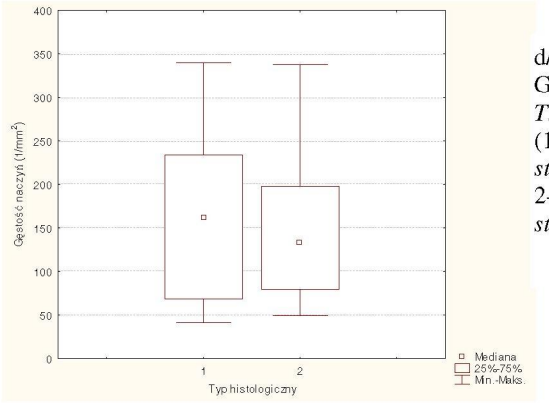
a/
Grupa guzów przed chemioterapią
Tumors evaluated before CHT
(1=UN, 2=POO, 3=DF, 4=GNB)



b/
Grupa guzów po chemioterapii
Tumors evaluated after CHT
(1=UN, 2=POO, 3=DF, 4=GNB)



c/
Grupa guzów przed chemioterapią
Tumors evaluated before CHT
(1=guzy bogatopodścieliskowe/
stroma rich tumors
2=guzy skąpopodścieliskowe/
stroma poor tumors)



d/
Grupa guzów po chemioterapii
Tumors evaluated after CHT
(1- guzy bogatopodścieliskowe/
stroma rich tumors;
2- guzy skąpopodścieliskowe/
stroma poor tumors)

Ryc. 17. Gęstość unaczynienia w zależności od typu morfologicznego Nb.
Fig. 17. Vascular density in different histological types of Nb tumors.

Charakterystyka kliniczna chorych z guzami Nb o różnej gęstości naczyń w tkance nowotworowej

Stwierdzono znamiennie większe unaczynienie guzów rozwijających się u niemowląt niż u dzieci starszych i odwrotną zależność stopnia unaczynienia guza i wieku pacjenta (Rs=-0,22; p<0,05) (tab. 51; ryc. 18). Stwierdzono różnice na granicy znamienności statystycznej (p=0,08) w unaczynieniu małych i dużych ognisk pierwotnych. Gęstość naczyń (mediana MVD=192 naczyń/mm^2) była większa w ogniskach pierwotnych o wymiarach< 5 cm w porównaniu do wielkości ogniska pierwotnego > 5 cm (mediana MVD=149 naczyń/mm^2) (tab. 51). Wykazano też słabą ujemną korelację MVD i wielkości guza (RS=-0,22;

p< 0,05) (ryc. 19). Nieznamiennie wyższy był poziom LDH i zwiększone wydalanie VMA w moczu u chorych z guzami najsłabiej unaczynionymi. Nie zaobserwowano zależności pozostałych badanych cech klinicznych choroby nowotworowej (stadium zaawansowania, obecność przerzutów do kości, możliwość radykalnego zabiegu operacyjnego) od gęstości naczyń występujących w guzie (tab. 51).

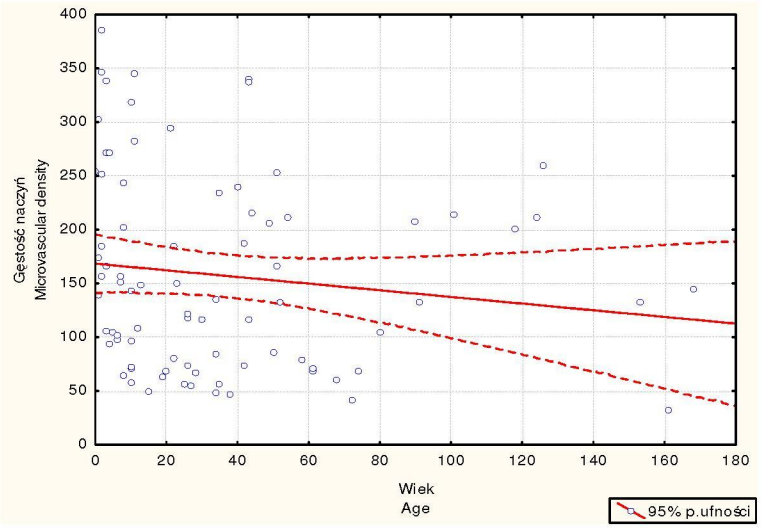
Tab. 51. Cechy kliniczne chorych z guzami Nb o różnej gęstości naczyń w tkance nowotworowej.

Tab. 51. Clinical characteristics of the patients with Nb tumors with different vascular density in tumor tissue.

Parametry kliniczne *Clinical characteristic*	Liczba badanych guzów *Number of examined tumors*	Mediana gęstości naczyń (/mm^2) *Median of vascular density(/mm^2)*	Wartość p *p- value*
Wiek/ *Age*			
< 1 roku/ < *1 year old*	29	174	0,009
≥ 1 roku/ ≥ *1 year old*	53	117	
Stadium zaawansowania/ *Stage* I	4	218	
II	6	213	0,81
III	24	132	
IV	40	132	
IVs	8	161	
W IV stadium przerzuty do kości/ *Bone metastases in IV°:*			
obecne/ *present*	29	133	0,53
nieobecne/ *absent*	30	132	
Największy wymiar guza/ *Tumor maximal diameter*:			
< 5cm	27	156	0,32
5-10 cm	43	132	
>10 cm	12	119	
LDH w surowicy/ *Serum LDH*: N	20	153	
>1xN i < 2x N	29	139	0,23
2x N	32	127	
Ferrytyna w surowicy/ *Serum ferritin*:			
< 142 ng/ml	24	150	0,52
>142 ng/ml	35	139	
VMA w moczu/ *Urinary VMA*: N	21	156	
>1x N i< 2x N	16	166	0,27
≥ 2xN	41	132	
Zabieg operacyjny/ *Surgery*:			
- radykalny/ *complete resection*	46	137	
- nieradykalny/ *uncomplete resection*	16	212	0,95
- guz nieoperacyjny/ *unresectable tumor*	20	101	

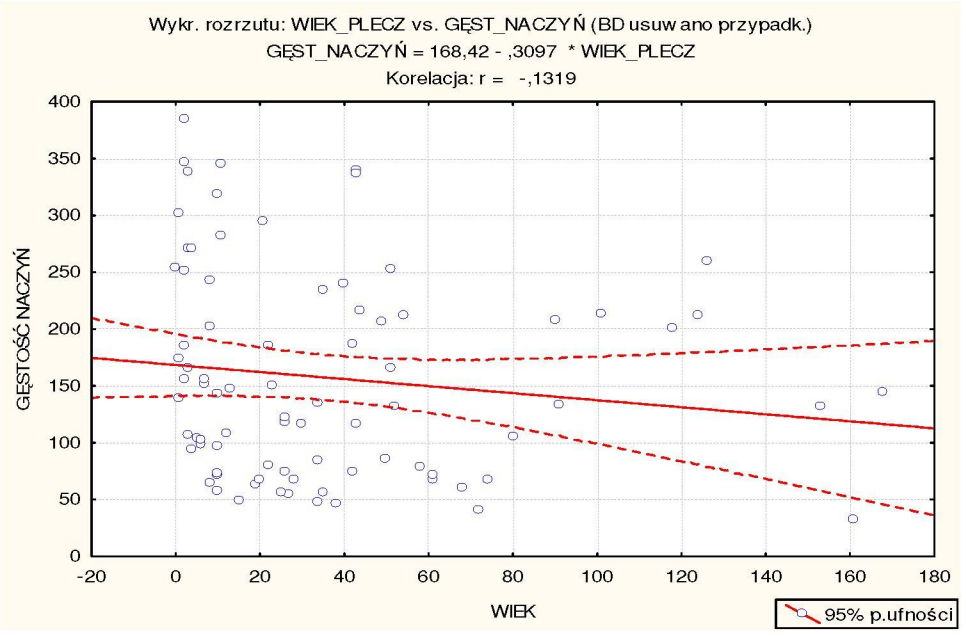
N = norma, > 1x N wartość powyżej normy i poniżej 2x norma, ≥ 2xN =wartość równa lub przekraczająca dwukrotny poziom normy

N= normal value, >1xN = value higher than normal level, but less than 2x normal level, ≥2xN= value above 2x normal level



Ryc. 18. Gęstość naczyń w tkankach nowotworowych guzów Nb w zależności od wieku pacjentów.

Fig. 18. Vascular density in Nb tissues vs. the age of patients.



Ryc. 19. Gęstość naczyń w tkankach nowotworowych guzów Nb w zależności od największego wymiaru guza Nb w guzie pierwotnym.

Fig. 19. Vascular density in Nb tissues vs. maximal size of primary Nb tumor.

Odpowiedź na leczenie chorych w z Nb o różnej gęstości unaczynienia

Największą liczbę całkowitych remisji uzyskano u chorych z guzami słabo unaczynionymi i najwięcej zgonów odnotowano wśród chorych z guzami o wysokim unaczynieniu (tab.52).

Tab. 52. Odpowiedź na leczenie chorych z Nb o różnej gęstości unaczynienia.
Tab. 52. Treatment response in patients with different vascular density in Nb tumors.

Efekt leczenia/ *Treatment result*	Gęstość naczyń (%)/ *Vascular density* (%)		
	Niska/ *Low*	Średnia/ *Intermediate*	Wysoka/ *High*
CR	17 (85)	25 (52)	7 (50)
PR	2 (10)	7 (15)	1 (7)
DOD	1 (5)	16 (33)	6 (43)

CR - całkowita remisja, PR - częściowa remisja, DOD - zgon
CR- complete remission, PR – partial remission, DOD – death of disease

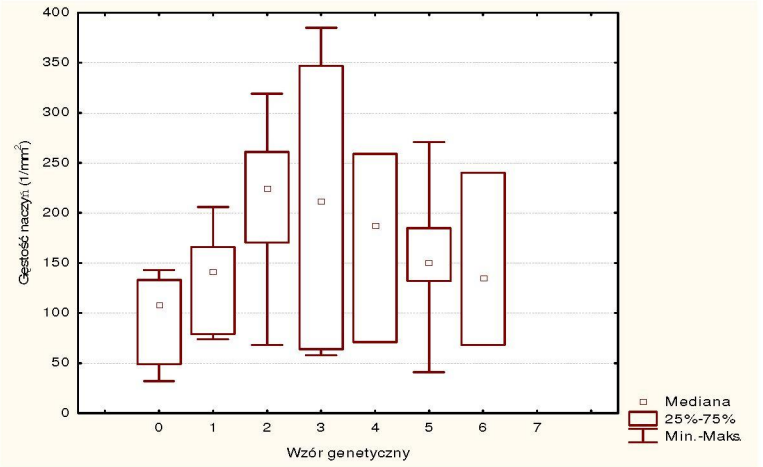
Markery genetyczne a gęstość naczyń w tkance guza Nb

Analiza współzależności intensywności unaczynienia w odniesieniu do markerów genetycznych wykazała większe unaczynienie guzów charakteryzujących się obecnością przynajmniej jednego z trzech markerów genetycznych w porównaniu z guzami bez analizowanych zmian genetycznych, choć różnice nie były statystycznie nieznamienne (tab. 53). **Najwyraźniej różnica w MVD zaznaczyła się w odniesieniu do obecności del(1p). Mediana MVD w guzach z obecnością tej delecji wynosiła 172 naczyń/mm^2, w guzach bez delecji 141/mm^2(p=0,49). W guzach o różnych typach ploidii najwyższą średnią gęstość unaczynienia prezentowały guzy triploidalne (165/mm^2)** (tab. 53).

Porównując grupy guzów z różnorodnymi „wzorami genetycznymi" stwierdzono najwyższą gęstość naczyń (mediana = 219/ mm^2) w **guzach z obecnością del(1p) jako jedynej z badanych zmian cytogenetycznych i ta wartość różniła się istotnie (p=0,02) od najniższej gęstości naczyń (mediana MVD= 103/mm^2) w grupie guzów bez stwierdzanych zmian cytogenetycznych** (ryc. 25). Wśród badanych guzów w żadnym nie stwierdzono obecności wszystkich trzech zmian cytogenetycznych jednocześnie.

Tab. 53. Gęstość naczyń w tkankach guzów Nb o różnej charakterystyce genetycznej.
Tab. 53. Vascular density in Nb tissues with different genetic abnormalities.

Markery genetyczne *Genetic markers*		Mediana MVD (naczyń/mm^2) *Median MVD (number of vessels/ mm^2)*	Wartość P *P-value*
amp *NMYC* *amp MYCN*	Obecna / *Present* (20)	161	0,95
	Nieobecna / *Absent* (41)	146	
del(1p) *del(1p)*	Obecna/ *Present* (24)	172	0,49
	Nieobecna/ *Absent* (27)	141	
częściowa trisomia 17q *17q gain*	Obecna/ *Present* (24)	174	0,83
	Nieobecna/ *Absent* (24)	168	
ploidia *ploidy*	Okołodi/tetraploidia/ *near-di/tetreploidy*	157	0,92
	Okołotriploidia/ *near-triploidy*	165	
	Hipodiploidia/ *hypoploidy*	119	

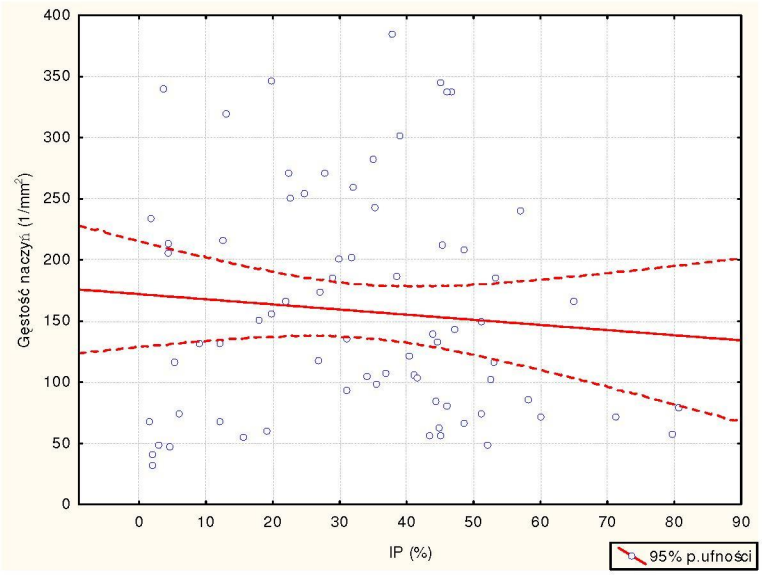


0 = nieobecna żadna z badanych zmian; 1 = obecna częściowa trisomia 17q; 2 = obecna del(1p); 3 = obecna del(1p) i częściowa trisomia 17q; 4 = obecna amp *NMYC*; 5 = obecna amp *NMYC* i częściowa trisomia 17q; 6 = obecna amp *NMYC* i del(1p); 7 = obecne wszystkie trzy zmiany genetyczne
0 = no changes detected, 1 = 17qgain detected, 2- del(1p) detected, 3 = 17q gain and del(1p) detected, 4 = MYCN amp detected, 5 = MYCN amp and 17q gain detected, 6 = MYCN amp and del (1p) detected, 7= all above mentioned changes detected

Ryc. 20. Gęstość naczyń w guzach Nb o różnych „wzorach genetycznych" (p=0,02).
Fig. 20. Vascular density in Nb tumors with different genetic patterns (p=0,02).

Zależność gęstości naczyń od aktywności proliferacyjnej w tkankach guzów Nb

Zaobserwowano ujemną korelację gęstości naczyń i indeksu proliferacyjnego, choć ta zależność nie osiągnęła znamienności statystycznej (Rs=-0,06; korelacja: r = -0,0886); (ryc. 21)



Ryc. 21. Zależność gęstości naczyń i aktywności proliferacyjnej komórek nowotworowych w tkankach 72 guzów Nb.

Fig. 21. Vascular density vs. proliferative activity of the tumor cells in 72 examined Nb tumor tissues.

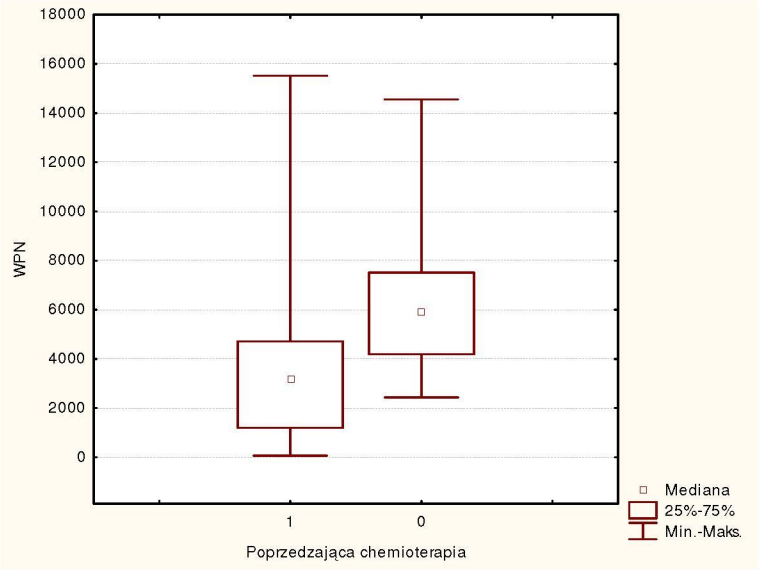
4.5.1.1. Wskaźnik naczyniowo-proliferacyjny

W części badanych tkanek nowotworowych zwracała uwagę jednoczesna wysoka wartość IP oraz wysokie unaczynienie guza. Dlatego dokonano analizy tych dwóch czynników jednocześnie (gęstości naczyń i aktywności proliferacyjnej). Dla dokonania takiej oceny wprowadzono nową wartość, którą nazwano wskaźnikiem proliferacyjno-naczyniowym (WNP). WNP obliczono jako iloczyn wartości gęstości naczyń i indeksu proliferacyjnego w tkankach Nb u 72 pacjentów. Wartość tego iloczynu wahała się w zakresie od 102,0 do 17955,0 (średnio 5084; mediana 4292).

Tkanki Nb po chemioterapii charakteryzowały się niższym średnim WNP w porównaniu do tych, które były oceniane przed chemioterapią (mediana WNP= 3445 vs 5914) (ryc. 22).

Oceniono wartość WNP w odniesieniu do budowy morfologicznej guzów oraz zanalizowano zależność WNP i markerów genetycznych. Dokonano także oceny wartości WNP w odniesieniu do charakterystyki klinicznej i wpływu WNP na przebieg kliniczny choroby nowotworowej.

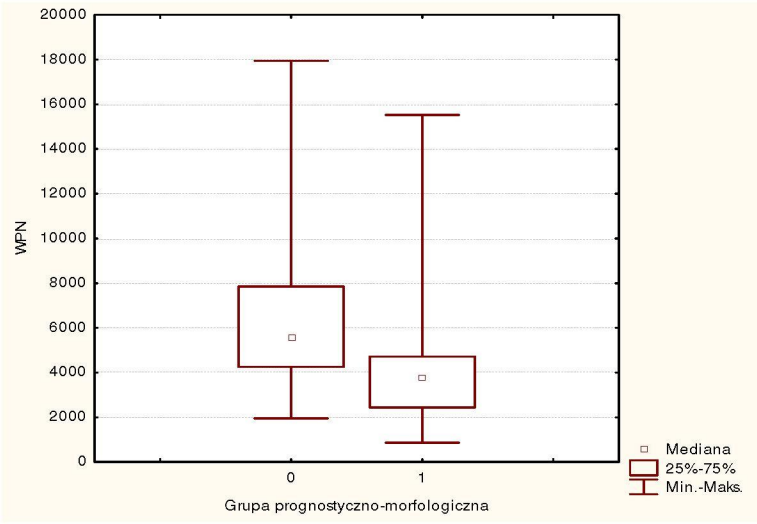
Wykazano statystycznie istotną różnicę wartości WNP pomiędzy Nb o budowie morfologicznej prognostycznie „korzystnej" i „niekorzystnej" guza w grupie guzów ocenianych przed zastosowaniem chemioterapii (p=0,01; ryc. 23).



1 = podano chemioterapię przed badaniami immunohistochemicznymi;
0 = przed badaniami immunohistochemicznymi chemioterapii nie podawano
1 = CHT administrated before immunohistochemical examination,
0 = CHT not given before immunohistochemical examination

Ryc. 22. Wartości WNP w zależności od chemioterapii stosowanej przed badaniami immunohistochemicznymi.

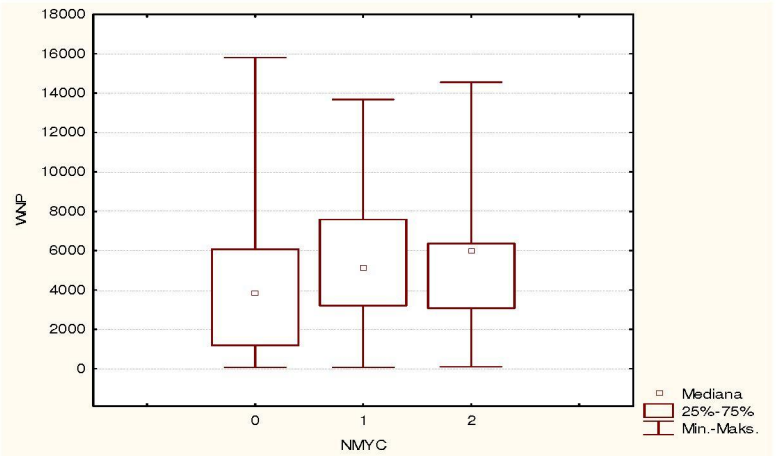
Fig. 22. Vasular –proliferative index (VPI) vs. chemotherapy administrated before immunohistpathological examination.



0 = o budowie „niekorzystnej"; 1 = o budowie „korzystnej"
0 = unfavorable histology, 1= favorable histology

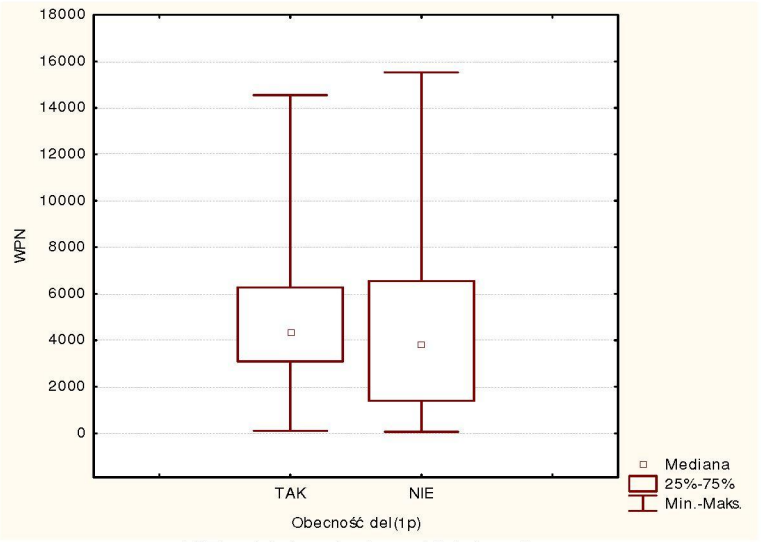
Ryc. 23. Wartości WNP w zależności od „korzystnej" lub „niekorzystnej" budowy histologicznej w grupie guzów ocenianych przed chemioterapią (p=0,01).
Fig. 23. Vasular-proliverative index(VPI) in different histopathological patterns of tissues examined before chemotherapy (p=0,01).

Nie znaleziono statystycznie istotnej różnicy WNP w zależności od badanych markerów genetycznych (ryc. 24, 25, 26).



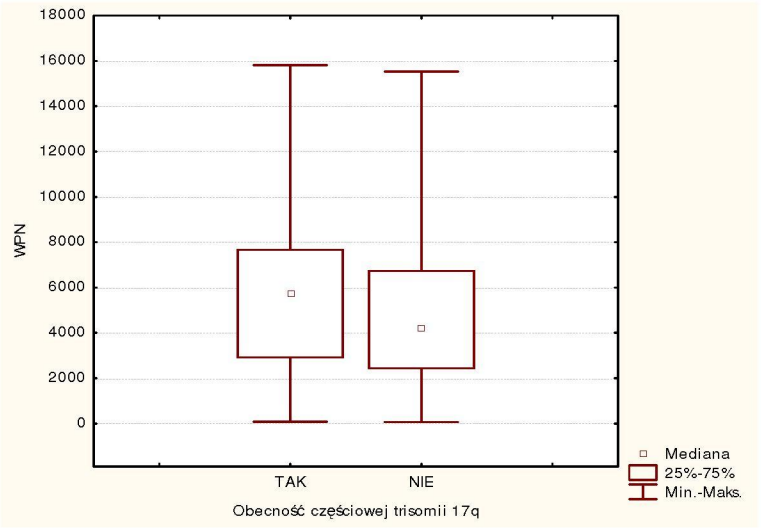
0 = obecne 2 kopie *NMYC*; 1= obecność >10 kopii *NMYC*; 2 = obecność 3-10 kopii *NMYC*
0 = 2 copies of MYCN present, 1- >10 copies of MYCN present, 2 = 2-10 copies of MYCN present

Ryc. 24. Wartości WNP a liczba kopii *NMYC* w guzie (p=0,36).
Fig. 24. VPI value in relation to the number of MYCN copies in tumor tissue (p=0,36).



NIE = del(1p) nieobecna/*del (1p) absent*;
TAK = del(1p) obecna/*del (1p) present*

Ryc. 25. Wartości WNP a występowanie del(1p) w guzie (p=0,45).
Fig. 25. VPI value in relation to the presence of del(1p) in tumor cells (p=0,45).

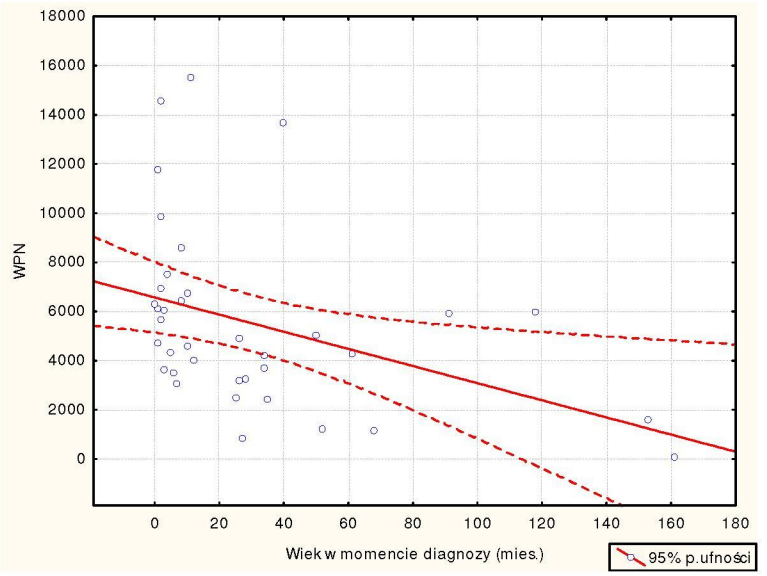


NIE - częściowa trisomia 17q nieobecna/ *17q gain absent*;
TAK – częściowa trisomia 17q obecna/ *17q gain present*

Ryc. 26. Wartości WNP a występowanie częściowej trisomii 17q w guzie (p=0,29).
Fig. 26. VPI value in relation to the presence of the 17q gain in tumor cells (p=0,29).

Charakterystyka kliniczna chorych poszczególnych guzami Nb o różnych wartościach wskaźnika WNP

Analiza poszczególnych cech klinicznych w zależności od WNP wykazała statystycznie istotną średnio-silną ujemną korelację WNP z wiekiem na początku leczenia (Rs=-0,35; korelacja: r =-0,3880) (ryc. 27).



Ryc. 27. Korelacja WNP z wiekiem pacjenta.
Fig. 27. VPI in relation to the age of the patient.

Nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy ani korelacji WNP z pozostałymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi (tab. 54).

Tab. 54. Cechy kliniczne chorych z guzami Nb o różnych wartościach WNP (<5000 vs ≥ 5000) w tkance nowotworowej.

Tab. 54. Clinical characteristic of the patients with Nb tumor with different VPI values (<5000 vs. ≥5000) in tumor tissue.

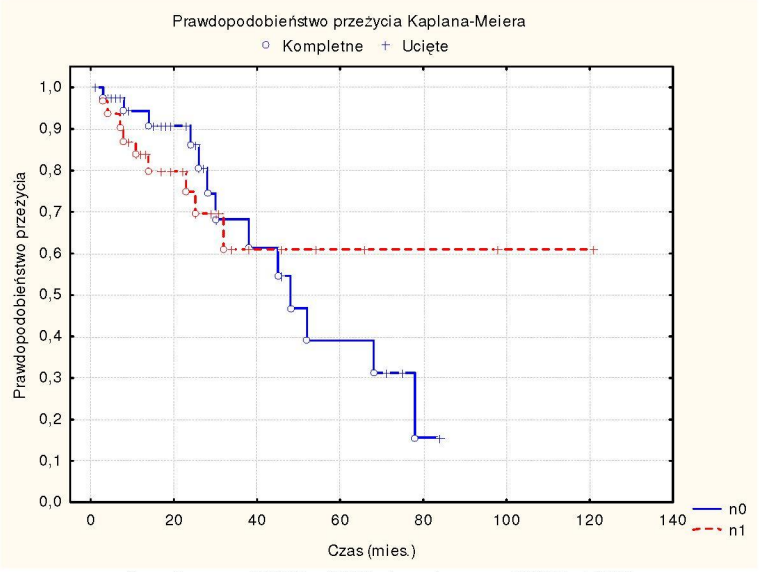
Cechy kliniczne/ *Clinical characteristic*		Liczba chorych z wartością WPN/ *Number of patients with VPI*		P
		< 5000	≥5000	
Wiek/ *Age*	< 1 rok/ *< 1 year old*	10	17	0,008
	≥ 1 rok/ *≥ 1 year old*	31	14	
Stadium/ *Stage*	I	2	2	0,87
	II	3	3	
	III	9	9	
	IV	22	15	
	IVs	5	31	
Lokalizacja ogniska pierwotnego/ *Primary site localisation*	Nadnercze *Adrenal glands*	28	18	0,73
	Okol. zaotrzewnowa *Retroperitoneal reg.*	10	10	
	Śródpiersie/ *Mediastinum*	3	2	
	Nieobecne/ *Absent*	12	6	
Wielkość ogniska pierwotnego/ *Primary site diameter*	< 5 cm	16	9	0,66
	5-10 cm	19	16	
	>10 cm	6	6	
Przerzuty do kości w IV^0 *Bone metastasis in IV^0*	Obecne/ *Present*	18	18	0,11
	Nieobecne/ *Absent*	12	6	
LDH w surowicy/ *Serum LDH*	N	5	9	0,22
	>1xN <2xN	17	11	
	= lub >2x N	18	11	
Ferrytyna w surowicy/ *Serum ferritin*	< 142 ng/ml	10	10	0,30
	>142 ng/ml	20	11	

N = norma, > 1x N = wartość powyżej normy i poniżej 2x norma, ≥ 2xN = wartość równa lub przekraczająca dwukrotny poziom normy

N = normal level, >1xN = value higher than normal level, but less than 2x norm, ≥2xN = value above 2x normal level

Odpowiedź guzów na leczenie w zależności od wartości WNP w guzach Nb

Szanse przeżycia chorych z guzami o niższych wartościach WNP (<5000) były wyższe, lecz różnica nie była statystycznie znamienna (p=0,80) (ryc. 28). U 18/72 (25%) chorych poziom WNP przekraczał wartość 7000. Wśród tych 18 chorobę nowotworową rozpoznano w 7 przypadkach w wieku niemowlęcym i w 11 u dzieci > 1 roku życia. Przebieg choroby u większości niemowląt (6/7) był pomyślny z utrzymującą się całkowitą remisją, natomiast u 7/11 (64%) pacjentów > 1 roku życia choroba zakończyła się zgonem w okresie średnio 2 lata 4 miesiące od rozpoznania.



0 = chorzy z WNP >5000, 1 = chorzy z WNP <5000
0 = patients with VPI>5000, 1 = chorzy z VPI < 5000

Ryc. 28. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od WNP (przy poziomie odcięcia 5000) (p=0,80).
Fig. 28. Survival probability in relation to the VPI (cut-off level: 5000) (p=0,08).

4.5.2. Ekspresja czynnika VEGF i jego receptora Flk-1 w tkankach guzów Nb

Badania immunohistochemiczne ekspresji cytokiny proangiogennej VEGF i jej receptora Flk-1 przeprowadzono w tkankach 75 guzów. Pozytywna reakcja z przeciwciałami p/w VEGF została wykazana zarówno w komórkach Nb, jak i w komórkach śródbłonka naczyń. Reakcję z przeciwciałami p/w Flk-1 zaobserwowano głównie w komórkach śródbłonka i tylko w pojedynczych komórkach Nb.

Słabą ekspresję VEGF (+) zaobserwowano w 28 guzach, średnią (++) w 33 guzach i silną (+++) w 14 guzach. Słabą ekspresję Flk-1 wykazano w 18 guzach, średnią w 30 guzach i silną w 15 guzach.

Intensywność ekspresji VEGF jak i Flk-1 w preparatach immunohistochemicznych Nb badanych przed i po chemioterapii była porównywalna. **Ekspresja VEGF i jej receptora w tkance nowotworowej nie korelowała z gęstością naczyń. Silniejszą ekspresję zarówno VEGF jak i Flk-1 częściej stwierdzano w typie niezróżnicowanym (UN) i niskozróżnicowanym (POO) w porównaniu z bardziej dojrzałymi histologicznymi typami Nb**, lecz różnice nie były znamienne (tab. 55).

Tab. 55. Ekspresja cytokiny VEGF i jej receptora Flk-1 w różnych typach morfologicznych Nb przed i po chemioterapii.

Tab. 55. VEGF and its receptr Flk-1 expression in different histological types of Nb tumors – before and after chemotherapy.

Grupa guzów *Group of tumors*	Typ histologiczny *Histological type*	Ekspresja VEGF *VEGF expression*				Ekspresja Flk-1 *Flk-1 expression*			
		+	++	+++	p	+	++	+++	p
Przed CHT *Before CHT*	UN	0	4	2	0,76	1	3	2	0,41
	POO	4	5	4		2	6	5	
	DF	4	5	4		5	6	1	
	GNB	1	1	2		1	0	1	
	GN	0	1	0		1	0	0	
Po CHT *After CHT*	UN	0	0	0	0,57	0	0	0	0,71
	POO	0	5	2		1	4	0	
	DF	4	6	2		2	8	2	
	GNB	2	9	1		2	2	2	
	GN	1	0	3		3	0	1	

Typ histologiczny: UN = niezróżnicowany, POO = niskozróżnicowany, DF = różnicujący się, GNB = nerwiak zwojowokomórkowy, GN = zwojakonerwiak

Histological type: UN = undifferentiated POO = poorly differentiated, DF = differentiating type, GNB = ganglioneuroblastoma, GN = ganglioneuroma

Nie zaobserwowano istotnych korelacji ekspresji VEGF w odniesieniu do cech klinicznych guza (tab. 56).

Tab. 56. Cechy kliniczne chorych z guzami Nb o różnej ekspresji VEGF w tkance nowotworowej.

Tab. 56. Clinical characteristics of Nb patients with different VEGF expression in tumor tissue.

Cechy kliniczne *Cinical characteristic*		Ekspresja VEGF *VEGF expression*			wartość p *p-value*
		+	++	+++	
Wiek *Age*	< 1 roku/ *< 1 years old*	5	14	9	0,99
	≥1 roku/ *≥ 1 year old*	10	20	12	
Stadium *Stage*	I	2	0	2	0,30
	II	1	6	1	
	III	2	11	6	
	IV	10	16	8	
	IVs	1	3	3	
Lokalizacja ogniska pierwotnego/ *Primary site localisation*	Nadnercze *Adrenal glands*	12	17	16	0,50
	Okol. zaotrzewnowa/ *Retroperitoneal reg.*	2	13	3	
	Śródpiersie *Mediastinum*	1	6	1	
	Nieobecne/ *Absent*	3	4	4	
Wielkość ogniska pierwotnego/ *Primary site diameter*	< 5 cm	4	11	7	0,98
	5-10 cm	7	17	7	
	> 10 cm	3	8	6	
Przerzuty do kości w IV^0/ *Bone metastases in IV^0*	Obecne/ *Present*	7	12	4	0,46
	Nieobecne/ *Absent*	3	4	4	
VMA w moczu *Urinary VMA*	N	3	10	4	0,61
	> N	13	23	15	
LDH w surowicy/ *Serum LDH*	N	1	3	0	0,66
	>1x N < 2x N	3	3	3	
	≥ 2x N	6	10	5	
Ferrytyna w surowicy *Serum ferritin*	<142 ng/ml	2	5	0	0,25
	>142 ng/ml	6	8	5	

N = norma, > 1x N = wartość powyżej normy i poniżej 2x norma, ≥ 2xN = wartość równa lub przekraczająca dwukrotny poziom normy

N = normal level, >1xN = value higher than normal level, but less than 2x norm, ≥2xN = value above 2x normal level

Nie zaobserwowano istotnych korelacji między ekspresją receptora Flk-1 a klinicznymi wskaźnikami prognostycznymi (tab. 57).

Tab. 57. Cechy kliniczne chorych z guzami Nb o różnej ekspresji Flk-1 w tkance nowotworowej.

Tab. 57. Clinical characteristics of Nb patients with different Flk-1 expression in tumor tissue.

Cechy kliniczne *Cinical characteristic*		Ekspresja Flk-1 *Flk-1 expression*			Wartość p *p-value*
		+	++	+++	
Wiek *Age*	< 1 roku/ *< 1 years old*	7	13	4	0,37
	≥1 roku/ *≥ 1 year old*	11	17	11	
Stadium *Stage*	I	1	1	1	0,57
	II	3	3	2	
	III	3	8	2	
	IV	8	16	9	
	IVs	3	2	1	
Lokalizacja ogniska pierwotnego/ *Primary site localisation*	Nadnercze *Adrenal glands*	10	18	8	0,71
	Okol. zaotrzewnowa/ *Retroperitoneal reg.*	4	11	6	
	Śródpiersie *Mediastinum*	4	1	1	
	Nieobecne/ *Absent*	3	6	2	
Wielkość ogniska pierwotnego/ *Primary site diameter*	< 5 cm	6	11	4	0,34
	5-10 cm	10	16	6	
	> 10 cm	2	3	5	
Przerzuty do kości w IV^0/ *Bone metastases in IV^0*	Obecne/ *Present*	5	10	7	0,71
	Nieobecne/ *Absent*	3	6	2	
VMA w moczu *Urinary VMA*	N	7	7	3	0,36
	> N	10	22	11	
LDH w surowicy/ *Serum LDH*	N	1	2	1	0,51
	>1x N < 2x N	2	2	4	
	≥ 2x N	5	12	4	
Ferrytyna w surowicy *Serum ferritin*	<142 ng/ml	2	3	1	0,88
	>142 ng/ml	5	9	5	

N = norma, > 1x N = wartość powyżej normy i poniżej 2x norma, ≥ 2xN = wartość równa lub przekraczająca dwukrotny poziom normy

N = normal level, >1xN = value higher than normal level, but less than 2x norm, ≥ 2xN = value above 2x normal level

Ocena odpowiedzi na leczenie w zależności od ekspresji VEGF i Flk-1 w guzach Nb nie ujawniła różnic (tab. 58 i 59).

Tab. 58. Odpowiedź na leczenie w zależności od ekspresji VEGFw tkance nowotworowej.
Tab. 58. Treatment response in relation to different VEGF expression in tumor tissue.

Odpowiedź na leczenie *Treatment response*		Ekspresja VEGF *VEGF expression*		
		+	++	+++
CR	(% chorych) *(% of patients)*	10 (23)	22 (50)	12 (27)
PR/DOD	(% chorych) *(% of patients)*	6 (21)	14 (50)	8 (29)

CR = całkowita remisja, PR = częściowa remisja, DOD = zgon
CR = complete remission, PR = partial remission, DOD = death of disease

Tab. 59. Odpowiedź na leczenie w zależności od ekspresji Flk-1w tkance nowotworowej.
Tab. 59. Response to a treatment in relation to a different expressionof Flk-1in tumor tissue.

Odpowiedź na leczenie *Treatment response*	Ekspresja Flk-1 *Flk-1 expression*		
	+	++	+++
CR (%)	11 (28)	21 (50)	10 (32)
PR/DOD (%)	6 (30)	10 (50)	4 (20)

CR = całkowita remisja, PR = częściowa remisja, DOD = zgon
CR = complete remission, PR = partial remission, DOD = death of disease

Poszukiwanie zależności ekspresji VEGF w odniesieniu do markerów genetycznych ujawniło w grupie Nb z obecnością del(1p) częściej występującą zwiększoną aktywność tej cytokiny (++/+++) niż w grupie Nb bez tej aberracji (80% vs 59%), chociaż zależność ta nie osiągnęła znamienności statystycznej (p=0,29). Nie zaobserwowano zależności aktywności receptora Flk-1 od badanych markerów genetycznych (tab. 60).

Tab. 60. Ekspresja VEGF i Flk-1 w tkankach guzów o różnych cechach genetycznych.
Tab. 60. VEGF expression and Flk-1 expression in tumor tissue with different genetic abnormalities.

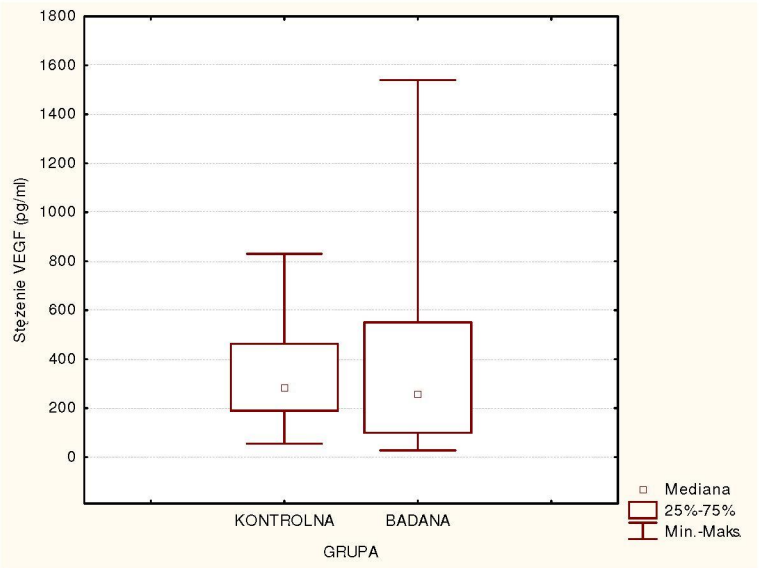
Wskaźniki genetyczne *Genetic markers*		Ekspresja VEGF *VEGF expression*				Ekspresja Flk-1 *Flk-1 expression*			
		+	++	+++	p	+	++	+++	Wartość P
amp *NMYC* *MYCN amp*	Obecna *Present*	7	8	6	0,6	4	9	5	0,60
	Nieobecna *Absent*	8	17	11		9	14	8	
del(1p) *del(1p)*	Obecna *Present*	4	11	7	0,29	5	9	6	0,69
	Nieobecna *Absent*	9	8	6		7	9	4	
częściowa trisomia17q *17q gain*	Obecna *Present*	6	9	8	0,26	5	11	4	0,73
	Nieobecna *Absent*	6	13	3		7	9	5	
stopień ploidii *ploidy degree*	Około di/tetraploidia *Near-di/tetraploidy*	6	9	6	0,97	3	11	3	0,46
	Okołotriploidia *Near-triploidy*	1	3	1		1	3	1	
	Hipodiploidia *Hypoploidy*	2	4	2		4	2	2	

4.5.3. Wskaźniki angiogenezy w surowicy

Stężenia cytokin proangiogennych: VEGF i bFGF metodą ELISA oznaczono u 38 pacjentów przed rozpoczęciem leczenia oraz u 30 zdrowych dzieci z grupy kontrolnej.

Stężenie VEGF w surowicy

Wartości stężenia VEGF w surowicy krwi chorych wahały się od 28 do 1540 pg/ml (średnio 405 pg/ml). W grupie kontrolnej stwierdzono stężenia VEGF od 55-830 pg/ml (średnio 323 pg/ml). Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w obu badanych grupach (p=0,91) (ryc. 29).

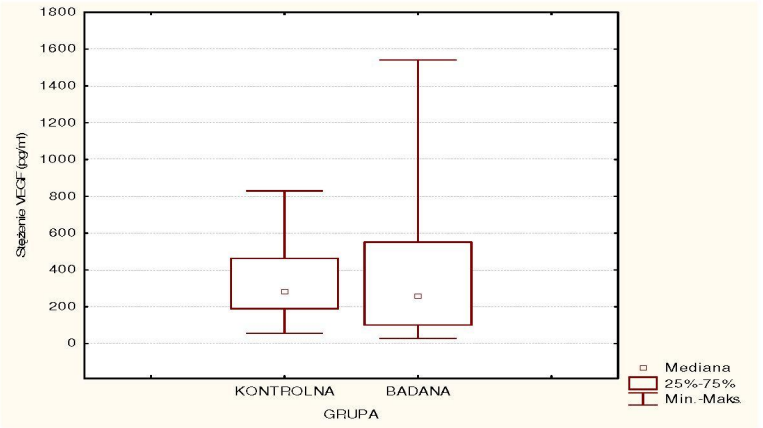


Ryc. 29. Wartości stężeń VEGF w surowicy w grupie pacjentów z Nb i w grupie kontrolnej dzieci zdrowych (p=0,91).

Fig. 29. Serum VEGF levels in group of Nb patients and in control group of healthy children (p=0,91).

U 7/38 pacjentów wykryto stężenie VEGF przewyższające największą wartość stężenia tej cytokiny w grupie kontrolnej (>830 pg/ml). Byli to chorzy prezentujący zróżnicowane kliniczne cechy choroby nowotworowej (stadium, wiek wielkość guza, lokalizacja guza pierwotnego i przerzutów) i różnorodne typy histologiczne Nb. W surowicach pobranych od czterech chorych, u których badania w surowicy i w tkance guza zostały przeprowadzone jednoczasowo tj. przed rozpoczęciem chemioterapii podwyższone poziomy tej cytokiny korelowały ze zwiększoną ekspresją VEGF w tkance nowotworowej. W sześciu guzach pochodzących od chorych z wysokim stężeniem VEGF w surowicy wykonano badania cytogenetyczne- w 4/6 guzów znaleziono obecność amp *NMYC* i w 3/6 obecność del(1p).

Wartość stężenia cytokiny bFGF w surowicy krwi pacjentów wahała się od 0,0 do 33,1 pg/ml (średnio 4,0 pg/ml). Jedynie u 20/38 pacjentów stężenie bFGF osiągnęło poziom oznaczalny. W grupie kontrolnej wartości te wahały się od 0,0-15,1 pg/ml (średnio 3,9 pg/ml). W grupie kontrolnej stężenie bFGF było oznaczalne u 15/30 dzieci. Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy między tymi stężeniami w grupie pacjentów i w grupie kontrolnej (p=0,91) (ryc. 30).



Ryc. 30. Wartości stężeń bFGF w surowicy w grupie pacjentów z Nb i w grupie kontrolnej dzieci zdrowych (p=0,53).

Fig. 30. Serum bFGF levels in Nb patients and in control group of healthy children (p=0,53).

Jedynie u 2 pacjentów stwierdzono w surowicy stężenia bFGF przewyższające najwyższy ich poziom w grupie kontrolnej (> 15,1 pg/ml). Byli to chorzy z guzami w IV stadium zaawansowania klinicznego choroby, w wieku > 1 roku życia. Leczenie jednego z nich zakończyło się zgonem w ciągu 10 miesięcy, drugi pacjent jest poddawany nadal terapii, z powodu wznowy, która wystąpiła 3 miesiące po zakończeniu leczenia. Typy morfologiczne guzów u tych pacjentów, to typ różnicujący się zwojaka zarodkowego i nerwiak zwojowokomórkowy.

4.5.4. Podsumowanie

Guzy Nb badane przed jak i po chemioterapią nie różniły się znamiennie gęstością unaczynienia. Gęstość naczyń w guzach skąpopodścieliskowych była większa niż w bogatopodścieliskowych. Wyższy stopień unaczynienia prezentowały guzy niemowlęce. W odniesieniu do markerów genetycznych stwierdzono, że najlepiej były unaczynione guzy z obecnością del(1p). Mimo zaobserwowanej tendencji do odwrotnej zależności aktywności proliferacyjnej i gęstości naczyń w tkankach Nb, w części badanych tkanek stwierdzono równolegle wysoką aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych (wysokie wartości IP) jak i znaczne unaczynienie (wysoka gęstość naczyń). Pacjenci z taką charakterystyką Nb mierzoną wskaźnikiem WNP (WNP>5000) prezentowali bardziej agresywny przebieg choroby z mniejszą szansą przeżycia. Ekspresja czynnika VEGF i receptora Flk-1 w tkankach guza była rozłożona nierównomiernie, największa w okolicach pól martwicy. Nie stwierdzono jej związku z klinicznymi cechami choroby nowotworowej. Jedynie u nielicznych chorych wykazano podwyższony poziom VEGF i bFGF w surowicy. Wszyscy ci chorzy prezentowali chorobę zaawansowaną i agresywny jej przebieg. Większą aktywność VEGF stwierdzono w guzach z obecnością delecji chromosomu 1p.

4.6. WYNIKI BADAŃ PROLIFERACJI I ANGIOGENEZY GUZÓW NB W ODNIESIENIU DO CZYNNIKÓW PROGNOSTYCZNYCH W GRUPIE PACJENTÓW ZMARŁYCH

W okresie prowadzonej obserwacji zmarło 32 z 110 pacjentów. Kliniczną charakterystykę tych chorych przedstawia tabela 61. Dominowali chorzy ≥ 1 roku życia (29/32=90%). U wszystkich chorych w chwili rozpoznania stwierdzono stadia kliniczne zaawansowane (III°-5 chorych, IV°-27 chorych). Większość chorych z chorobą nowotworową rozsianą demonstrowała obecność przerzutów w kościach, a wielkość ogniska pierwotnego w 71% przypadków przekraczała w największym wymiarze 5 cm. Ognisko pierwotne u wszystkich pacjentów tej grupy zlokalizowane było w jamie brzusznej.

Tab. 61. Cechy kliniczne i biochemiczne w grupie 32 chorych zmarłych.
Tab. 61. Clinical characteristics and biochemical findings in 32 deceased patients.

Cechy kliniczne *Clinical characteristic*		Liczba chorych *Number of patients*
Wiek *Age*	< 1 rok życia/ *<1 year old* ≥ 1 rok życia/ *≥1 year old*	3 29
Stadium *Stage*	I II III IV IVs	0 0 5 27 0
Lokalizacja ogniska pierwotnego *Tumor site localization*	Nadnercza/ *Adrenal glands* Przestrzeń zaotrzewnowa/ *Retroperitoneal region* Śródpiersie/ *Mediastinum* Nieznane/ *Unknown*	21 10 0 1
Wielkość ogniska pierwotnego/ *Size of primary tumor*	do 5 5-10 >10 Nieznana/ *Unknown*	9 14 8 1
Przerzuty *Metastases*	Do kości/ *Bone* Pozakostne/ *Extra - bones*	23 4
LDH w surowicy *Serum LDH*	N >1xN >2xN	3 7 22
Ferrytyna w surowicy *Serum ferritin*	< 142 ng/ml ≥ 142 ng/ml Brak danych/ *Unknown*	2 22 10
VMA w moczu *Urinary VMA*	N > N > 2xN Brak/ *Absent*	3 4 23 2

N = norma, > 1x N = wartość powyżej normy i poniżej 2x norma, ≥ 2xN = wartość równa lub przekraczająca dwukrotny poziom normy
N = normal level, >1xN = value higher than normal level, but less than 2x norm, ≥ 2xN = value above 2x normal level

Badania morfologiczne 10/32 (31%) guzów zostały przeprowadzone przed rozpoczęciem chemioterapii i 22/32 (69%) guzów po chemioterapii (tab. 62). Wśród badanych przed chemioterapią 9/10 guzów należało do skąpopodścieliskowych. W grupie Nb badanych po zastosowaniu chemioterapii w 33% (7/22) rozpoznawano typ GNB.

Tab. 62. Typy histologiczne, IP i MVD guzów Nb w grupie 32 zmarłych pacjentów.
Tab. 62. Histological types of tumors, IP and MVD of Nb tumors in 32 deceased patients.

Właściwości tkanek guzów *Tumor tissue characteristic*		Liczba guzów (32) *Number of the tumors (32)*	
		Przed CHT (10) *Before CHT (10)*	Po CHT (22) *After CHT(22)*
Typ histologiczny *Histological type*	UN	4	3
	POO	2	8
	DF	3	4
	GNB	1	7
	GN	0	0
Indeks proliferacyjny *Proliverative index*	< średniej <*mean value*	(<34%) 0	(<31%) 8
	> średniej > *mean value*	(>34%) 6	(>31%) 9
	brak danych/ *unknown*	4	5
Gęstość naczyń/ *Vascular density*	< średniej <*mean value*	(<161/mm^2) 3	(<152/mm^2) 6
	> średniej/ >*mean value*	(>161/mm^2) 2	(>152/mm^2) 14
	brak danych/ *unknown*	5	2
Ekspresja VEGF *VEGF expression*	+	0	4
	++	4	9
	+++	2	5
	brak danych *unknown*	4	4
Ekspresja Flk-1 *Flk-1 expression*	+	3	5
	++	2	6
	+++	0	1
	brak danych/ *unknown*	5	10

Badania immunohistochemiczne guzów przed chemioterapią wykazały cechy znacznej proliferacji we wszystkich przypadkach, z wartością IP wyższą niż średnia dla grupy guzów badanych przed chemioterapią (>34%). Aktywność proliferacyjna guzów po zastosowaniu chemioterapii była zróżnicowana i część z nich (głównie guzy o budowie histologicznej typu GNB) wykazywała niższe wartości IP (tab. 62).

Wartości gęstości naczyń w guzach ocenianych przed chemioterapią były zróżnicowane. Większość badanych guzów Nb po chemioterapii (14/22) charakteryzowała się wysoką gęstością naczyń przekraczającą średnią dla grupy guzów badanych po chemioterapii (152/mm^2).

Stwierdzono ekspresję VEGF o średnim i wysokim nasileniu (++/+++) w większości guzów (19/32), natomiast ekspresja FLK-1 była zróżnicowana (tab. 62).

Analizę markerów cytogenetycznych przedstawia tabela 63. Występowanie amp *NMYC* stwierdzono częściej - w 8/20 (40%) niż w całej analizowanej grupie Nb (28%). Pozostałe dwie aberracje: del(1p) i częściowa trisomia 17q występowały z porównywalną częstością.

Tab. 63. Markery genetyczne tkanek guzów Nb w grupie chorych zmarłych.
Tab. 63. Genetic markers of tumor tissue in deceased patients.

Markery cytogenetyczne *Genetic markers*		Guzy przed CHT *Tumors before CHT*	Guzy po CHT *Tumors after CHT*
amp *NMYC* (oznaczono w 20 guzach) *MYCN amp (estimated in 20 tumors)*	Obecna/ *Present*	4	6
	Nieobecna/ *Absent*	4	8
del(1p) (oznaczono w 16 guzach) *del(1p) (estimated in 16 tumors)*	Obecna/ *Present*	1	9
	Nieobecna / *Absent*	2	4
częściowa trisomia 17q (oznaczono w 17 guzach) *17q gain (estimated in 17 tumors)*	Obecna/ *Present*	1	5
	Nieobecna/ *Absent*	4	7

4.7. ANALIZA STATYSTYCZNA PRAWDOPODOBIEŃSTWA PRZEŻYCIA

Dokonano statystycznej oceny analizowanych prognostycznych wskaźników klinicznych, wskaźnika aktywności proliferacyjnej (IP) i gęstości naczyń (MVD) w zależności od czasu przeżycia metodą analizy wieloczynnikowej modelu regresji Coxa oraz przeprowadzono analizy jednoczynnikowe szans przeżycia metodą Kaplana-Meyera dotyczące poszczególnych badanych parametrów.

4.7.1. Analiza wieloczynnikowa

W pierwszym etapie analiza dotyczyła wszystkich 110 pacjentów, wśród których 32 zmarło (29,1%), a u pozostałych 78 żyjących (70,9%) obserwację zakończono 1.06.2004 r. W tym etapie oceniono następujące parametry kliniczne:

1. charakterystyczne cechy kliniczne oceniane w momencie diagnozy:
   - płeć - żeńska, męska;
   - wiek < 1 roku, > 1 roku;
   - stadium kliniczne choroby - I, II, III, IV, IVs;
   - zaawansowanie choroby - niskie (stadium I, II oraz stadium IVs), choroba miejscowo zaawansowana (III stadium) i choroba rozsiana (IV stadium);
   - obecność przerzutów pozakostnych;
   - obecność przerzutów do kości;
   - lokalizacja guza - nadnercze, przestrzeń pozaotrzewnowa poza nadnerczem, śródpiersie;
   - maksymalna średnica guza z podziałem na <5 cm, 5-10 cm, >10 cm;
   - maksymalna średnica guza z podziałem na < 5 cm, = lub > 5 cm;
   - grupa ryzyka wg Brodeura - niskiego, pośredniego i wysokiego;
2. rodzaj stosowanej terapii:
   - ostateczny zabieg operacyjny: guz nieoperacyjny, zabieg nieradykalny, zabieg radykalny;
3. uzyskaną odpowiedź na leczenie:
   - uzyskanie całkowitej remisji w przebiegu leczenia - tak/nie;
   - wystąpienie wznowy choroby - tak/nie.

W wyniku tej oceny wyodrębniono siedem czynników klinicznych, które okazały się niezależnymi i statystycznie znamiennymi czynnikami ryzyka niepomyślnego przebiegu choroby (tab. 64). Ryzyko zgonu było największe u chorych z chorobą rozsianą; w przypadku przerzutów do kości 6,4 razy większe, a w przypadku przerzutów pozakostnych 4,32 razy większe. Wiek <1 roku życia zmniejszał ryzyko zgonu. Stwierdzono wpływ wielkości guza na przebieg choroby, gdyż u chorych z guzami o średnicy >5 cm ryzyko zgonu było większe niż w przypadku chorych z guzami mniejszymi. Brak możliwości radykalnego leczenia operacyjnego i niecałkowita odpowiedź na zastosowane leczenie kompleksowe w postaci braku remisji całkowitej zwiększały ryzyko zgonu 3,5 krotnie. Utrzymująca się remisja po zakończeniu leczenia w okresie prowadzonej obserwacji była czynnikiem korzystnym zmniejszającym ryzyko zgonu.

Tab. 64. Kliniczne czynniki ryzyka wyodrębnione w wieloczynnikowej analizie proporcjonalnego hazardu Coxa.

Tab. 64. Clinical risk factors distincted in a multifactorial Cox proportional hazard analysis.

Czynnik ryzyka *Risk factor*	Iloraz szans (OR) *Odds ratio*	95% CI dla RR *95% confidence interval for relative risk*	Poziom istotności (p) *p value*
Wiek: < 1 rok vs. ≥ *1 rok życia* *Age: < 1 year vs. ≥ 1 year old*	0,99	0,98; 0,99	0,006
Przerzuty pozakostne: obecne vs nieobecne *Extra-bone metastases: yes vs. no*	4,32	1,84; 10,16	0,001
Przerzuty kostne: obecne vs nieobecne *Bone metastases: yes vs. no*	6,40	2,27; 18,07	0,000
Wielkość guza: <5 cm vs. >5 cm *Tumor size: <5 cm vs. > 5 cm*	1,06	1,02; 1,09	0,001
Typ leczenia miejscowego: zabieg radykalny lub CR bez zabiegu vs. zabieg nieradykalny lub guz nieoperacyjny *Type of surgery:* *complete resection or CR without resection: yes vs. no*	3,56	1,64; 7,69	0,001
Wznowa: nie wystąpiła vs wystąpiła *Relapse: yes vs. no*	0,185	0,06; 0,56	0,003
Całkowita remisja: nie uzyskano vs uzyskano *Complete remission: yes vs. No*	3,55	2,23; 5,62	0,000

Dodatkowa analiza wieloczynnikowa parametrów biochemicznych tj stężenia LDH, ferrytyny w surowicy i ilości wydalanego VMA w moczu, które były dostępne w grupie 70 pacjentów wykazała statystycznie istotny wpływ badanych czynników biochemicznych (LDH, ferrytyny i VMA) na ryzyko zgonu (tab. 65).

Tab. 65. Czynniki ryzyka wyodrębnione w dodatkowym modelu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa.

Tab. 65. Risk factors distincted in additional multifactorial analysis of Cox's proportional hazard model.

Czynnik ryzyka *Risk factor*	Iloraz szans (OR) *Odds ratio*	95%CI dla RR *95% confidence interval for relative risk*	Poziom istotności (p) *p value*
LDH: norma vs powyżej normy *Seurm LDH: normal vs. above normal*	1,001	1,000; 1,002	0,000
Ferrytyna: < 142 ng/l vs > 142 ng/l/ *Serum ferritin*	1,022	1,004; 1,674	0,002
VMA: norma vs >normy/ *Urinary VMA: norma vs. >normal*	1,374	1,128; 1,674	0,002

W dalszym etapie analizy wieloczynnikowej prawdopodobieństwa przeżycia dokonano oceny niezależnych klinicznych czynników prognostycznych (wieku i stadium zaawansowania klinicznego) w zestawieniu ze wskaźnikiem aktywności angiogenezy - gęstością naczyń w guzie i wskaźnikiem aktywności proliferacyjnej guza – indeksem proliferacyjnym (IP) (tab. 66).

Tab. 66. Czynniki ryzyka wyodrębnione w modelu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa rozszerzonym o indeks proliferacyjny, gęstość naczyń i iloczyn WNP.

Tab. 66. Risk factors distincted in multifactorial analysis of Cox's Proportional Hazard Model extended to IP, vascular density and VPI.

Czynnik ryzyka *Risk factor*	Iloraz szans (OR) *Odds atio*	95%CI dla OR *95% confidence interval for relative risk*	Poziom istotności (p) *p value*
Stadium (I, II, III, IV, IVs) *Stage of a disease*	1,916	1,223; 3,001	**0,004**
Wiek (<1 roku vs. ≥ 1 roku) *Age (<1 year vs. ≥1 year old*	1,007	1,000 ; 1,014	**0,046**
Indeks Proliferacyjny (niski, średni, wysoki) *Proliverative Index (low, intermediate, high)*	0,565	0,336; 0,950	**0,031**
WNP (<5000 vs. >5000) *VPI (<5000 vs. <5000)*	1,000	1,000; 1,000	0,572
Gęstość naczyń (niska, średnia, wysoka) *Vascular density (low, intermediate, high)*	0,999	0,993; 1,004	0,593

Uwzględniając poszczególne stadia kliniczne uwidoczniono statystycznie niezależny wpływ stadium klinicznego (p=0,004), wieku (p=0,046) i aktywności proliferacyjnej guza (p=0,03) na ryzyko zgonu. Wpływ gęstości naczyń i iloczyn WNP na prawdopodobieństwo przeżycia chorych był nieznamienny. Jednakże przyjmując w analizie podział na stadia choroby I, II, IVs w stosunku do stadium zaawansowanego III i IV, uwidoczniono statystycznie istotny, niezależny wpływ zaawansowanego klinicznie stadium Nb (III i IV) (p=0,007) oraz wartości iloczynu WNP w guzach na ryzyko zgonu (p= 0,04).

Analizie wieloczynnikowej nie poddano parametrów genetycznych (amp *NMYC*, del(1p), częściowa trisomia 17q), ponieważ badania te nie były wykonane u wszystkich chorych i ich wprowadzenie powodowało brak stabilności modelu.

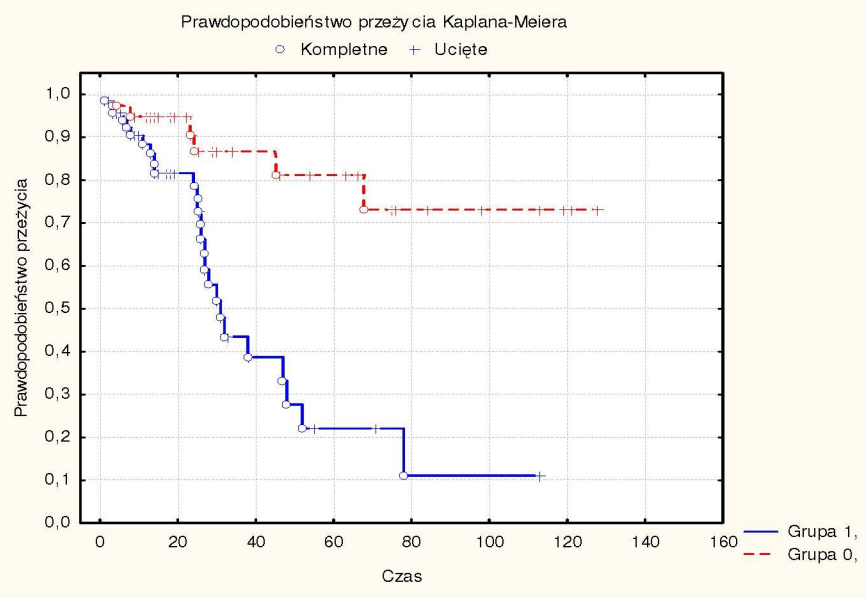
4.7.2. Analiza jednoczynnikowa

Parametry kliniczne

W analizie jednoczynnikowej parametrów klinicznych prawdopodobieństwo przeżycia określano metodą krzywych Kaplana–Meyera. Zaobserwowano statystycznie istotny wpływ wieku pacjenta (p=0,001), stadium zaawansowania choroby (p=0,001); odpowiedzi na leczenie w postaci całkowitej remisji (p=0,001) oraz wystąpienia wznowy (p=0,004) na prawdopodobieństwo przeżycia chorych (ryc. 31, 32, 33, 34). Zaznaczył się w tej analizie również wpływ wielkości ogniska pierwotnego na czas przeżycia chorych, choć różnica nie osiągnęła znamienności statystycznej (p=0,09) (ryc. 35).

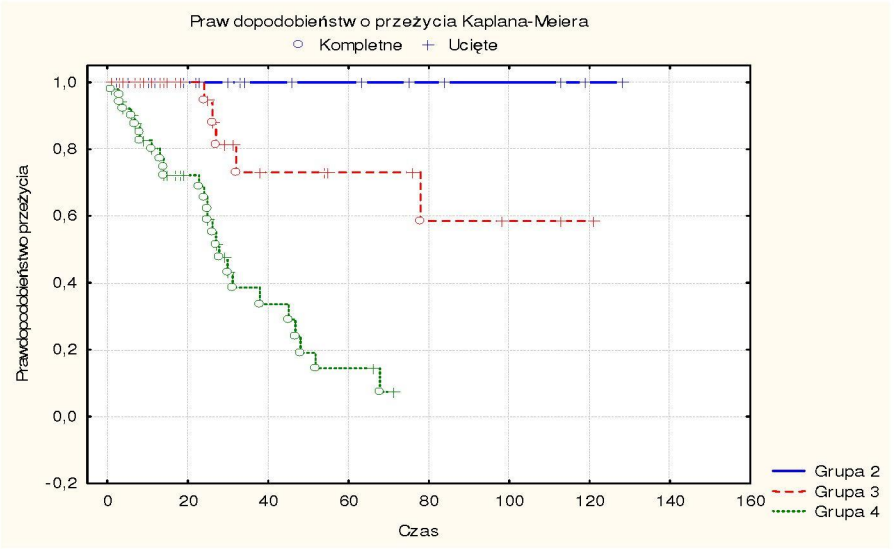
Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnej różnicy w przeżyciu chorych w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego (p=0,70) i radykalności zabiegu operacyjnego (p=0,77).

Zaobserwowano statystycznie istotną różnicę w przeżyciu chorych w zależności od stężenia LDH (p=0,01) i ferrytyny (p=0,002) w surowicy krwi. Różnice w krzywych przeżycia w zależności od ilości wydalanego VMA w moczu były na granicy znamienności statystycznej (p=0,06) (ryc. 36, 37, 38).



grupa 1 = chorzy do 1 roku życia; grupa 2 = chorzy ≥ 1 roku życia
grupa 1 = group of patients <1 yr old; grupa 2 = group of patients ≥1 yr old

Ryc. 31. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od wieku rozpoznania Nb (0,001).
Fig. 31. Survival probability in relation to the age at diagnosis of Nb.

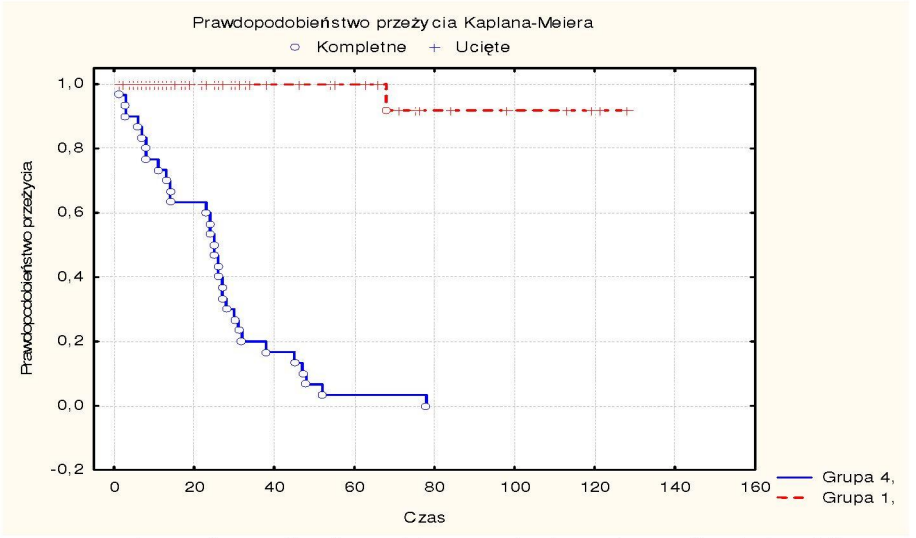


2 -stadium I, II, IVs; 3 - stadium III; 4 - stadium IV

2 = stage I, II, IVs; 3 = stage III, 4 = stage IV

Ryc. 32. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od stadium zaawansowania choroby (p=0,001).

Fig. 32. Survival probability in relation to the stage of disease (p=0,001).

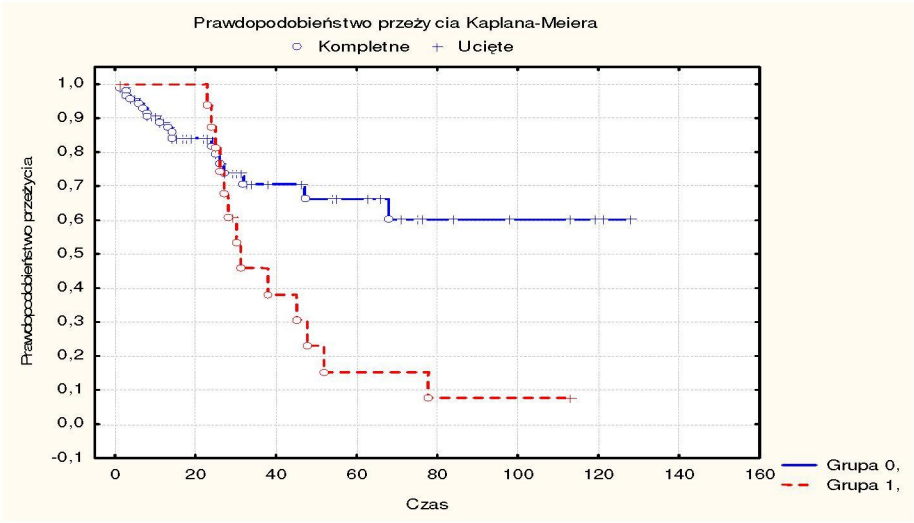


grupa 1 = uzyskano całkowitą remisję; grupa 4 =nie uzyskano całkowitej remisji

grupa 1 = complete remission was obtained; grupa 4= complete remission was't obtained

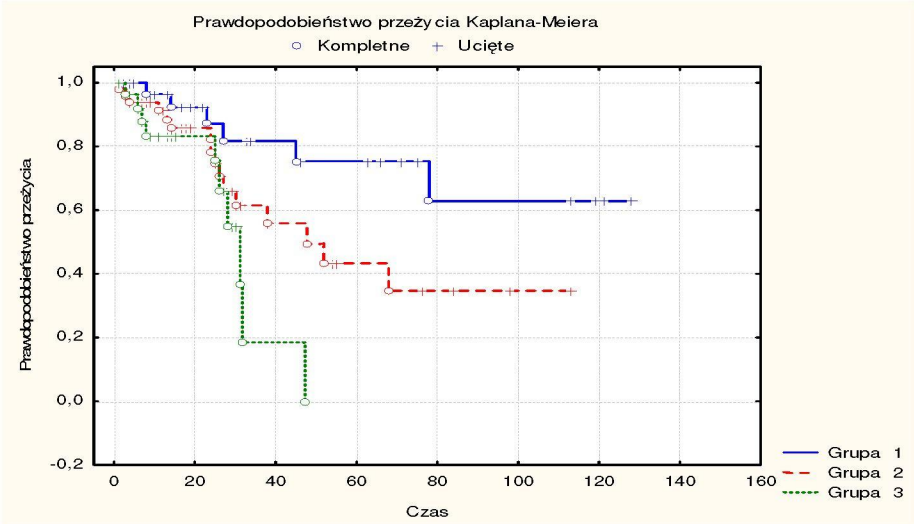
Ryc. 33. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od odpowiedzi na stosowane leczenie (całkowita remisja vs brak całkowitej remisji) (p=0,001).

Fig. 33. Survival probability in relation to treatment response (complete remission vs. lack of complete remission) (p=0,001).



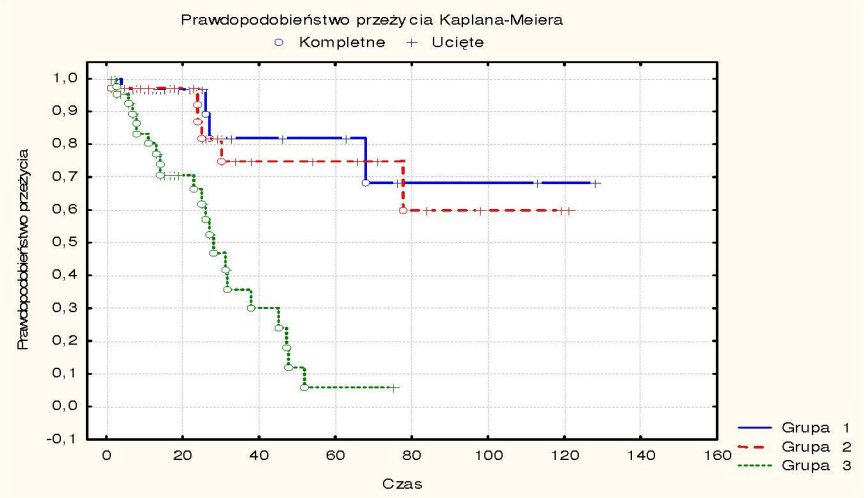
grupa 0 = nie stwierdzono wznowy; grupa 1 = stwierdzono wznowę
grupa 0 = relapse wasn't recognized, grupa 1 = relapse was recognised

Ryc. 34. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych z Nb w zależności od wystąpienia wznowy (p=0,004).
Fig. 34. Survival probability of Nb patients in relation to recurrence of disease (p=0,004).



grupa 1 = chorzy z guzami o największym wymiarze do 5 cm, grupa 2 = chorzy z guzami o największym wymiarze 5-10 cm, grupa 3 = chorzy z guzami o największym wymiarze >10 cm/
grupa 1 = patients with tumors < 5cm, grupa 2 = patients with tumors 5-10 cm, grupa 3 = patients with tumors >10 cm

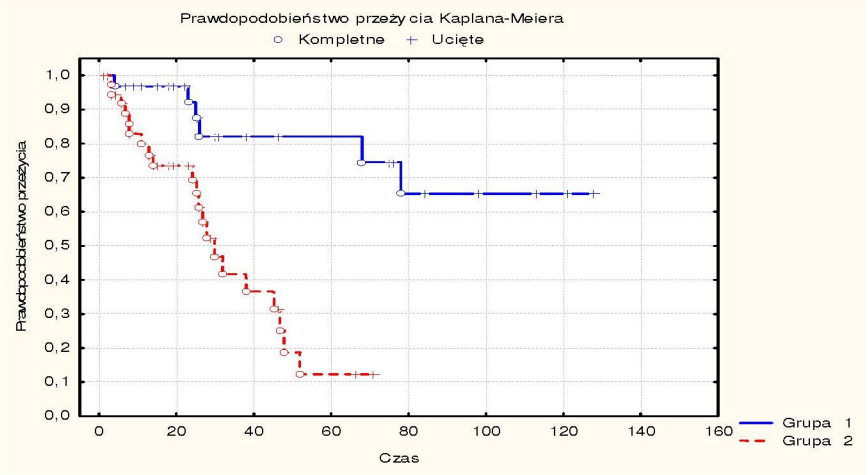
Ryc. 35. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od wymiaru guza pierwotnego Nb (p=0,09).
Fig. 35. Survival probability in relation to the primary tumor size (p=0,09).



grupa 1 = chorzy ze stężeniem LDH w surowicy w normie; grupa 2 = chorzy ze stężeniem LDH w surowicy > normy i mniejszym od 2x norma; grupa 3 = chorzy ze stężeniem LDH w surowicy > 2x norma/ *grupa 1= patients with normal level of serumLDH, grupa 2 = patients with serum LDH >1x normal level,grupa 3 = patients with serum LDH ≥ 2x normal level*

Ryc. 36. Krzywe przeżycia chorych z Nb w zależności od stężenia LDH w surowicy w momencie rozpoznania choroby (0,001).

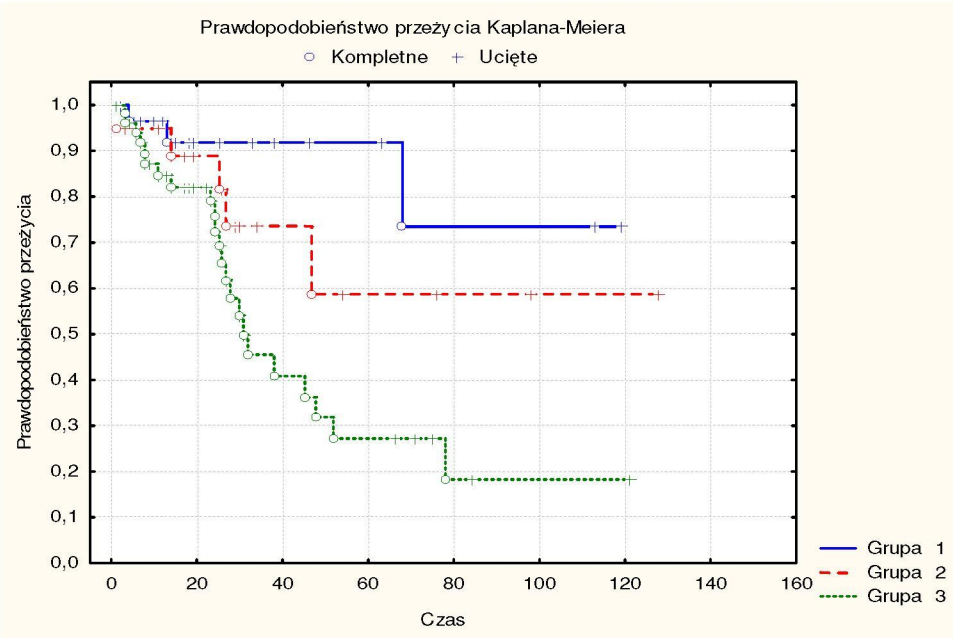
Fig. 36. Survival curves of patients with Nb in relation to serum LDH level at diagnosis (p=0,001).



grupa 1 = chorzy ze stężeniem ferrytyny w surowicy < 142 ng/ml; grupa 2 = chorzy ze stężeniem ferrytyny w surowicy ≥ 142 ng/ml/ *grupa 1= patients with serum ferritin <142 ng/ml; grupa 2= patients with serum ferritin >142 ng/ml*

Ryc. 37. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych z Nb w zależności od stężenia ferrytyny w surowicy w momencie rozpoznania choroby (0,02).

Fig. 37. Survival probability of the patients with Nb in relation to serum ferritin level at diagnosis (0,02).



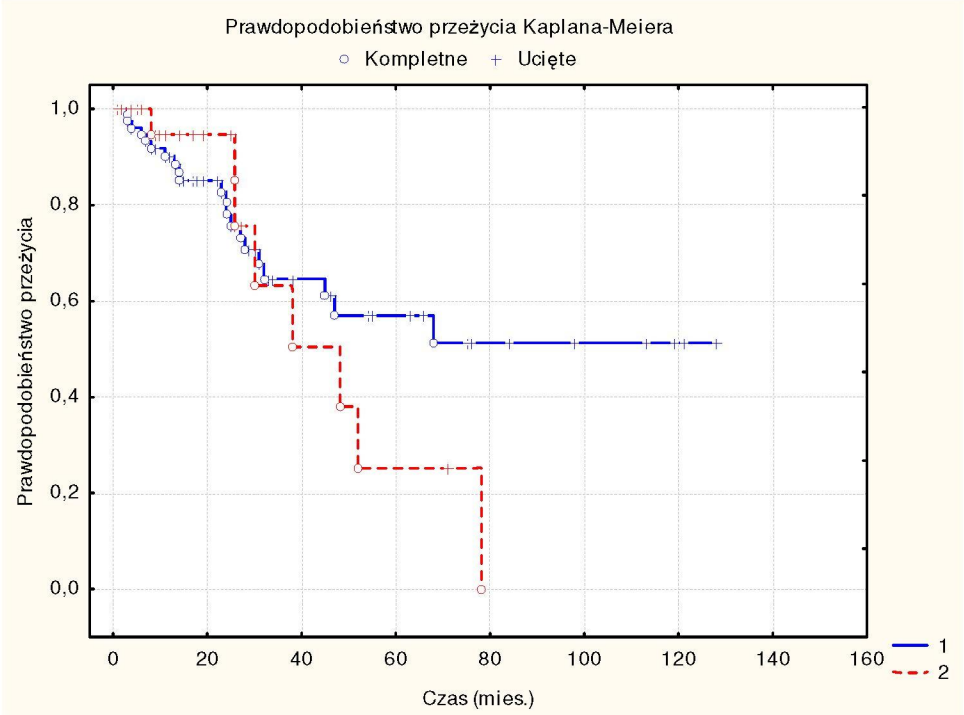
grupa 1 = chorzy z ilością wydalanego VMA w moczu w normie; grupa 2 =chorzy z ilością VMA w moczu >1x norma i mniejszym od 2x norma; grupa 3 = chorzy z ilością VMA w moczu > 2x norma/ *grupa 1= patients with urinary VMA excretion in normal level, grupa 2 = patients with urinary VMA excretion >1x normal level, grupa 3 = patients with urinary VMA excretion > 2x normal level*

Ryc. 38. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych z Nb w zależności od ilości wydalanego VMA w moczu w momencie rozpoznania choroby (p=0,06).

Fig. 38. Survival probablilty of Nb patients in relation to the urinary VMA excretion at diagnosis (p=0,06).

Parametry histologiczne

Dokonano jednoczynnikowej analizy przeżyć w odniesieniu do korzystnej i niekorzystnej budowy morfologicznej w guzach ocenianych przed chemioterapią. Większą szansę przeżycia stwierdzono w guzach o korzystnej histologii, choć różnice nie były statystycznie znamienne (p=0,42) (ryc. 39).



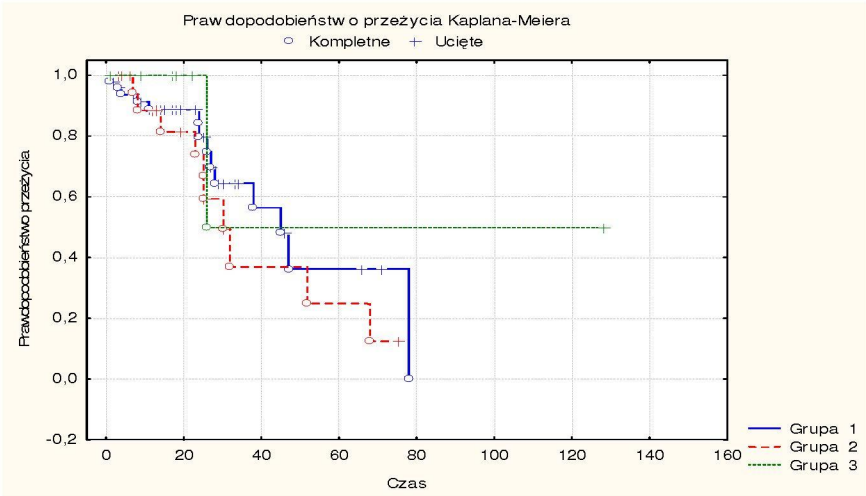
1= chorzy z z „korzystną histologią" guzów Nb; 2 = chorzy z „niekorzystną histologią" guzów Nb/
1 = patients with „favorable" histology of Nb tumor, 2 = patients with "unfavorable" histology of Nb tumor

Ryc. 39. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od prognostycznego typu histologicznego w grupie chorych z guzami ocenianymi przed chemioterapią (p=0,42).

Fig. 39. Survival probability in relation to prognostic histological type of Nb in patients with tumors assessed before chemotherapy (p=0,42).

Parametry genetyczne

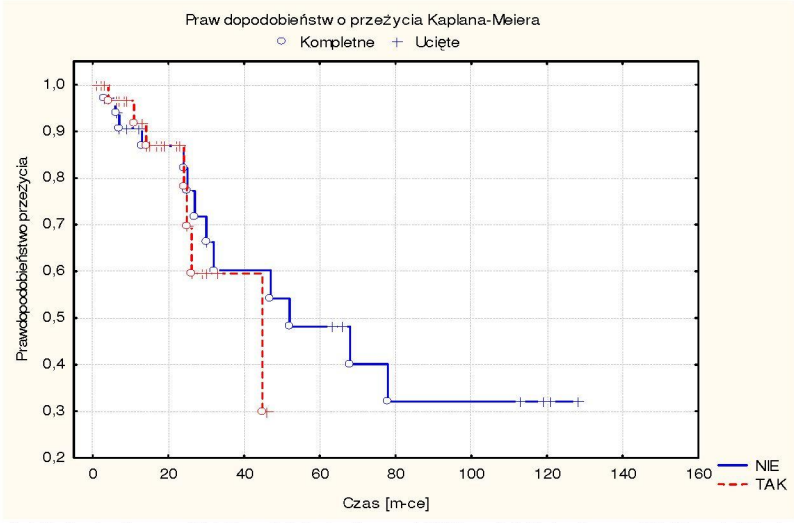
Prawdopodobieństwo przeżycia było nieznamiennie mniejsze u chorych z guzami o zwiększonej liczbie kopii *NMYC* > 2 (ryc. 40). Prawdopodobieństwo przeżycia chorych z obecnością częściowej trisomii 17q lub del(1p) w guzie i chorych bez tych aberracji nie różniły się znamiennie (ryc. 41 i 42).



grupa 1= pacjenci z obecnością 2 kopii *NMYC*; grupa 2 = pacjenci z obecnością amp *NMYC*; grupa 3 = pacjenci z obecnością >2 i <10 kopii *NMYC/*
grupa 1 =patients with 2 copies of MYCN, grupa 2= patients with MYCN amp, grupa 3 = patients with >2 and <10 copies of MYCN

Ryc. 40. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych z Nb w zależności od liczby kopii onkogenu *NMYC* w komórkach nowotworowych (p=0,57).

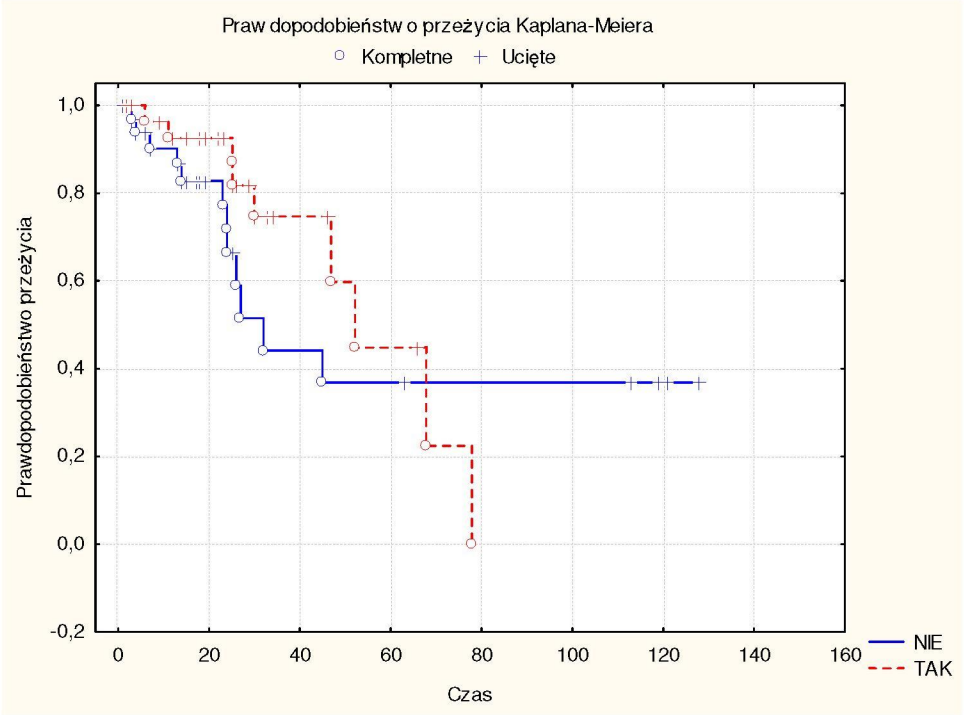
Fig. 40. Survival probability of the patients with Nb in relation to a number of MYCN copies in tumor Wells.



NIE = del(1p) nieobecna; TAK = del(1p) obecna/ *NIE = del(1p) absent, TAK = del(1p) present*

Ryc. 41. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych z Nb w zależności od obecności del(1p) w komórkach nowotworowych (p=0,60).

Fig. 41. Survival probability of the patients with Nb in relation to the presence of del(1p) in tumor cells.

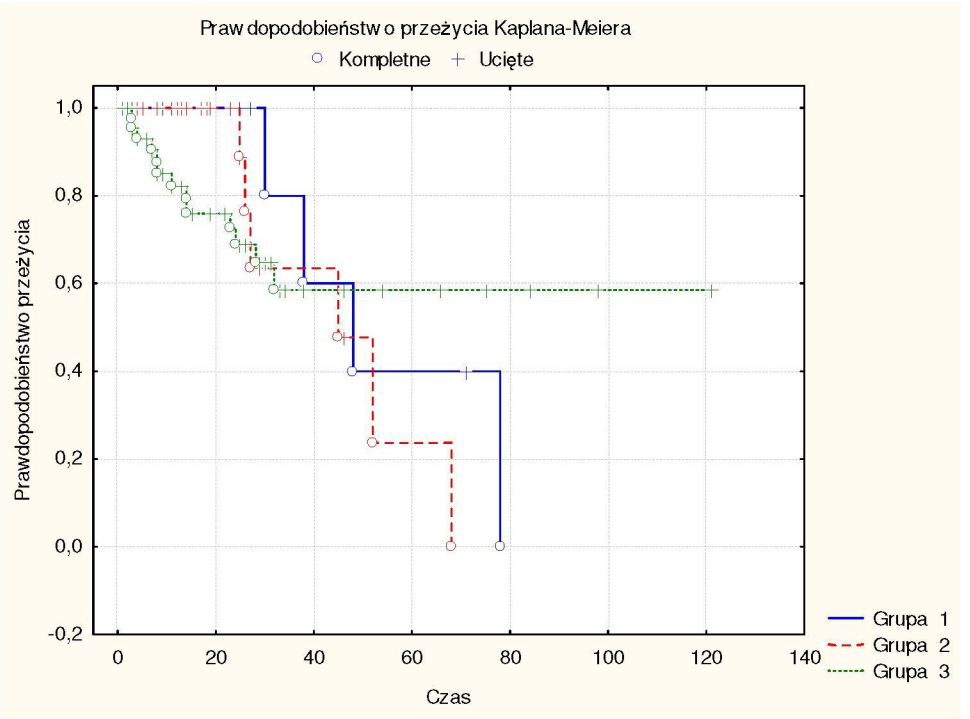


NIE = częściowa trisomia 17q nieobecna;
TAK = częściowa trisomia 17q obecna/
NIE = 17q gain absent,
TAK = 17q gain present

Ryc. 42. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych z Nb w zależności od obecności częściowej trisomii 17q w komórkach nowotworowych (p=0,45).
Fig. 42. Survival probability of the patients with Nb in relation to the presence of 17q gain in tumor cells (p=0,45).

Indeks proliferacyjny guzów Nb

Prawdopodobieństwo przeżycia chorych oceniane metodą Kaplana–Meyera było większe w grupie guzów o niskiej aktywności proliferacyjnej, choć różnica nie osiągnęła znamienności statystycznej (p=0,13) (ryc. 43).



grupa 1 = wysoka aktywność proliferacyjna; grupa 2 = średnia aktywność proliferacyjna; grupa 3 = niska aktywność proliferacyjna/
grupa 1 = high proliferative activity, grupa 2 =intermediate proliferative activity, 3 = low proliferative activity

Ryc. 43. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych z Nb w zależności od niskiego, średniego i wysokiego indeksu proliferacyjnego tkanek guzów (p=0,13).
Fig. 43. Survival probability of the patients with Nb in relation to PI value of tumor tissue (p=0,13).

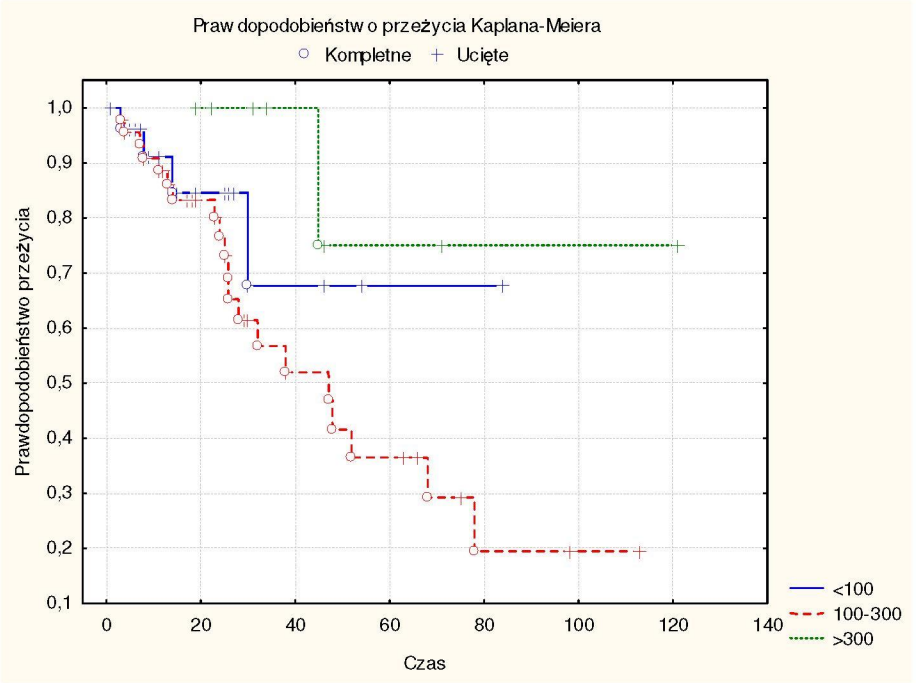
Wskaźniki angiogenezy

Gęstość naczyń w guzach Nb

Dla oceny prawdopodobieństwa przeżycia w zależności od gęstości unaczynienia guzów przyjęto następujące zakresy unaczynienia: niskie - poniżej 100 naczyń/mm^2; średnie 100-300 naczyń/mm^2; wysokie - >300 naczyń/mm^2. Największe szanse przeżycia stwierdzono u chorych z guzami słabo unaczynionymi (< 100 naczyń/mm^2), ale różnice w krzywych przeżycia nie osiągnęły znamienności statystycznej (p= 0,14). Najmniejsze prawdopodobieństwo przeżycia wykazano u chorych z guzami średnio unaczynionymi (100-300 naczyń/ mm^2) (ryc. 44).

Ekspresja VEGF i Flk-1 w guzach

Nie wykazano znamiennych różnic prawdopodobieństwie przeżycia w zależności od ekspresji czynnika VEGF i jego receptora (ryc. 45 i 46).

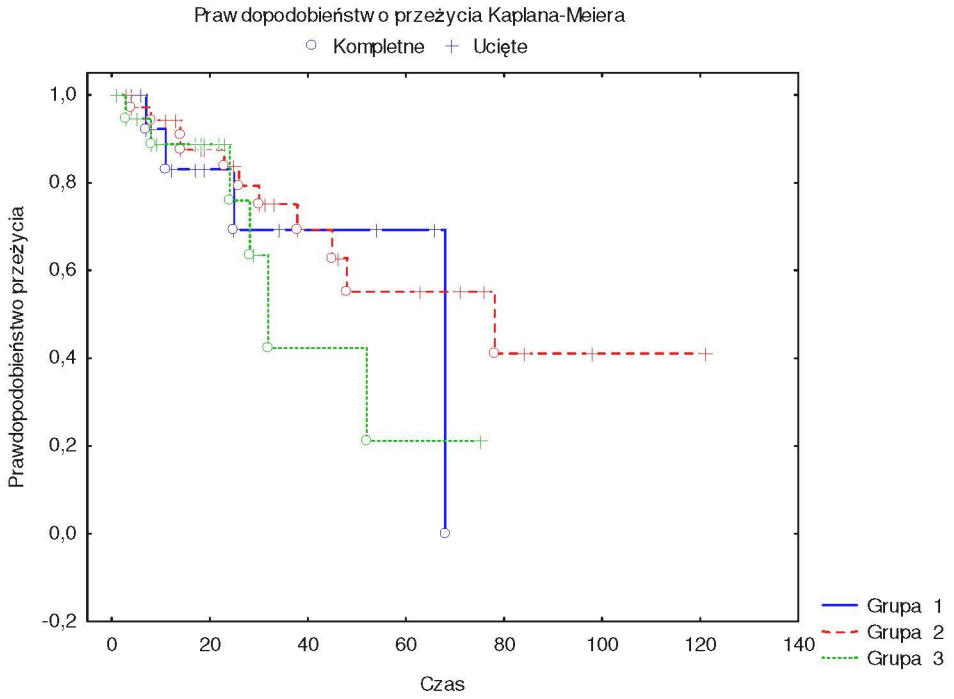


<100 = unaczynienie niskie <100 naczyń/mm^2, 100-300 = unaczynienie średnie 100-300/naczyń/mm^2, >300= unaczynienie wysokie >300 naczyń/mm^2

<100 = low vascular density, 100-300 = intermediate vascular density, >300 = high vascular density

Ryc. 44. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od gęstości unaczynienia tkanek guzów Nb (p=0,14).

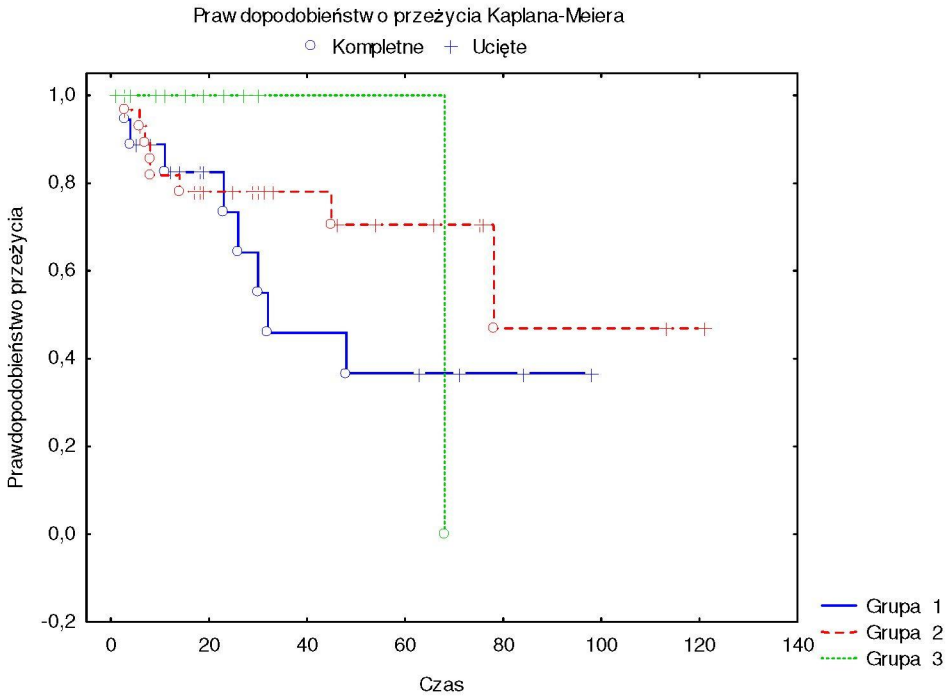
Fig. 44. Survival probability of the patients with Nb in relation to the vascular density of tumor tissue (p=0,14).



grupa 1 = ekspresja + ; grupa 2 = ekspresja ++; grupa 3 = ekspresja +++
grupa 1 = expression +, grupa 2 = expression ++, grupa 3 = expression +++

Ryc. 45. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od ekspresji VEGF w tkankach guzów Nb (p=0,70).

Fig. 45. Survival probability of the patients with Nb in relation to VEGF expression of tumor tissue (p=0,70).



grupa 1 = ekspresja +; grupa 2 = ekspresja ++; grupa 3 = ekspresja +++

grupa 1 = expression +, grupa 2 = expression ++, grupa 3 = expression +++

Ryc. 46. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od ekspresji Flk-1 w tkankach guzów Nb (p=0,31).

Fig. 46. Survival probability of the patients with Nb in relation to Flk-1 expression of tumor tissue (p=0,31).

5. DYSKUSJA

Przedmiotem niniejszej pracy była próba oceny znaczenia proliferacji komórek nowotworowych i angiogenezy w guzach pierwotnych dla przebiegu klinicznego nowotworów z grupy zwojaka zarodkowego współczulnego. Wybrane w przedstawianej pracy wskaźniki angiogenezy i proliferacji w zwojaku zarodkowym współczulnym odniesiono do klinicznych, ważnych prognostycznie cech choroby, do typu morfologicznego tkanki nowotworowej oraz do prognostycznie uznanych markerów genetycznych tego nowotworu.

Cechy kliniczne Nb jako wskaźniki prognozy

Materiał kliniczny poddany analizie liczył 110 chorych, u których rozpoznano nowotwory z grupy zwojaka zarodkowego współczulnego. Podobnie jak w wielu innych pracach dotyczących tego nowotworu pacjenci byli zróżnicowani pod względem stadium zaawansowania choroby, wieku, pierwotnej lokalizacji i wielkości ogniska pierwotnego oraz lokalizacji przerzutów. Sposoby terapii były dostosowane do grup ryzyka, wyznaczonych przez parametry prognostyczne. Wśród badanych znaleźli się chorzy z niskim stadium zaawansowania klinicznego choroby oraz korzystnymi czynnikami rokowniczymi, jak też chorzy, u których stwierdzano chorobę zaawansowaną o agresywnym przebiegu. Analiza tak różnorodnego materiału umożliwiła ocenę, czy i w jakim stopniu obraz i przebieg kliniczny choroby uzależniony jest od dwóch badanych cech tkanek Nb: zdolności do proliferacji i aktywności procesu angiogenezy w guzach.

Od lat 70-tych niekwestionowanymi i niezależnymi wskaźnikami rokowniczymi w Nb pozostają wiek chorego i stadium zaawansowania choroby. Te dwa parametry stanowią podstawę podziału chorych na grupy ryzyka [32,191], a ich wartość została statystycznie potwierdzona w obecnej pracy [32,191]. Charakterystyka kliniczna analizowanych w niniejszej pracy chorych wskazywała na przewagę pacjentów o niekorzystnych markerach prognozy, gdyż 76,4% z nich prezentowała zaawansowane stadium choroby (III i IV stadium zaawansowania klinicznego), a wiek > 1 roku życia stwierdzano u 65,5%. Przewaga pacjentów z chorobą zaawansowaną w momencie diagnozy w tym nowotworze jest zgodna z innymi doniesieniami światowymi [88,191].

Powszechnie przyjęty kliniczny system stratyfikacji chorych z rozpoznaniem Nb do dalszego postępowania terapeutycznego uwzględnia trzy grupy ryzyka i jest oparty na ocenie stadium zaawansowania, wieku chorego i liczbie kopii onkogenu *NMYC* w guzie [188]. Przeprowadzone stratyfikacje dużych grup chorych z rozpoznaniem Nb rejestrowanych w międzynarodowych programach badawczych (POG i SIOP) wskazują, że większość pacjentów w chwili rozpoznania należy do grupy wysokiego ryzyka. Niektóre grupy badawcze (grupy

amerykańskie POG, CCG) uwzględniają w swoich systemach stratyfikacyjnych także dodatkowe wskaźniki prognostyczne jak stopień ploidii DNA i typ histologiczny guza. Grupa europejska *Localized Neuroblastoma European Study Group*, prócz obecności amp *NMYC,* ocenia dodatkowo drugi marker cytogenetyczny, jakim jest del(1p), a w guzach niemowlęcych analizowane są dodatkowe cechy kliniczne choroby, jak obecność przerzutów do kości, do płuc i do ośrodkowego układu nerwowego oraz stężenie LDH w surowicy krwi [188]. W niniejszej pracy podział na grupy ryzyka oparto o ocenę stadium zaawansowania, wieku chorego i liczby kopii *NMYC.* Liczebność chorych należących do odpowiednich grup ryzyka była zbliżona do innych opublikowanych tego typu opracowań [188]. Większość chorych (55%) została zakwalifikowana do grupy wysokiego ryzyka.

Wartość prognostyczna pozostałych cech klinicznych Nb poddanych analizie w tej pracy nie została powszechnie zaakceptowana jako niezależne czynniki prognozy, choć niektóre opublikowane wyniki badań świadczą o ich wpływie na przebieg kliniczny choroby. Labrevens de Cervens i wsp. w badaniach dotyczących najstarszych pacjentów z rozpoznaniem tego nowotworu, stwierdzili niekorzystny wpływ obecności przerzutów do kości na wyniki terapeutyczne oceniając obecność przerzutów o tej lokalizacji jako czynnik złego rokowania [135]. Jak wykazały badania Minarda i wsp. w grupie dzieci najmłodszych - niemowląt obecność przerzutów kostnych również stanowi silny wskaźnik niekorzystnej prognozy [167]. Obserwacje te spowodowały, że obecność przerzutów do kości została w niniejszej pracy wyodrębniona w badaniach jako dodatkowy parametr kliniczny. Chorzy z takimi przerzutami stanowili 36% wszystkich analizowanych pacjentów. Przeprowadzona analiza statystyczna potwierdziła wartość tego parametru jako niezależnego czynnika ryzyka.

W wielu nowotworach, w tym również w niektórych nowotworach wieku dziecięcego (mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy, mięsak kości) narastające rozmiary ogniska pierwotnego zwiększają ryzyko rozsiewu choroby nowotworowej [238,246,274]. Dotychczas nie potwierdzono rokowniczej wartości tego parametru w Nb. Doświadczenie kliniczne wskazuje, że znaczne rozmiary ogniska pierwotnego u niemowląt nie przesądzają o niekorzystnym przebiegu choroby. Z drugiej strony u niektórych pacjentów już przy małych, nieuchwytnych w badaniach obrazowych rozmiarach ogniska pierwotnego dochodzi do rozsiewu choroby i tworzenia się odległych przerzutów, co ma zasadniczy wpływ na ostateczne rokowanie [239]. Wartość prognostyczna rozmiaru ogniska pierwotnego w guzach Nb została poddana analizie w tej pracy. Większe ognisko pierwotne powyżej 5 cm w chwili diagnozy znaleziono u 65,5% dzieci, a u 26,4% chorych największy wymiar guzów przekraczał 10 cm. W analizie wieloczynnikowej ten parametr okazał się jednym z niezależnych czynników ryzyka, natomiast w jednoczynnikowej wpływ wielkości ogniska pierwotnego na przeżycie pacjentów pozostawał na granicy istotności statystycznej (p=0,09).

Kolejną cechą kliniczną Nb rozpatrywaną wśród czynników ryzyka była lokalizacja ogniska pierwotnego. Lokalizacja w nadnerczach była dotychczas opisywana jako gorsza rokowniczo w porównaniu do innego umiejscowienia ogniska pierwotnego tego nowotworu [35,191]. W niniejszej pracy zaobserwowano największą liczbę zgonów wśród chorych z nadnerczową lokalizacją guzów (21/59=34% chorych zmarło) w porównaniu z chorymi, u których guzy rozwijały się pozanadnerczowo (w okolicy pozaotrzewnowej – 10/38=27% chorych zmarło), lecz analiza statystyczna nie potwierdziła istotnej wartości rokowniczej tego parametru.

W niektórych klasyfikacjach prognostycznych stosowanych w protokołach terapeutycznych w Nb dodatkowym wskaźnikiem podlegającym ocenie są markery biochemiczne: stężenie LDH i ferrytyny w surowicy krwi [32,257]. Wzrost stężenia enzymu LDH, markera komórek ulegających rozpadowi, świadczy o szybkiej proliferacji nowotworu i jest cennym wskaźnikiem prognozy nie tylko w Nb, ale i w innych nowotworach [32,98]. Prognostyczną wartość drugiego wskaźnika – ferrytyny zwłaszcza u chorych z rozpoznaniem Nb w niskim stadium klinicznym i z niekorzystną budową histologiczną udowodniły badania Evans i wsp. [69]. W przedstawianym materiale wykazano korelację obu tych markerów biochemicznych z zaawansowanym stadium choroby, wielkością guza i lokalizacją nadnerczową, a analiza wieloczynnikowa potwierdziła ich wartość jako czynników ryzyka. Trzecim parametrem biochemicznym ocenianym w tej pracy była ilość kwasu VMA wydalanego w moczu. Poziom VMA w moczu jest wykorzystywany głównie jako marker diagnostyczny dla Nb [191,17]. Marker ten może być też oceniany jako wskaźnik uzyskiwanej odpowiedzi na leczenie lub wznowy nowotworu, lecz badania Simon i wsp. nie wykazały jego znaczącej wartości rokowniczej [236]. W przedstawianej pracy stwierdzono w analizie wieloczynnikowej, że zwiększona ilość wydalanego VMA stanowi czynnik ryzyka w Nb.

Budowa histologiczna guzów Nb jako czynnik prognostyczny

Ważnym i niezależnym czynnikiem rokowniczym jest typ morfologiczny guzów Nb i stopień ich dojrzałości. Budowa histologiczna guzów jest uwzględniana do stratyfikacji chorych w protokołach terapeutycznych amerykańskich grup POG i CCG [45]. Budowa morfologiczna i stopień dojrzałości Nb zależy nie tylko od cech samych komórek nowotworowych, ale także od udziału podścieliska z obecnością komórek Schwanna w strukturze tkanki nowotworowej. Jak dowiodły prace Mora i wsp. oraz Ross'a i wsp. komponenta neuroblastyczna guzów (zwłaszcza w typach różnicujących się) nie jest jednorodna i składa się z komórek o zróżnicowanej charakterystyce biologicznej. Wśród komórek nowotworowych w Nb wyodrębnione zostały komórki typu I o cechach komórek pierwotnych pochodzących z cewy nerwowej, typu N – z cechami różnicowania neuronowego i typu S – z cechami komórek Schwanna. Te i inne prace wskazują

na wspólne pochodzenie neuroblastów i komórek Schwanna w tkance Nb [172,174,208].

W niniejszej pracy analizy morfologicznej guzów Nb zgodnie z klasyfikacją Shimada dokonano w dwóch grupach w uzależnieniu od wcześniej przeprowadzonej chemioterapii, gdyż leczenie cytotoksyczne może indukować stopniowe dojrzewanie neuroblastów i zmieniać typ morfologiczny tego nowotworu [4,172]. Istotnie, w grupie guzów ocenianych po chemioterapii okazało się, że typ częściowo dojrzały (GNB) był rozpoznawany częściej niż w grupie guzów ocenianej przed chemioterapią (33% vs 9%). Obecność zmian wstecznych w tkankach Nb po leczeniu cytotoksycznym pod postacią krwotoków, martwicy i obecności włókien spowodowała trudności w określeniu podtypu guzów GNB. Ze względu na zmiany wsteczne w guzach po chemioterapii niemożliwe też było przeprowadzenie w tej grupie klasyfikacji prognostyczno-morfologicznej. Należy podkreślić, iż stopień martwicy w guzach Nb po przeprowadzonej chemioterapii nie jest jednoznacznym czynnikiem rokowniczym, zwłaszcza w guzach zlokalizowanych [168]. Potwierdziły to obserwacje przeprowadzone w niniejszej pracy.

W guzach ocenianych przed zastosowaniem chemioterapii wyniki przedstawianych w pracy badań potwierdziły rolę budowy histologicznej jako niezależnego czynnika rokowniczego. Wszyscy chorzy z guzami bogatopodścieliskowymi w grupie ocenianej przed chemioterapią uzyskali pozytywną odpowiedź na leczenie, w postaci utrzymującej się całkowitej remisji choroby [191,232]. U większości chorych z guzami ocenianymi po chemioterapii jako GNB stwierdzono brak korzystnej odpowiedzi na leczenie (9/16 chorych), tj. brak remisji całkowitej. Zatem w guzach po przeprowadzonej chemioterapii histologiczne rozpoznanie typu GNB nie może być uznawane jako korzystny czynnik prognostyczny. Można przypuszczać, że rozpoznawany po leczeniu GNB u części chorych uformował się z guzów mniej dojrzałych w wyniku indukcji dojrzewania przez cytostatyki. Jak wykazały badania Mora i wsp., indukcja dojrzewania guzów skąpopodścieliskowych przez chemioterapię ostatecznie nie wpływa korzystnie na przeżycie pacjentów i takie guzy wykazują tendencję do późnych wznów [172]. Analiza rozpoznań histologicznych w tej pracy dotycząca pacjentów zmarłych wykazała, że wśród guzów ocenianych po chemioterapii, aż w 33% przypadków rozpoznawano typ GNB. Agresywny przebieg kliniczny tych częściowo dojrzałych nowotworów Biedler i wsp. tłumaczy zdolnością przekształcania się komórek o właściwościach komórek Schwanna (typu S) w komórki typu neuroblastycznego (typu N) w guzach o budowie GNB po terapii cytotoksycznej [21,22,23].

W niniejszej pracy typ UN i POO zwojaka zarodkowego współczulnego częściej stwierdzano u chorych w IV stadium zaawansowania klinicznego choroby, zwłaszcza z obecnością przerzutów do kości oraz u pacjentów z wysokim stężeniem LDH w surowicy krwi, a więc te niskozróżnicowane typy Nb pozostawały

w związku z klinicznymi wskaźnikami złego rokowania. Pośrednio o agresywności tego typu guzów i ich tendencji do naciekania okolicznych tkanek świadczy fakt, że w połowie przypadków guzy o tym typie morfologicznym okazały się nieoperacyjne. Analizując związek markerów biochemicznych z typem histologicznym nowotworu zauważono, że zwiększone wydalanie VMA stwierdzano częściej u pacjentów z guzami Nb o pewnych cechach zaczynającego się różnicowania (guzy niskozróżnicowane i różnicujące się), podczas gdy w grupie chorych z typem niezróżnicowanym, wydalanie kwasu VMA nie przekraczało poziomu normy, zarówno w grupie badanej przed- jak i po chemioterapii. Potwierdza to dotychczasowe opinie, iż w guzach niezróżnicowanych synteza katecholamin bywa upośledzona i niedokończona, czego wyrazem bywa podwyższona ilość kwasu HVA w moczu na niekorzyść VMA [191].

W piśmiennictwie zostały opisane przez Georgera i wsp.[85] rzadkie przypadki guzów ocenionych jako GN, które w dalszym przebiegu klinicznym dały przerzuty lokalne. W guzach takich stwierdza się często pewne cechy niedojrzałości komórek zwojowych i dlatego są one określane jako „graniczne" GNB [85,115]. W prezentowanym materiale przykładem takiej postaci Nb w opisywanym materiale był guz, który rozwinął się u 12 letniej pacjentki z guzem w stadium II, u której 15 miesięcy po zakończeniu leczenia pojawiły się przerzuty w okolicznych węzłach chłonnych.

Guzy Nb rozwijające się u dzieci < 1 roku życia należą do dobrze rokujących niezależnie od typu histologicznego. Badania wykonane w przedstawianej pracy wykazały, że w wieku niemowlęcym najczęściej rozpoznawane były guzy niezróżnicowane i niskozróżnicowane. Uzyskiwane w tym wieku dobre wyniki leczenia potwierdzają rolę wieku, jako ważnego elementu klasyfikacji prognostyczno-morfologicznej, gdyż mniej zróżnicowana budowa guzów w wieku niemowlęcym nie stanowi czynnika ryzyka.

Istotnym elementem klasyfikacji Shimady jest aktywność mitotyczna mierzona indeksem MKI [232]. Prace innych autorów udowodniły ścisłą korelację między oceną puli komórek proliferujących znakowanych p/ciałami p/w PCNA lub Ki-67 i morfologiczną oceną komórek proliferujących przy pomocy MKI. Badania Rudolpha wykazały większą czułość i przydatność p/ciał p/w Ki-67 niż PCNA, jako wskaźnika rokowniczego, dlatego w niniejszej pracy MKI stosowany w klasycznej klasyfikacji Shimada zastąpiony został przez indeks proliferacyjny oznaczany w oparciu o p/ciała Ki-67 [185,211]. Que i wsp. w 1995 roku [185] udowodnił, że MKI koreluje z aktywnością proliferacyjną i wykazali, że niski PI <10% w tkance Nb jest wskaźnikiem lepszej prognozy, niż z PI> 30%, które charakteryzuje zły przebieg kliniczny. W niniejszej pracy jako kryteria niskiej aktywności proliferacyjnej przyjęto wartość PI <20%, gdyż w tym zakresie mieściły się wartości IP wszystkich guzów dojrzałych typu GN. Jako wysoką aktywność proliferacyjną przyjęto wartość PI > 40 %, która występowała w 58% przypadków, a więc z częstością porównywalną do częstości występowania

niekorzystnych prognostycznie cech klinicznych. Wartości wskaźnika IP wykorzystano w tej pracy jako element klasyfikacji do grupy „korzystnej" i „niekorzystnej" rokowniczo. W wyodrębnionych grupach guzów „korzystnych" i „niekorzystnych" rokowniczo przeprowadzona analiza prawdopodobieństwa przeżycia potwierdziła znamiennie większe prawdopodobieństwo przeżycia guzów o budowie „korzystnej" rokowniczo. To spostrzeżenie potwierdza rokowniczą wartość klasyfikacji morfologiczno-prognostycznej w oparciu o IP.

Parametry genetyczne w odniesieniu do klinicznych i histologicznych wskaźników prognostycznych

Badania genetyczne przeprowadzone w szerokim zakresie w zwojaku zarodkowym współczulnym dowiodły istnienia charakterystycznych i powtarzających się zmian genetycznych w tym nowotworze [143,225,228]. Wyodrębniono zmiany, które posiadają znaczenie rokownicze i mają związek z agresywnym klinicznym przebiegiem choroby. Do najbardziej znaczących prognostycznie markerów cytogenetycznych w Nb zaliczono amplifikację onkogenu *NMYC*, del(1p) i częściową trisomię 17q [180]. Dokonana w obecnej pracy analiza wybranych wskaźników proliferacji i angiogenezy odnosiła się do tych trzech markerów. Częstość występowania każdej z trzech badanych zmian cytogenetycznych mieściła się w granicach częstości ich występowania w guzach Nb ocenianej w innych pracach. Występowanie amp *NMYC* w Nb waha się w różnych opublikowanych badaniach od 19 do 30% [27,228,237]. W analizowanym materiale guzy z amplifikacją *NMYC* występowały z częstością 29%. Większość badanych w niniejszej pracy guzów z amplifikacją rozwijała się u chorych z niekorzystnymi prognostycznie cechami klinicznymi i biochemicznymi oraz gorszą odpowiedzią na leczenie (jedynie 35% chorych z guzami z amplifikacją przeżyło), co potwierdza wielokrotnie udokumentowaną w piśmiennictwie rolę amp *NMYC* jako niekorzystnego czynnika rokowniczego w Nb [27,35,228]. Częstość występowania drugiej z badanych zmian cytogenetycznych - delecji krótkiego ramienia chromosomu 1p w guzach Nb oceniona została w różnych badaniach w szerokich granicach 22-89%, ze średnią częstością 30% [31,148,221]. W kilku niezależnych badaniach wykazany został związek del(1p) ze złą prognozą, choć niektóre prace dostarczają dowodów, że jej obecność nie wpływa na całkowite przeżycie chorych, a jedynie predysponuje do wznowy choroby nowotworowej [9,153,210]. Częstość występowania tej aberracji chromosomalnej w przedstawianej pracy wynosiła 50%. Nie stwierdzono zależności występowania del(1p) z prognostycznymi parametrami klinicznymi ani nie wykazano jej wpływu na czas przeżycia chorych lub na wystąpienie wznowy choroby nowotworowej [27].

W publikowanych pracach istnieją rozbieżności dotyczące wyników badań częstości występowania częściowej trisomii 17q w Nb. Wcześniejsze badania Caron'a i wsp. przeprowadzone metodą Southern blot określiły jej częstość w Nb na 38% [42]. Badania przeprowadzone metodą CGH wykazały obecność

tej aberracji chromosomalnej w 50% guzów Nb i uznano, że jest to najczęściej występująca aberracja chromosomalna w Nb i zarazem wskaźnik złej prognozy [27,28,149,192,266]. Częstość występowania częściowej trisomii 17q w materiale przedstawianym w tej pracy, oznaczanej metodą FISH, wynosiła 48%. W guzach z obecnością częściowej trisomii 17q podobnie jak i w przypadku guzów z obecnością del(1p) nie znaleziono związku tych aberracji z prezentowanymi przez pacjentów cechami klinicznymi. Nie stwierdzono też wpływu obecności częściowej trisomii 17q na czas przeżycia chorych. Brak potwierdzenia wpływu zarówno del(1p) jak i częściowej trisomii 17q na czas przeżycia chorych i występowanie wznów choroby mógł być wynikiem stosunkowo krótkiego okresu prowadzonej obserwacji chorych (średnio 2 lata i 4 miesiące).

Z opublikowanych prac wynika, że przyczyną różnej częstości wykrywania poszczególnych zmian cytogenetycznych w Nb w publikowanych pracach może być dobór chorych o zróżnicowanej charakterystyce klinicznej, różne stosowane metody badawcze, a także heterogenność tkanek Nb w obrębie tych samych guzów. Jak dowiodły badania Kerbl'a i wsp. możliwe jest występowanie w guzie ogniskowej amp *NMYC* i ogniskowej del (1p) [121]. Interesujące są obserwacje Trakenbrota i wsp.[257], którzy w tym samym guzie Nb wykryli jednoczesne występowanie komórek Nb z disomią chromosomu 17 i komórek z częściową trisomią chromosomu 17q. Trakenbrot udokumentował także pojawianie się częściowej trisomii chromosomu 17q w miarę progresji guza nowotworowego, jako wynik ewolucji zmian genetycznych, która dokonuje się wraz z progresją nowotworu. Te obserwacje sugerują, iż częściowa trisomia 17q może należeć do wtórnych zmian genetycznych nabywanych wraz z progresją Nb. [257].

W ostatnich latach podejmowane są próby prognostyczno-genetycznych klasyfikacji Nb w zależności od współwystępowania charakterystycznych dla tego nowotworu zmian genetycznych. Zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Łastowską i wsp. [148] najlepsze rokowanie mają guzy, w których nie stwierdza się żadnej z trzech analizowanych zmian genetycznych: amp *NMYC*, del(1p) i częściowej trisomii 17q. Guzy z obecnością wszystkich trzech aberracji w tej klasyfikacji zaliczane są do guzów o największej agresywności. Propozycje takiej klasyfikacji zostały opublikowane także przez Jacksona i wsp [111]. W obu tych klasyfikacjach przyjmuje się współistnienie trzech zaburzeń genetycznych: amp *NMYC*, del 1p i częściowej trisomii 17q jako grupy guzów o najwyższego ryzyka [111,148]. W prezentowanej pracy przeprowadzone obserwacje kliniczne potwierdziły rolę tych markerów cytogenetycznych jako czynników prognozy. Dwóch pacjentów, u których rozwijały się guzy z obecnymi trzema badanymi zmianami cytogenetycznymi demonstrowali agresywną klinicznie postać Nb, natomiast u większości chorych (80%), u których w tkankach Nb nie stwierdzono żadnego z badanych markerów obserwowano łagodny przebieg kliniczny Nb.

W niektórych pracach autorzy zwracają uwagę na częstą koincydencję amp *NMYC* i obecności del(1p) w Nb [9,104]. Jednoczesną obecność obu tych zmian

stwierdzono w prezentowanym materiale badawczym w przypadku 23% guzów. Niewykluczone, że w tej pracy wpływ na stosunkowo niską częstość współwystępowania amp *NMYC* i del(1p) miała stosowana w części przypadków chemioterapia poprzedzająca badania genetyczne, która mogła zahamować ewolucję klonów komórek Nb z tymi zmianami genetycznymi.

Stopień ploidii DNA w komórkach Nb również stanowi cenny marker prognostyczny, zwłaszcza w odniesieniu do guzów rozwijających się u niemowląt [144]. Dotychczasowe prace dotyczące typu ploidii DNA w Nb wykazały, że typ di- i tetraploidii przeważa w guzach rozwijających się u pacjentów >1 roku życia i w skojarzeniu z innymi zaburzeniami strukturalnymi chromosomów oraz w zaawansowanym stadium choroby [118]. Badania Looka i wsp. przeprowadzone na dużym materiale 298 guzów Nb stwierdziły występowanie guzów di- i tetraploidalnych z częstością 34%, jednakże był to materiał wyselekcjonowany wyłącznie do guzów rozwijających się u niemowląt [145]. Badania przeprowadzone przez Ladenstein wsp. w guzach zlokalizowanych Nb (st. I-III°) wykryły obecność di- tetraploidii w 37% przypadków. W materiale badanym w tej pracy analiza ploidii DNA, przeprowadzona była w 48 tkankach Nb pobranych od chorych, wśród których większość była w wieku >1 roku życia, i w stadium zaawansowanym choroby. Stwierdzono przewagę guzów di- i tetraploidalnych (66%). Zaobserwowany związek di-/tetraploidii z niekorzystnymi cechami klinicznymi (zaawansowane stadium choroby, podwyższony poziom LDH) potwierdza wyniki opublikowane przez Ladenstein i wsp. [136].

W pracach różnych autorów stwierdzono związek występowania dwóch markerów cytogenetycznych: amp *NMYC* oraz del(1p) z typem di-/tetraploidii DNA w komórkach Nb [102,117,136]. W niniejszej pracy zaobserwowano, że występowanie niekorzystnego markera cytogenetycznego - amp *NMYC* częściej wiąże się z niekorzystnie rokującą di-i tetraploidią (w 6/21 guzów) lub z hipodiploidią (2/5 guzów) w porównaniu z guzami triploidalnymi, gdzie wśród sześciu badanych guzów stwierdzono tylko w jednym obecność amp *NMYC*. Ta obserwacja potwierdza pogląd o hamującym wpływie amp *NMYC* na dojrzewanie tkanek Nb [145]. Przeprowadzona analiza występowania markerów cytogenetycznych w poszczególnych typach histologicznych Nb wykazała, że guzy z obecnością amp *NMYC* i del(1p) często (73%) mają budowę niezróżnicowaną lub niskozróżnicowaną. W komórkach guzów dojrzałych (GN) nie stwierdzono obecności amp *NMYC*, ale znaleziono zmiany cytogenetyczne pod postacią del(1p) i częściowej trisomii 17q.

Wszystkie wyżej opisane czynniki prognostyczne zostały w obecnej pracy użyte jako odnośnik dla oceny prognostycznej wartości indeksu proliferacyjnego guzów Nb i aktywności angiogenezy w tym nowotworze.

Wartość prognostyczna aktywności proliferacyjnej guzów Nb

W wielu guzach złośliwych indeks proliferacji tkanki nowotworowej stanowi wartościowy czynnik prognostyczny [129,130,165]. Obserwacje różnorodnego biologicznego zachowania zwojaka zarodkowego oraz możliwe różne drogi ewolucji: jak wzrost guza z progresją choroby lub zahamowanie rozwoju z pobudzeniem różnicowania się tkanki nowotworowej świadczą o szczególnej roli, jaką odgrywa aktywność proliferacyjna w przebiegu tego nowotworu [26]. Prognostyczną wartość aktywności tego procesu mierzoną indeksem proliferacyjnym w zaawansowanych stadiach Nb potwierdziły badania przeprowadzone w kilku niezależnych ośrodkach [129,130,165]. W roku 1997 w analizie wieloczynnikowej Rudolph i wsp. wykazali, że w tym nowotworze IP jest niezależnym czynnikiem prognostycznym i koreluje z długością przeżycia pacjentów, zwłaszcza w zaawansowanym stadium klinicznym [211]. Wysokie wartości IP badanych w tej pracy guzów w zaawansowanym stadium klinicznym choroby były zgodne z obserwacjami innych autorów [129,130,165,211]. Ocena IP w odniesieniu do guzów rozwijających się w wieku niemowlęcym posiada mniejszą wartość prognostyczną [129,211]. Wyniki uzyskane obecnie potwierdziły wcześniejsze obserwacje dotyczące wysokiej aktywności proliferacyjnej guzów rozwijających się u niemowląt, z tendencją do malejącej aktywności proliferacyjnej guzów wraz z wiekiem [165]. Warto podkreślić, że u niemowląt, mimo początkowo dużej dynamiki wzrostu nowotworu, czynnik ten nie wpływa negatywnie na przebieg kliniczny choroby.

W obecnej pracy ocena odpowiedzi na leczenie w odniesieniu do trzech grup chorych z niskim, średnim i wysokim IP nie wykazała dużych różnic w częstości osiąganych całkowitych remisji, choć niepowodzenia leczenia - zgony częściej (30% chorych vs 23% chorych) obserwowano u chorych z wyższymi (IP>20%) wartościami indeksu proliferacyjnego (30% chorych vs 23% chorych). Przypuszczalnie guzy o większej aktywności proliferacyjnej początkowo lepiej odpowiadają na stosowane leczenie cytostatykami, gdyż w tych guzach większa pula komórek nowotworowych znajduje się w cyklu podziałowym, a jak wiadomo tylko komórki będące w fazie cyklu podziałowego są wrażliwe na działanie chemio – i radioterapii. Natomiast prawdopodobieństwo przeżycia chorych z guzami o wyższym IP było mniejsze niż tych z guzami o niższym indeksie proliferacyjnym. Krótsze przeżycie chorych z guzami o wysokim indeksie proliferacyjnym wykazane w tej pracy potwierdza rokowniczą rolę tego wskaźnika. Analiza wieloczynnikowa potwierdziła znaczenia IP jako niezależnego czynnika rokowniczego, mimo że w badanym materiale część guzów stanowiły guzy niemowlęce.

Rudolph i wsp stwierdzili niewielki wpływ leczenia cytotoksycznego na aktywność proliferacyjną guzów Nb [211]. Podobnie w niniejszej pracy aktywność proliferacyjna była oceniana w części (41 guzów) przed oraz części (37 guzów)

po chemioterapii i stwierdzono jedynie niewielkie i nieznamienne różnice w wartościach IP w obu grupach guzów (mediana 35,6% vs. 34,0%).

Ocena związku między wartością IP tkanek Nb, a klinicznymi wskaźnikami prognozy w prezentowanym materiale wykazała, iż ogniska pierwotne o większych wymiarach (>5 cm) charakteryzowały się wyższą aktywnością proliferacyjną. Szybki wzrost tych guzów i osiągane znaczne rozmiary wydają się być konsekwencją dużej aktywności proliferacyjnej. Na uwagę zasługuje wykazanie wyższych wartości IP w guzach o lokalizacji śródpiersiowej w porównaniu z wartościami IP guzów o lokalizacji brzusznej. Lokalizacja śródpiersiowa jest rzadka, lecz należy do dobrze rokujących wskaźników prognostycznych [191]. Korzystny przebieg kliniczny guzów o lokalizacji śródpiersiowej, mimo ich znacznej aktywności proliferacyjnej, może więc być uwarunkowany innymi, niezależnymi od aktywności proliferacyjnej czynnikami biologicznymi, a także wczesnymi objawami klinicznymi i możliwą wcześniejszą diagnozą Nb o tej lokalizacji. Terapia onkologiczna Nb w przypadkach guzów zlokalizowanych w śródpiersiu jest więc podejmowana często w niskich stadiach zaawansowania nowotworu [191]. Przeprowadzone badania markerów biochemicznych, które ujawniły podwyższone poziomy LDH w surowicy u chorych z Nb o wysokiej aktywności proliferacyjnej i statystycznie znamienną korelację wartości IP i podwyższonych poziomów LDH w surowicy. Tę zależność potwierdzają badania histologiczne, w których stwierdza się obecność pól martwicy w guzach o znacznej dynamice wzrostu. Powstające obszary martwicy są prawdopodobnie rezultatem niedostatecznie wykształconej sieci naczyń w tkance nowotworowej i stają się źródłem LDH uwalnianego do surowicy krwi.

W kilku pracach podjęty został problem zależności aktywności proliferacyjnej od typu morfologicznego Nb. Stwierdzono najwyższe wartości IP w najmniej zróżnicowanych (typ UN i POO) postaciach tego nowotworu [130,165,232,277]. Niekorzystna histologia badanych w tej pracy guzów nowotworowych i wysoka aktywność proliferacyjna tkanek Nb rozpoznanych w grupie pacjentów zmarłych potwierdza wartość rokowniczą obu tych czynników.

Wpływ obecności markerów cytogenetycznych w komórkach Nb na aktywność proliferacyjną został wykorzystany w piśmiennictwie do podjęcia prób klasyfikacji genetyczno-morfologiczno-prognostycznej guzów z grupy zwojaka zarodkowego. Klasyfikacja ta dzieli Nb na trzy grupy ryzyka w oparciu o ocenę markerów genetycznych, aktywności proliferacyjnej wyrażonej przez MKI oraz typu histologicznego. Do grupy najwyższego ryzyka zaliczane są guzy z obecnością wszystkich trzech zaburzeń genetycznych: częściowej trisomii 17q, del(1p) i amp *NMYC,* oraz o budowie histologicznej UN lub POO i wysokim MKI [141]. W niniejszej pracy badania potwierdziły istnienie związku między wysokimi wartościami IP, a obecnością każdego z trzech markerów cytogenetycznych, choć nie były to zależności znamienne. W analizowanym materiale stwierdzono także związek wartości IP z typem ploidii DNA. Niższe wartości IP stwierdzono

w dobrze rokujących guzach triploidalnych. To spostrzeżenie jest zgodne z pracami innych autorów [90,169,144].

Ocena wartości prognostycznej wskaźników angiogenezyw guzach Nb

W wielu nowotworach udowodniony został wpływ aktywności procesu angiogenezy w tkankach Nb na przebieg choroby nowotworowej, ponieważ stopień unaczynienia tkanek guza jest decydujący dla inwazji i przerzutowania komórek nowotworowych. Jak wiadomo proces tworzenia naczyń krwionośnych jest kontrolowany przez liczne cytokiny, a część cytokin prócz wpływu na rozwój unaczynienia, działa także bezpośrednio stymulująco na proliferację komórek nowotworowych [95,267]. Jednakże podkreślić należy, że zależność między stopniem unaczynienia poszczególnych guzów nowotworowych i złą prognozą występuje tylko w części nowotworów złośliwych [3, 39,273]. Opublikowane dotychczas wyniki badań dotyczące angiogenezy w guzach z grupy nerwiaka zarodkowego wskazują na różną intensywność tego zjawiska w zależności od różnych cech biologicznych tych nowotworów.

Gęstość naczyń (MVD) w tkankach guzów Nb analizowanych w tej pracy była bardzo zróżnicowana (32-385 naczyń/mm^2) i podobne są obserwacje dotyczące unaczynienia tego nowotworu w badaniach opublikowanych przez innych autorów [40,268]. Wpływ chemioterapii na MVD w przedstawianym materiale guzów był niewielki, gdyż wartości MVD w grupie guzów ocenianych przed chemioterapią były porównywalne z wartościami MVD w grupie po chemioterapii. Dowodzi to, że leczenie cytostatykami nie wpływa w sposób zasadniczy na proces angiogenezy w zwojaku zarodkowym współczulnym.

Jogi i wsp.[112] przedstawili dowody, że aktywacja angiogenezy w Nb hamuje proces różnicowania komórek nowotworowych. W niniejszej pracy potwierdzeniem tej tezy były wyniki uzyskane w grupie guzów Nb ocenianych histologicznie przed rozpoczęciem chemioterapii. Wyniki tych badań wykazały istotne różnice w unaczynieniu guzów w zależności od typu histologicznego: od wysokiego unaczynienia guzów niezróżnicowanych do najniższego unaczynienia guzów dojrzałych (p=0,08). Niskie unaczynienie guzów o bogatym podścielisku może wynikać z hamującego wpływu komórek Schwanna na angiogenezę, gdyż komórki te posiadają zdolność produkowania inhibitorów angiogenezy, takich jak inhibitor metaloproteinaz TIMP-2, czynnik PEDF i białko SPARK [50,57,107].

W grupie guzów badanych po chemioterapii zależność ta nie była statystycznie znamienna, co może mieć związek z dojrzewaniem morfologicznym części guzów niezróżnicowanych do form bardziej dojrzałych (GNB) pod wpływem stosowanego leczenia.

Ze względu na niewielkie różnice w gęstości naczyń w grupie guzów badanych przed i po chemioterapii, analiza związku MVD z klinicznymi i genetycznymi

czynnikami prognostycznymi przeprowadzone zostały w przedstawianej pracy we wszystkich guzach łącznie, niezależnie od wcześniej stosowanego leczenia.

Wyniki badań innych autorów dotyczące korelacji unaczynienia guzów z przebiegiem klinicznym Nb są niejednolite [40,49,164]. Wynika to prawdopodobnie z faktu zróżnicowania klinicznego badanych grup chorych, jak i zróżnicowanych histologicznie grup badanych guzów. Nie bez znaczenia pozostaje także stosowanie różnych metod liczenia naczyń oraz subiektywna ocena i wybór przez badającego „pól gorących" w guzie. Najczęściej cytowana praca Meitar i wsp. dowodzi zależności wysokiego unaczynienia tkanek Nb z niekorzystnymi parametrami prognostycznymi: zaawansowaną klinicznie postacią nowotworu, obecnością amp *NMYC* i gorszymi wynikami leczenia [164]. Ribatti i wsp. w badaniach dotyczących mniejszej i heterogennej klinicznie grupy guzów Nb, odnotował szczególnie wysokie unaczynienie tkanki nowotworowej nie tylko w przypadku guzów zaawansowanych o gorszym rokowaniu, lecz także w dobrze rokującym stadium IVs [204]. Canete i wsp. nie znaleźli korelacji gęstości naczyń z żadnym z uznanych czynników prognostycznych (wiek, stadium, amp *NMYC*) [40]. W prezentowanej pracy wykazano odwrotną zależność unaczynienia tkanek Nb i wieku pacjenta w momencie diagnozy. Najlepiej unaczynione były guzy niemowlęce. Dobre wyniki leczenia, mimo bogatego unaczynienia guzów w wieku niemowlęcym przemawiają przeciw rozpatrywaniu gęstości unaczynienia jako czynnika prognostycznego u dzieci < 1 roku życia. Świadczy to też o istnieniu w niemowlęcych postaciach Nb mechanizmu regresji nowotworu, niezależnego od stopnia unaczynienia, co potwierdzają wyniki badań Tonini i wsp. [253]. Ocena gęstości naczyń w odniesieniu do pozostałych badanych cech klinicznych wykazała nieznamienne różnice. Nieznacznie wyższe unaczynienie guzów stwierdzono w I i II stadium klinicznym choroby w porównaniu z nowotworami bardziej zaawansowanymi. Wytłumaczeniem wyższego unaczynienia guzów rozpoznanych w niskich stadiach klinicznych w tej pracy jest fakt, że większość guzów w stadium I i II pochodziła od pacjentów w wieku niemowlęcym. Stwierdzenie mniejszej gęstości naczyń w guzach większych (>5 cm) wydaje się świadczyć o tym, że gwałtowna proliferacja tkanki nowotworowe w części guzów może wyprzedzać wolniej przebiegający proces angiogenezy. Nie dotyczy to wszystkich przypadków, gdyż w niektórych dużych guzach obserwowano wysoki stopień ich unaczynienia. Wykazano korelację niskiej gęstości naczyń w guzie z podwyższonym stężeniem LDH w surowicy krwi chorych, co przypuszczalnie wynika z nasilonego procesu martwicy guzów słabiej unaczynionych. Te wyniki badań związku wskaźników angiogenezy z kliniczną charakterystyką Nb zostały przez autorkę opublikowane [64].

W niniejszej pracy nie wykryto zależności między zdolnością komórek Nb do syntezy końcowych produktów syntezy katecholamin (adrenaliny i noradrenaliny), których metabolitem jest VMA, a markerem aktywności proliferacyjnej guza (IP) lub wskaźnikami angiogenezy.

Meitar i wsp. wykazali związek wysokiego MVD z niekorzystną odpowiedzią na leczenie i krótszym przeżyciem chorych [164]. W niniejszej pracy odpowiedź na leczenie również pozostawała w związku ze stopniem unaczynienia guzów, gdyż gorszą odpowiedź uzyskiwano w guzach o unaczynieniu >100/mm^2. Pozostaje do wyjaśnienia, dlaczego ostatecznie najniższe krzywe przeżycia uzyskano u chorych z guzami średnio unaczynionymi (100-300 naczyń), a nie w grupie chorych z guzami o największym stopniu unaczynienia. Czy lepsze wyniki leczenia guzów o unaczynieniu >300 naczyń/mm^2 niż guzów średnio unaczynionych są konsekwencją lepszej penetracji cytostatyków do tkanki nowotworowej? Ostateczne wyjaśnienie tego problemu wymaga przeprowadzenia badań na większym materiale.

W przedstawionej pracy, dla pełniejszej oceny angiogenezy, dokonano oceny aktywności cytokiny VEGF i jej receptora Flk-1 w tkankach Nb oraz u części chorych przed rozpoczęciem leczenia wykonano badania stężenia dwóch cytokin proangiogennych: VEGF i bFGF w surowicy krwi. W wyborze obu tych cytokin jako ewentualnych surowiczych markerów procesu angiogenezy w Nb, kierowano się opublikowanymi przez innych autorów wynikami badań, które udowodniły aktywność tych czynników angiogennych w tkankach Nb [66,82,123,126].

Badania Fukuzawy i wsp. dotyczące badań ekspresji cytokiny VEGF jak i jej receptora Flk-1 w tkankach Nb wykazały większą ekspresję VEGF i Flk-1 w guzach o niekorzystnej budowie histologicznej [82]. Jest to zgodne z wynikami przedstawianych badań. Wyniki w niniejszej pracy przemawiają za zdecydowanie angiogennym fenotypem guzów o takiej morfologii.

Opisane przez Rosslera i wsp.[209] różnice w ekspresji VEGF w obrębie tego samego guza z największym nasileniem ekspresji w okolicy pól martwicy potwierdziły wyniki badań ekspresji VEGF w tej pracy. Odczyny immunohistochemiczne VEGF były zlokalizowane głównie w obrębie komórek guza, natomiast ekspresja receptora Flk-1 ujawniła się zarówno w obrębie ścian naczyń jak i w komórkach nowotworowych. Obserwacje innych autorów są podobne. Fakt ten potwierdza charakter autokrynny i parakrynny zarówno cytokiny VEGF jak i jej receptora Flk-1. Ten sam autor badając związek ekspresji VEGF w tkankach Nb z kliniczną charakterystyką choroby nie wykazał korelacji ze stadium zaawansowania nowotworu [209]. Podobne były też obserwacje Komuro i wsp. [126], który nie stwierdził związku wysokiego MVD w tkankach Nb z żadną z badanych cech klinicznych choroby (stadium, wiekiem, lokalizacją). Natomiast Fakhari i wsp. [72] zaobserwował, że wysoka ekspresja zarówno VEGF i jej receptorów Flk-1 jak i Flt w tkankach Nb jest charakterystyczna dla zaawansowanego stadium III i IV choroby oraz przyczynia się do niekorzystnego przebiegu klinicznego guzów w stadium III. W niniejszej pracy nie wykazano znamiennych różnic w ekspresji VEGF i Flk-1 w zależności od stadium zaawansowania choroby i pozostałych badanych cech klinicznych choroby nowotworowej.

W grupie pacjentów zmarłych analiza parametrów angiogenezy w tkankach nowotworowych nie wykazała różnic w gęstości naczyń oraz ekspresji VEGF i Flk-1 w stosunku do guzów Nb rozwijających się u pozostałych badanych chorych.

W piśmiennictwie w kilku pracach przedstawione zostały wyniki badań związku między obecnością zmian genetycznych w Nb i aktywnością angiogenezy w tkankach nowotworowych. Opisano zwiększoną ekspresję cytokin proangiogennych w tkankach guzów Nb z amp *NMYC*, co potwierdza udział amp *NMYC* w powstawaniu fenotypu angiogennego guza [66,101,164]. W prezentowanej pracy stwierdzono nieznamiennie większą aktywność cytokiny VEGF w guzach Nb z obecnością amp *NMYC* oraz w guzach z obecnością del(1p). Stwierdzenie zarówno wysokiej ekspresji VEGF w tkankach Nb, jak również wysokiego unaczynienia guzów Nb charakteryzujących się obecnością del(1p) nasuwa przypuszczenie, że z tą aberracją chromosomalną mogą być związane geny kontrolujące proces angiogenezy. Dotychczas nie opublikowano wyników badań dotyczących wpływu del(1p) na proces angiogenezy, a powyższe przypuszczenie wymaga dalszych i pogłębionych badań molekularnych.

Od czasu odkrycia roli angiogenezy w rozwoju nowotworów podjęto poszukiwanie odpowiedniego markera aktywności angiogenezy w łatwo dostępnych płynach ustrojowych: surowicy krwi bądź w moczu chorych. W niektórych nowotworach wieku dorosłego np. w raku pęcherza moczowego stwierdzono podwyższone stężenie cytokin angiogennych: VEGF i bFGF zarówno w surowicy krwi oraz w moczu, które korelowały z zaawansowaniem choroby nowotworowej [105,113]. W złośliwych nowotworach nadnerczy rozwijających się u dorosłych (raku nadnerczy) stwierdzono wyższe stężenie VEGF w surowicy pacjentów (śr 1268 ng/ml) w porównaniu z grupą chorych z niezłośliwymi gruczolakami nadnerczy (339,5 ng/ml) i z grupą kontrolną (202ng/ml) [130]. Badania stężenia obu tych cytokin w surowicy u dzieci z rozpoznaniem guzów litych o różnej histologii i w zaawansowanym stadium klinicznym wykazały, że część chorych stężenie zarówno VEGF jak i bFGF w surowicy krwi jest podwyższone [247]. W pracy Fakhari i wsp. wśród 37 pacjentów z rozpoznaniem Nb znamiennie wyższe poziomy VEGF w surowicy krwi znaleźli u chorych w III i IV stadium zaawansowania choroby [72]. W tej pracy oznaczenie stężenia cytokin VEGF i bFGF wykonano jedynie u 38 pacjentów, gdyż wstępna analiza tego materiału nie wykazała większych różnic w stężeniu obu cytokin w surowicy krwi między grupą pacjentów i grupą dzieci zdrowych. Jedynie w pojedynczych przypadkach stężenia VEGF (7 chorych) i bFGF (2 chorych) były wyższe niż stężenia tych cytokin w grupie kontrolnej. W przypadku chorych z podwyższonym stężeniem jednej z dwóch badanych cytokin stwierdzono chorobę zaawansowaną i przebieg choroby był agresywny, jednak ze względu na to, że podwyższone poziomy tych cytokin w surowicy krwi były stwierdzane jedynie u nielicznych chorych z tym rozpoznaniem- nie mogą one służyć jako stały wskaźnik prognozy. Te obserwacje zostały przez autorkę opublikowane [63].

Wpływ stosowanej terapii na przeżycie chorych

Jak wspomniano we wstępie leczenie pacjentów z rozpoznaniem Nb jest od lat kompleksowe, a intensywność i rodzaj stosowanej chemioterapii u chorych z Nb są dostosowane do stadium klinicznego zaawansowania i odpowiednich grup ryzyka. W grupie pacjentów z chorobą zaawansowaną, o wysokim ryzyku większość schematów leczenia do roku 2002 oparta była o wielolekową chemioterapię konwencjonalną, z zastosowaniem podobnego zestawu cytostatyków. Wyniki leczenia Nb z zastosowaniem chemioterapii konwencjonalnej były porównywalne niezależnie od stosowanego protokołu. Pięcioletnie przeżycia wolne od choroby we wszystkich programach europejskich osiągnęło 25-40% tych chorych [92]. Wyniki terapii w oparciu o mniej intensywną, krótszą chemioterapię chorych z grupy niskiego i pośredniego ryzyka były zbliżone i osiągane wyniki porównywalne (70-90% pięcioletnich przeżyć) [88]. Nadzieje na poprawę wyników leczenia chorych z grupy wysokiego ryzyka związane są z wprowadzeniem od 2002 roku megaterapii z autologicznym przeszczepem szpiku, gdyż wstępna analiza wyników leczenia małych grup chorych z zastosowaniem takiej terapii wykazała jej większą skuteczność i spowodowała, że leczenie mieloablacyjne stało się obowiązującym etapem terapii w obecnie stosowanym europejskim protokole terapeutycznym [44,138,161]. W niniejszej pracy zasadniczymi elementami prowadzonego leczenia chorych była chemioterapia konwencjonalna zastosowana u większości (90%) pacjentów oraz leczenie operacyjne.

Wśród czynników, które mogą wpływać na ostateczny wynik leczenia Nb podkreśla się rolę radykalnego operacyjnego usunięcia ogniska pierwotnego nowotworu. Radykalne usunięcie ogniska pierwotnego zwiększa szansę wyleczenia zwłaszcza w zlokalizowanych stadiach klinicznych tej choroby [60,258, 260]. Sprawą kontrowersyjną w piśmiennictwie pozostaje rola zabiegów radykalnego usunięcia ogniska pierwotnego u pacjentów w IV stadium zaawansowania klinicznego choroby z odległymi przerzutami, choć niektóre badania potwierdzają istotne znaczenie takich zabiegów przeprowadzonych po wstępnej, intensywnej chemioterapii [116,134]. W przedstawianej pracy radykalne zabiegi zostały przeprowadzone u 57,3% chorych. Analiza statystyczna nie potwierdziła istotnego wpływu tego czynnika na prawdopodobieństwo przeżycia chorych. Na taki wynik analizy mogła wpływać przewaga pacjentów z przerzutami odległymi, u których radykalny zabieg operacyjny nie usuwa problemu obecności komórek nowotworowych w miejscach przerzutów.

Wyniki badań dotyczące oceny wpływu radioterapii na poprawę długości przeżycia nie są zgodne. W badaniach SFOP nie wykazano znamiennej poprawy przeżycia chorych z nowotworem w stadium zaawansowanym, u których stosowana była radioterapia [92]. Opublikowane w roku 1991 badania pozytywnie oceniły stosowanie radioterapii jako uzupełnienia leczenia miejscowego po zabiegu operacyjnym, ze zmniejszeniem liczby wznów lokalnych w guzach

zaawansowanych [46,93]. Wyniki te przyczyniły się do wprowadzenia radioterapii jako obligatoryjnego elementu leczenia kompleksowego w europejskim protokole dla grupy wysokiego ryzyka HR NBL-1/ESIOP [160]. Wśród analizowanych tu chorych jedynie 20 pacjentów otrzymało radioterapię, gdyż do roku 2002 głównym wskazaniem do zastosowania tej formy leczenia było stwierdzenie makroskopowych pozostałości tkanki nowotworowej po zabiegu operacyjnym i zakończonej chemioterapii. Zastosowanie radioterapii u niewielkiej liczby chorych różniących się klinicznie uniemożliwiło ocenę wpływu tej metody leczenia jako składowej leczenia kompleksowego. Podobnie leczenie choroby resztkowej z użyciem analogu kwasu retinoinowego było stosowane tylko u nielicznych pacjentów (9 chorych), a krótki czas obserwacji nie pozwolił ocenić wpływu tej części terapii na osiągane wyniki leczenia.

Prawdopodobieństwo przeżycia chorych z Nb w odniesieniu do badanych parametrów

Analiza wieloczynnikowa dokonana w niniejszej pracy potwierdziła wartość powszechnie przyjętych wskaźników prognostycznych to jest wieku, stadium zaawansowania klinicznego, jak również poziomu LDH i ferrytyny jako czynników prognostycznych i te wskaźniki przyjęte w licznych opublikowanych pracach innych autorów [32,191]. W obecnym opracowaniu dodatkowo niezależnym czynnikiem okazała się wielkość guza (średnica > 5 cm) oraz radykalność zabiegu operacyjnego.

Prawdopodobnie z powodu zbyt małej liczby guzów z amplifikacją w analizie wieloczynnikowej nie potwierdzono roli obecności amp *NMYC* jako niezależnego czynnika prognostycznego. Brak statystycznej zależności między badanymi markerami genetycznymi i prawdopodobieństwem przeżycia chorych może wynikać z niedostatecznej liczby wykonanych badań jak i krótkiego czasu obserwacji. Mniejsze prawdopodobieństwo przeżycia (statystycznie nieznamienne) pacjentów z guzami z obecnością amp *NMYC* lub częściowej trisomii 17q wskazuje na bardziej agresywny charakter tych guzów i potwierdza wyniki innych badań, które były przeprowadzane w na większym materiale i okazały się istotne statystycznie [147]. Warto zwrócić uwagę, że prawdopodobieństwo przeżycia chorych w odniesieniu do liczby kopii *NMYC* w guzach Nb było najmniejsze w grupie z guzami o liczbie kopii >2 i < 10, a nie w grupie z amp *NMYC*. Ta grupa chorych wymaga więc dalszych badań celem ostatecznych decyzji o kwalifikacji do grupy wysokiego ryzyka pacjentów z taką genetyczną charakterystyką Nb i ewentualnej intensyfikacji leczenia.

Analiza wieloczynnikowa wykazała również prognostyczną wartość IP jako czynnika rokowania w Nb i potwierdziła wyniki badań innych autorów [130,211]. Należy jednak dodać, że w jednoczynnikowej analizie prawdopodobieństwa

przeżycia grup chorych z podziałem na guzy o niskim, średnim i wysokim IP różnice nie były znamienne.

W analizie statystycznej nie stwierdzono natomiast wartości gęstości naczyń jako niezależnego czynnika ryzyka w tym nowotworze, jak również nie wykazano znaczenia prognostycznego pozostałych badanych wskaźników angiogenezy. Wynika stąd, że intensywność angiogenezy w Nb nie jest jednoznacznym czynnikiem rokowniczym i nie zawsze decyduje o agresywnym jego przebiegu klinicznym. Jednocześnie wiadomo, że Nb jest nowotworem szybko rozwijającym się, a zatem wymaga intensywnego zaopatrzenia w tlen i substraty do budowy tkanki. Badania Ribatti i wsp. [205] ujawniły w Nb możliwość wykorzystania drogi pozaangiogennego zaopatrzenia w krew, poprzez wykorzystanie już istniejących naczyń w organizmie pacjenta, które są wbudowywane w masę tkanki nowotworowej. Taki mechanizm może być wykorzystywany przynajmniej w części guzów Nb, gdyż jak udowodniono w tej pracy w niektórych przypadkach guzy z dużą aktywnością proliferacyjną i szybkim wzrostem masy nowotworowej wykazują niski stopień unaczynienia.

Łączna ocena proliferacji i angiogenezy w tkankach Nb (wskaźnik WNP)

Dwa zjawiska proliferacji i angiogenezy zazwyczaj w Nb wykazują tendencję do odwrotnej zależności. Jednakże wyodrębniono grupę pacjentów, u których guzy Nb charakteryzowały się wysoką aktywnością zarówno proliferacji, jak i angiogenezy. Wprowadzony nowy wskaźnik WNP, który określa jednoczesną aktywność proliferacji i angiogenezy, nie został wyodrębniony jako niezależny w analizie statystycznej. Jednakże agresywny przebieg choroby i wczesny (w ciągu 2,5 lat) zgon większości (64%) chorych > 1 roku życia, u których wartości WNP > 7000 wskazują, że warto podjąć dalsze i rozszerzone badania dotyczące jednoczesnej oceny proliferacji i angiogenezy w tym guzie. Te wyniki badań zostały opublikowane prze autorkę pracy [64].

Podsumowanie

Analiza kliniczna grupy chorych z rozpoznaniem Nb potwierdziła znaczenie wyodrębnionych w wielu pracach innych autorów takich czynników klinicznych jak wiek i stadium zaawansowania oraz stężenie LDH i ferrytyny w surowicy krwi. Dodatkowym niezależnym klinicznym czynnikiem ryzyka okazała się wielkość guza pierwotnego (> 5 cm) oraz radykalność zabiegu operacyjnego. Można przypuszczać, że radykalne usunięcie guza o zróżnicowanej budowie zapobiega rozwojowi tych części tkanek nowotworowych, które charakteryzują się agresywnym fenotypem i mogą rozwijać oporność na stosowane leczenie.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania dotyczące aktywności proliferacyjnej tkanek Nb nasuwają następujące spostrzeżenia. Jeszcze raz potwierdzona

została rokownicza wartość IP w guzach z grupy zwojaka zarodkowego współczulnego, mimo że w dobrze rokujących guzach niemowlęcych stwierdzono wyższą aktywność proliferacyjną niż w guzach rozwijających się u chorych > 1 roku. W pracach innych autorów, którzy udowodnili wartość rokowniczą tego wskaźnika istnieją rozbieżności w określaniu zakresu wartości IP dla guzów o lepszym i gorszym rokowaniu. Kawasaki i wsp. [119] jako graniczną wartość dla gorszego rokowania przyjmuje IP= 11%, Krams i wsp. - 25% [130]. W niniejszej pracy przyjęto podział na trzy grupy w zależności od wartości IP: poniżej 20%, 20-40% i ponad 40%. Ze względu na wielokrotnie potwierdzoną już wartość indeksu proliferacynego w grupie guzów Nb wydaje się, że wskaźnik ten warto byłoby uwzględniać w stratyfikacji chorych przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych. Wskazane byłoby ostateczne zdefiniowanie zakresów wartości IP, używanych w takich stratyfikacjach.

Ocena wybranych wskaźników angiogenezy jako ewentualnych markerów prognostycznych nie wykazała ich wartości rokowniczej, gdyż nie znaleziono znamiennych zależności z uznanymi klinicznymi, histologicznymi i genetycznymi markerami prognostycznymi, jak również ich wpływu na prawdopodobieństwo przeżycia chorych. Z przeprowadzonych badań wynika, iż aktywność angiogenezy w guzach grupy Nb nie jest czynnikiem decydującym o przebiegu klinicznym tych nowotworów i wynikach ich leczenia. Proces angiogenezy jest zróżnicowany nie tylko w guzach o różnej budowie histologicznej, lecz również w odrębnych polach tego samego nowotworu. To spostrzeżenie potwierdza i uzupełnia dotychczasową wiedzę o zróżnicowanej budowie histologicznej i biologii nowotworów tej grupy. Różnice w aktywności angiogennej guzów grupy Nb wskazują, że u części chorych zastosowanie terapii antyangiogennej może być mało skuteczne. Określenie aktywności angiogennej w indywidualnych przypadkach guzów Nb pozwoli wyodrębnić wśród chorych kandydatów do tego typu leczenia.

Zaobserwowano, że dwa zjawiska: proliferacji i angiogenezy w guzach Nb zazwyczaj wykazują tendencję do odwrotnej zależności. Jednakże wyodrębniono grupę pacjentów z chorobą przebiegającą agresywnie, u których guzy Nb charakteryzowały się wysoką aktywnością zarówno proliferacji jak i angiogenezy (wysokie wartości WNP). Wskazuje to na możliwość jednoczesnej aktywacji obu tych procesów. Oznaczanie WNP w tkankach guzów grupy Nb może stanowić cenny wskaźnik dla wyodrębnienia grupy chorych o szczególnie wysokim ryzyku niepowodzeń leczenia, którzy będą wymagali opracowania odrębnego postępowania terapeutycznego.

6. WNIOSKI

1. Jednoczesna wysoka aktywność proliferacji i angiogenezy mierzona wskaźnikiem WNP w guzie pierwotnym zwojaka zarodkowego współczulnego wskazuje na agresywny przebieg choroby u pacjentów powyżej 1 roku życia, z wysokim odsetkiem zgonów w okresie 2,5 lat od rozpoznania.

2. Istnieje tendencja do odwrotnej zależności aktywności proliferacyjnej i gęstości naczyń w tkankach guzów z grupy Nb.

3. Guzy Nb w wieku niemowlęcym charakteryzują się znacznym unaczynieniem tkanek i wysoką aktywnością proliferacyjną komórek nowotworowych.

4. Gęstość unaczynienia w tkance nowotworowej nie stanowi niezależnego czynnika rokowniczego w zwojaku zarodkowym współczulnym.

5. Stosowanie chemioterapii nie wpływa znacząco na zmianę stopnia unaczynienia tkanek zwojaka zarodkowego.

6. Potwierdzona została wartość prognostyczna indeksu proliferacyjnego w guzach pierwotnych Nb, jak również prognostyczne znaczenie wieku chorego, stadium zaawansowania, amp *NMYC* i „niekorzystnej" budowy histologicznej.

7. Wielkość guza pierwotnego i radykalność zabiegu usunięcia guza pierwotnego zostały wyodrębnione jako niezależne czynniki prognostyczne.

8. Oznaczanie aktywności proliferacji i angiogenezy w guzach grupy Nb, z określeniem WNP może wyodrębnić grupę pacjentów o szczególnie dużym ryzyku, którzy będą wymagali odrębnego postępowania terapeutycznego.

7. STRESZCZENIE

Różnorodna odpowiedź na leczenie guzów z grupy zwojaka zarodkowego współczulnego inspiruje do poszukiwań nowych form terapii oraz identyfikacji nowych wskaźników prognostycznych w tym nowotworze. Poza przyjętymi czynnikami klinicznymi wpływającymi na przebieg Nb, jakim jest wiek i stadium zaawansowania choroby, udowodnione zostało znaczenie prognostyczne wskaźników biochemicznych jak stężenie LDH i ferrytyny w surowicy krwi, typu histologicznego tego nowotworu oraz obecności charakterystycznych zmian genetycznych jak amp *NMYC*, del(1p) i częściowa trisomia 17q.

W rozwoju wielu nowotworów proliferacja i angiogeneza stanowią kluczowe zjawiska decydujące o szybkości ich wzrostu.

Celem niniejszej pracy była ocena znaczenia obu procesów – angiogenezy i proliferacji komórek nowotworowych dla obrazu i przebiegu klinicznego zwojaka zarodkowego współczulnego. W tym celu wybrane wskaźniki angiogenezy i proliferacji odniesiono do cech klinicznych choroby, budowy morfologicznej nowotworu i uznanych prognostycznie markerów genetycznych tych guzów.

Badaniami objęto łącznie 110 pacjentów z rozpoznaniem Nb leczonych w okresie od 1.01.1994 do 1.06.2004. Średni czas obserwacji klinicznej wynosił 2 lata i 4 miesiące. Obserwację pacjentów zakończono 1.06.2004 roku. Wstępnie przeprowadzono analizę cech klinicznych prezentowanych przez badaną grupę chorych oraz histologicznych i genetycznych parametrów uznanych za ważne prognostycznie w guzach Nb. Charakterystyka kliniczna chorych była zbliżona do grup chorych z tym rozpoznaniem badanych w pracach innych autorów. Analiza statystyczna prawdopodobieństwa przeżycia w zależności od badanych cech klinicznych potwierdziła znaczenie predykcyjne uznanych czynników jak wiek chorego, stadium choroby nowotworowej, podwyższone stężenie LDH i ferrytyny w surowicy krwi. Ponadto w analizie regresji wieloczynnikowej wykazano wartość rokowniczą wielkości guza pierwotnego i możliwości radykalnego usunięcia guza. Większość chorych prezentowała klinicznie niekorzystne czynniki rokownicze (wiek >1 roku, rozsiane stadium choroby nowotworowej, duży guz w ognisku pierwotnym oraz podwyższone stężenie LDH i ferrytyny w surowicy krwi). Do grupy chorych wysokiego ryzyka wg klasyfikacji opartej na wieku, stadium i obecności amp *NMYC* zaliczono 55 pacjentów. Pacjenci byli leczeni kompleksowo w uzależnieniu od grupy ryzyka. Większość otrzymała wielolekową chemioterapię wstępną, po której wykonano zabieg usunięcia guza, a następnie kontynuowano leczenie uzupełniające z wykorzystaniem chemioterapii konwencjonalnej. U 10 chorych z grupy wysokiego ryzyka zastosowano dodatkowo terapię mieloablacyjną z autoprzeszczepem komórek krwiotwórczych. Radioterapię obejmującą okolicę ogniska pierwotnego lub zmiany resztkowe

otrzymało 20 chorych. W okresie prowadzonej obserwacji nastąpił zgon z progresji choroby u 32 pacjentów, pozostałych 78 żyje, a 67 osiągnęło całkowitą kliniczną remisję choroby. Wznowę choroby rozpoznano u 16 chorych, spośród nich u dwóch uzyskano po leczeniu drugą remisję całkowita choroby.

Typ morfologiczny Nb określono w preparatach histologicznych guzów u 104 chorych. Oceny morfologicznej 57 guzów nowotworowych dokonano przed włączeniem chemioterapii, badania morfologiczne guzów po chemioterapii wstępnej wykonano u pozostałych 47 pacjentów. Wśród typów morfologicznych przeważały Nb o skąpym podścielisku (79/104). Pozytywną odpowiedź na leczenie z uzyskaniem całkowitej remisji choroby znamiennie częściej stwierdzano w grupie chorych z Nb o budowie zróżnicowanej i „morfologicznie korzystnej".

Badania cytogenetyczne oceniające obecność trzech charakterystycznych dla zwojaka zarodkowego markerów genetycznych: amplifikacji onkogenu *NMYC*, delecji chromosomu 1p oraz niepełnej trisomii chromosomu 17q metodą FISH przeprowadzono u 85 chorych we fragmentach tkanek nowotworu lub w rozmazach nacieczonego przez komórki nowotworowe szpiku. Obecność amplifikacji *NMYC* ujawniono w 23/78 (28%) badanych tkanek, del(1p) w 31/66 badań (48%), a niepełna trisomia 17q występowała w 30/63 guzów (48%). Częstość występowania amp *NMYC* oraz niepełnej trisomii 17q w grupie guzów Nb ocenianych przed podjęciem chemioterapii była porównywalna z częstością występowania tych zmian genetycznych w drugiej grupie guzów ocenianych po chemioterapii. Natomiast del(1p) była aberracją rzadziej występującą (36%) w grupie guzów po chemioterapii, niż w grupie ocenianej przed leczeniem (66%). Obecność amp *NMYC* stwierdzano głównie w guzach u pacjentów w wieku > 1 roku i z chorobą zaawansowaną klinicznie. Ploidię komórkową oceniono w 48 guzach. W 10 przypadkach ploidię określano na podstawie kariotypu komórek nowotworowych, w pozostałych 38 przypadkach ploidię oznaczono metodą cytometrii przepływowej. Stwierdzono obecność 25 guzów okołodiploidalnych, osiem guzów okołotriploidalnych i siedem okołotetraploidalnych. i ośmiu guzów hipodiploidalnych. Di- i tetraploidię stwierdzano najczęściej w skojarzeniu z innymi niekorzystnymi parametrami prognostycznymi, to jest w nowotworach zaawansowanych (III i IV stadium kliniczne), z dużym ogniskiem pierwotnym, u chorych z podwyższonym poziomem LDH w surowicy i VMA w moczu.

Aktywność proliferacyjną tkanki nowotworowej oceniano immunohistochemicznie z użyciem przeciwciał p/w Ki-67. Aktywność ta wyrażona jako indeks proliferacyjny (IP) wahała się od 1,5-79,5% (średnia 32,9 %, mediana 35,2). Wartości IP podzielono na niskie <20%, średnie IP=20-40%, i wysokie >40%. Nie obserwowano istotnego wpływu chemioterapii poprzedzającej badanie tkanki nowotworowej na aktywność proliferacyjną guzów (mediana IP w guzach przed chemioterapią – 34,4% vs po chemioterapii 31%) (p=0,58). Guzy o budowie ubogopodścieliskowej wykazywały znamiennie wyższą aktywność proliferacyjną niż bogatopodścieliskowe (p=0,01). Nieznamiennie wyższe wartości IP

Nb w stadium klinicznym IV i guzy o największym wymiarze > 10 cm, a także guzy rozwijające się w śródpiersiu. Zaobserwowano wysokie stężenie LDH w surowicy u chorych z Nb o wysokiej aktywności proliferacyjnej. Wyższa aktywność proliferacja występowała w guzach niemowlęcych (mediana IP=35% w guzach niemowlęcych vs 29,2% w guzach >1 roku życia) (p=0,1). W odniesieniu do badanych zmian genetycznych najwyższy poziom IP (mediana 37,5%) znaleziono w guzach z obecnością amp *NMYC,* najniższe wartości IP (mediana 23,5%) były związane z guzami triploidalnymi. Analiza wieloczynnikowa wykazała istotny wpływ wartości IP na prawdopodobieństwo przeżycia, choć nieznamienne były różnice w szansie przeżycia chorych z Nb przy podziale na grupy charakteryzujące się niskim, średnim lub wysokim IP.

W ocenie aktywności angiogenezy badano następujące wskaźniki: gęstość unaczynienia tkanki nowotworowej w 78 guzach, ekspresję cytokiny VEGF i jej receptora Flk-1 w tkance nowotworowej w 75 guzach i poziom cytokin VEGF i bFGF w surowicy krwi 38 pacjentów. Gęstość naczyń (MVD) liczono w „gorących polach" w preparatach immunohistochemicznych. Unaczynienie guzów było zróżnicowane (32-385 naczyń/mm^2; średnio 157/mm^2). Stopień unaczynienia guzów przed i po chemioterapii był zbliżony (161/mm^2 vs 152/mm^2). MVD podzielono na trzy stopnie: niskie < 100 naczyń/mm^2, średnie 100-300 naczyń/mm^2 i wysokie > 300 naczyń/mm^2. Stwierdzono wyższe MVD w guzach niemowlęcych oraz w małych (< 5 cm) ogniskach pierwotnych. Pozytywną odpowiedź na leczenie w postaci całkowitej remisji najczęściej stwierdzano u chorych z Nb o niskich wartościach MVD (17/20=80,5% chorych). Jednak analiza wieloczynnikowa nie wykazała wartości MVD jako niezależnego czynnika rokowniczego. Ocena intensywności unaczynienia w zależności od obecności w guzie markerów genetycznych wykazała większą liczbę guzów o wysokiej gęstości unaczynienia w grupie z obecnością del(1p) w porównaniu z guzami bez tej aberracji (58% vs 26%).

Stwierdzono ujemną korelację wartości MVD oraz IP i ta zależność pozostawała na granicy znamienności statystycznej (Rs=-0,06). Kolejne wskaźniki angiogenezy, ekspresja czynnika VEGF i jego receptora Flk-1 w tkance nowotworowej były badane metodą jakościową na podstawie intensywności wybarwienia i odsetka komórek immunopozytywnych w reakcji z przeciwciałami p/w tym czynnikom (+ słaba reakcja, ++ średnio intensywna reakcja, +++ silna reakcja). Nie stwierdzono zależności między ekspresją cytokiny VEGF i Flk-1 z gęstością naczyń tkance Nb. Ekspresja VEGF i Flk-1 w preparatach badanych przed i po chemioterapii była porównywalna. Analiza ekspresji obu tych czynników w odniesieniu do cech klinicznych guza nie ujawniła istotnych zależności Większą ekspresję zarówno VEGF jak i Flk-1 stwierdzono w guzach nisko- i niezróżnicowanych w porównaniu z guzami bardziej dojrzałymi, ale ta różnica nie była statystycznie istotna. W poszukiwaniu związku ekspresji VEGF i markerów genetycznych stwierdzono, że w grupie guzów z obecnością del(1p)

częściej występuje zwiększona aktywność tej cytokiny (++/+++) niż w grupie guzów bez tej aberracji (80% vs 59%). Nie zaobserwowano zależności ekspresji receptora Flk-1 od badanych markerów genetycznych.

Stężenia cytokin proangiogennych: VEGF i bFGF metodą ELISA oznaczono u 38 pacjentów przed rozpoczęciem leczenia oraz u 30 zdrowych dzieci z grupy kontrolnej. Nie znaleziono statystycznie istotnej różnicy między stężeniami tych dwóch cytokin w grupie pacjentów i w grupie kontrolnej.

Wartości stężenia VEGF w surowicy chorych wahały się od 28 do 1540 pg/ml (średnio 405 pg/ml) i tylko u 7 pacjentów przewyższało najwyższą wartość stężenia tej cytokiny w grupie kontrolnej (>830 pg/ml). W sześciu guzach pochodzących od chorych z wysokim stężeniem VEGF w surowicy wykonano badania cytogenetyczne - w 4/6 guzów stwierdzono obecność amp *NMYC* i w 3/6 obecność del (1p). Stężenie bFGF w surowicy pacjentów wahało się od 0,0 do 33,1 pg/ml (średnio 4,0 pg/ml) i było porównywalne z wartościami stężeń tej cytokiny w grupie kontrolnej. Jedynie u części pacjentów (20/38) stężenie bFGF osiągnęło poziom oznaczany.

Do istotnych elementów pracy nie będących dotychczas przedmiotem badań należy wyodrębnienie grupy guzów Nb charakteryzujących się jednoczesnym pobudzeniem aktywności zarówno proliferacji jak i angiogenezy. Ten typ guzów charakteryzował się agresywnym rozwojem i wpływał niekorzystnie na kliniczny przebieg choroby. Dla określenia takich guzów wprowadzono nowy parametr, który nazwano wskaźnikiem naczyniowo-proliferacyjnym (WNP). WNP obliczano jako iloczyn wartości indeksu proliferacyjnego oraz gęstości naczyń w guzach u 72 pacjentów. Wartość tego iloczynu wahała się w zakresie od 102,0 do 17955,0 (średnia 5084, mediana 4292). Szczególnie wysoki WNP wykazywały guzy Nb rozwijające się w okresie niemowlęcym. Nieznamiennie większe prawdopodobieństwo przeżycia stwierdzono u pacjentów z Nb o wysokim WNP (>5000). Natomiast u 64% pacjentów powyżej 1 roku życia i z WNP >7000 zakończyła się zgonem w okresie 2 lat i 4 miesięcy od rozpoznania. Zaproponowany wskaźnik naczyniowo-proliferacyjny WNP może znaleźć zastosowanie praktyczne dla wytypowania pacjentów szczególnie wysokiego ryzyka i opracowania dla nich nowych strategii terapeutycznych z wykorzystaniem leków celowanych w hamowanie procesów angiogenezy i proliferacji.

8. SUMMARY

Different response to the treatment in some patients with neuroblastoma (Nb) tumors urge to look for new therapies. There is also a great need for new prognostic indices in this neoplasm. Apart from well accepted clinical factors influencing Nb course, such as patients age at the diagnosis and the disease stage, the prognostic value of others has been demonstrated, among which the importance of LDH and ferritin serum levels, tumor's histology and the characteristic genetic changes such as the presence of *MYCN* amplification, del(1p) or 17q gain has been stressed. Proliferation and angiogenesis are key phenomena in the development of multiple neoplasms.

The purpose of this study was to investigate the importance of cell proliferation and angiogenesis on the clinical presentation and course of neuroblastoma. Chosen angiogenesis and proliferation markers were correlated with the disease clinical features, tumor's histological structure and accepted genetic prognostic indices.

110 neuroblastoma patients treated between 1.01.1994 and 1.06.2004 were enrolled in this study. Mean observation time was 2 years and 4 months. Clinical observation was terminated on the 1.06.2004.

Initially, a clinical feature analysis was performed in the investigated group, together with histological and genetic parameters with established importance for the prognosis in Nb tumors. Clinical characteristic of the investigated group was similar to these reported by other authors. Statistical analysis confirmed the predictive value of the patient's age, stage of the disease and elevated serum LDH and ferritin on the patients' survival probability. A predictive value of primary tumor size and complete excision was in addition showed in the multivariate regression analysis.

Most patients presented were of unfavorable clinical prognostic factors (age > 1 year old, disseminated neoplasmatic disease, large primary site tumor and elevated biochemical markers – LDH and ferritin). 55 patients were qualified to the high-risk group according to the classification based on age, stage and the *MYCN* status. The patients received combined treatment according to the risk group qualification or the clinical stage of the disease. Most of the patients received a multidrug initial chemotherapy followed by the tumor resection, after which the treatment was continued with conventional chemotherapy. In 10 high - risk patients an additional myeloablative chemotherapy was performed with a subsequent autotransplantation of the hematopoetic stem cells. In 20 cases radiotherapy was used. During the observation period 32 patients died of disease progression, the remaining 78 was alive with 67 in complete clinical remission.

The relapse was diagnosed in 16 patients out of which two achieved a second complete remission.

Nb morphological type has been defined in 104 patients from the tumor tissue specimens. 57 specimens were analyzed before the oncological treatment, the remaining 47 cases the analysis was performed after the induction therapy. Stroma-poor tumors were predominant in the analyzed material (79/104). Positive response to the therapy, with complete remission, was statistically more often in the group of favorable morphology patients.

In 85 patients cytogenetic evaluation of the three Nb markers (amp *MYCN*, del(1p) and 17q gain) was performed using FISH in tumor slides or in the smears from the infiltrated bone marrow. *MYCN* amplification was found in 23/78 (28%) of the specimens examined, del(1p) in 31/64 (48%) and 17q gain in 30/63 tumors (48%). Amp *MYCN* and 17q gain occurred with comparable frequency in specimens evaluated before and after the initial chemotherapy, while del(1p) was less frequent in specimens evaluated after chemotherapy (36%) comparing with those from the group before the treatment (66%). Nb with amp *MYCN* was predominant in patients >1 year old and with a higher clinical stage of the disease.

Tumor cells ploidy was evaluated in 48 patients, using the tumor cells karyotype in 10 cases and flow cytometry in the remaining 38 patients. 25 tumors were found to be neardiploid, 8 – neartriploid and 7 neartetraploid, in 8 tumors hypodiploidy was seen.

Di- and tetraploidy were most often observed in combination with other unfovourable prognostic factors, like III and IV clinical stage tumors, large primary sites or the elevated serum LDH activity or high urine VMA.

Proliferative activity was measured with anti Ki-67 monoclonal antibodies immunostaining and expressed as a proliferative index (PI). PI varied from 1,5 to 79,5 % in the analyzed tumor sections (mean 32,9%, median 35,2%). PI values were divided into three ranges: low <20%, intermediate 20-40% and high >40%. Comparison of PI values in the untreated and pretreated patients did not show any significant differences:: 34,4% before vs 31% after the initial treatment (p=0,58)). Stroma-poor tumors showed a significantly higher proliferative index comparing to stroma-rich ones (p=0,01). Tumors in the IV stage of progression, larger than 10 cm and of mediastinal location tended to show higher PI values. Elevated serum LDH activity was noted in patients with high Nb proliferative activity. Higher PI values were found in infant tumors (median PI=35% vs 29,2% in tumors arising >1 yr). When correlated with the genetic changes, the highest PI (37,5%) was found in tumors with *MYCN* amplification, while the lowest PI (23,5%) was connected with triploid tumors. Multivariate analysis revealed a significant influence of the PI value onto survival rate, but the differences in survival probability between patients from the groups with high, medium or high PI were of not significantly different.

For the angiogenesis assessment the following markers were analyzed: vascular density of the neoplasmatic tissue (78 tumors assayed), VEGF cytokine and its receptor Flk-1 expression in the neoplastic tissue (75 tumors) as well as VEGF and bFGF cytokine levels in the serum (38 patients).

Microvascular density (MVD) was counted in the „hot-spots" of the CD34 immunostained tumor specimens. The number of blood vessels ranged from 32/mm^2 to 385/mm^2 (mean 157/mm^2). Analysis of the MVD in specimens from pretreated and untreated tumors indicated no significant differences (161/mm^2 vs 152/mm^2). Tumors were divided in respect of their MVD to three groups: low vascularity < 100 blood vessels/mm^2, medium - 100-300 blood vessels /mm^2 and high >300 blood vessels /mm^2. Higher MVD was noted in tumors from the infants and in small (<5 cm) primary tumors. Treatment response understood as complete remission was more frequent in patients with low MVD tumors (17/20=80,5%). Patients with high MVD tumors presented the highest mortality rate (6/14=43% patients). The correlation analysis of the vascular density and genetic markers revealed a higher number of tumors with MVD exceeding the mean values among those with 1p deletion comparing to the group without this aberration (58% vs 26%).

Inverse correlation was found between PI and MVD which showed borderline statistical significance (RS=0,06).

Further angiogenesis markers: VEGF and its receptor Flk-1 expression in the neoplastic tissue was performed qualitatively. Immunohistochemical staining with appropriate monoclonal antibodies was performed in the tumor slides. Staining intensity and a percentage of immunopositive cells was evaluated (+ weak reaction, ++ intermediate intensity of the reaction, +++ strong reaction). No correlation between VEGF or Flk-1 expression and MVD was noted, neither did VEGF or Flk-1 expression correlate with any clinical features analyzed. VEGF expression in untreated and pretreated tumors was comparable. No differences were also seen in receptor Flk-1 expression among these groups. Higher expression of both VEGF and Flk-1 was observed in poorly differentiated and undifferentiated tumors as compared to the differentiating ones, but this difference was not statistically significant. Higher VEGF expression (++/+++) was predominant in tumors with del(1p) comparing to tumors without this aberration (80% vs 59%). Flk-1 expression did not correspond to any genetic markers analyzed in this study.

Proangiogenic cytokines: VEGF and bFGF were measured using ELISA in 38 patients before the initiation of the treatment and in 30 healthy children from the control group. No statistically significant differences in serum concentration of both cytokines were seen between the groups.

VEGF concentration ranged from 28 to 1540 pg/ml (mean 405 pg/ml) in the patients sera. In 7 out of 38 patients VEGF levels exceeded the highest level in

the control group (>830 pg/ml). In 6 six patients, showing high VEGF serum levels, cytogenetic analysis of the tumor tissue was performed revealing *MYCN* amplification in 4/6 cases and del(1p) in 3/6. bFGF concentrations ranged from 0,0 to 33,1 pg/ml (mean 4,0 pg/ml) in the patients sera. Only in 20/38 patients did bFGF reach the level of detection and the concentration was comparable to the control group.

An identification of Nb tumors group characterized by activation of both proliferative and angiogenesis activity comprised an important part of this study, as such a group has not been a subject of any study thus far. This type of tumor demonstrated aggressive growth potential and had the unfavorable impact on the clinical course of the disease. For descriptive purposes, in this group, a new parameter was introduced named vascular-proliferative index (VPI) and calculated as a value of PI x MVD. VPI values were calculated for 72 patients and varied from 102 to 17955 (mean 5084, median 4292) with especially high values in tumors developed during infancy. Patients above 1 year with high VPI (>5000) had a worse survival, but with no significant differences. Patients above 1 year of age with VPI >7000 presented aggressive course of disease and 64% of them died within 28 months following diagnosis.

Vascular-proliferative index (VPI) proposed in this study can serve as a practical guideline for extreme high risk patients identification, as well as it can be helpful in introducing new treatment strategies aiming at angiogenesis and proliferation.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Agathanggelou A, Bieche I, Ahmed-Choudhury J i in. Identification of novel gene expression targets for the Ras association domain family 1 (RASSF1A) tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer and neuroblastoma. Cancer Res 2003; 63: 5344.
2. Ahmad SA, Jung YD, Liu W i in. The role of the microenviroment and intercellular cross-talk in tumor angiogenesis. Semin Cancer Biol 2002; 12: 105,
3. Akslen LA, Li Volsi VA. Increased angiogenesis in papillary thyroid carcinoma but lack of prognostic importance. Hum Pathol 2000; 31:439.
4. Ambros IM, Zellner A, Roald B i in. Role of ploidy, chromosome lp and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. N Eng J Med 1996; 334: 1537.
5. Ambros IM, Attarbaschi A, Rumpler S i inni. Neuroblastoma cells Schwann cell proliferation in vitro. Med. Pediatr Oncol, 2001; 36: 163.
6. Ambros IM, Benard J, Boavida M i in. Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. J Clin Oncol 2003; 21: 2077.
7. Ambros PF, Ambros IM, Starkl S I in. Regression and progression in neuroblastoma: Does genetic predict tumor behavior? Eur J Cancer 1995; 31A: 510.
8. Asahara T, Bauters C, Zheng LP i in. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. Circulation 1995; 92 (suppl): 365.
9. Atkin NB. Chromosome 1 aberrations in cancer. Cancer Genet Cytogenet 1986;21: 279.
10. Backman U, Svensson A, Christofferson R i in. Importance of vascular endothelial growth factor A in the progression of experimental neuroblastoma. Angiogenesis. 2002; 5: 267.
11. Bouck N. Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor supresor genes. Cancer Cells 1990; 2: 179.
12. Barleon B, Sozzani S, Zhou D i in. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via VEGF receptor flt-1. Blood 1996; 87: 3336.
13. Beckwith JB, Martin RF. Observation on the histopathology of neuroblastoma. J Pediatr Surg 1968; 3:106.
14. Beierle EA, Dai W, Langham MR. VEGF receptors are differentially expressed by neuroblastoma cells culture. J Pediatr Surg, 2003; 38: 514.
15. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A i in. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. J Clin Invest 1999; 103: 159.

16. Bergers G, Benjamin LE, Tumorgenesis and the angiogenesis switch. Nature Rev Cancer 2003; 3: 401.

17. Berthold E. Hanneman DH, Harms D i in. Serum vanillylmandelic amid/homovanilic amid contributes to prognosis estimation in patients with localised but not metastatic neuroblastoma. Eur J Cancer 1992; 28A: 1950.

18. Berthold F, Hero B, Kremens B i in. Long term results and risk profiles of patients in five consecutive trials (1979-1997) with stage 4 neuroblastoma over 1 year of age. Cancer Lett 2003; 18: 11.

19. Berthold F, Hero B. Neuroblastoma: current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. Drugs 2000; 59: 1261.

20. Berthold F, Kassenbohmer R, Zieshang J. Multiviariate evaluation of prognostic factors in localised neuroblastoma. Am J Pediatr Hematol Oncol 1994; 16: 107.

21. Biedler J, Henson l, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in culture. Cancer Res 1973; 33: 2643.

22. Biedler JL, Spengler BA, Ross RA. Human neuroblastoma cell differentiation. W: Raghavan D, Scher HI, Leibel SA Lange PH. *Principles and practice of genitourinary oncology.* Lippincott-Raven Publishers, New York, NY, 1997: 1053.

23. Biedler JL, Spengler BA. A novel chromosome abnormality in human neuroblastoma and antifoliate-resistant Chinese hamster cell lives in culture. J Natl Cancer Inst 1976; 57: 683.

24. Bolton WE, Freeman JW, Mikulka WR i in. Expression of proliferation – associated antigens (PCNA, P120, P145) during the reentry of G0 cells into the cell cycle. Cytometry 1994; 17: 66.

25. Bordow SB, Norris MD, Haber PS. Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma. J Clin Oncol 1998; 16: 3286.

26. Ranione F i in. Proliferate and survive: cell division cycle and apoptosis in human neuroblastoma. Hematologia 2002; 87: 196.

27. 27. Bown N. Neuroblastoma tumor genetics: clinical and biological aspects. J Clin Pathol 2001; 54: 897-910.

28. Bown N, Cotterill S, Lastowska M i in. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. N Engl J Med 1993; 340: 1954.

29. Bringschmidt C, Christiansen H, Terpe HJ i in. Distal chromosome 17 gains in neuroblastomas detected by comparative genomic hybridization (CGH) are associated with poor clinical outcome. Med Pediatr Oncol 2001; 36: 11.

30. Brodeur GM, Ambros PF. Genetic and biological markers of prognosis in neuroblastoma. W: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y and Voute PA. *Neuroblastoma*, Elsevier 2000; 335.

31. Brodeur GM, Fong CT. Molecular biology and genetics of human neuroblastoma. Cancer Genet Cytogenet 1989; 41: 153.

32. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F I in. Revision of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. J Clin Oncol 1993; 11: 1466.

33. Brodeur GM, Seeger RC, Sather H i in. Clinical implication of oncogene activation in human neuroblastomas. Cancer 1986; 58: 541.

34. Brodeur GM, Sekhon GS, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastoma. Cancer 1977; 40: 2256.

35. Brodeur GM. Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. Nature Rev 2003; 3: 203-16.

36. Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis. Eur J Cancer 1996; 32A: 2423.

37. Budryk M, Szala C. Angiostatyna oraz inne polipeptydy hamujace angiogenezę nowotworów. Wsp Onkol 1997; 3: 11.

38. Bussolimo F, Albini A, Camussi G i in. Role of soluble mediators in angiogenesis. Eur J Cancer 1996; 32A: 2410.

39. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 2000; 407: 249.

40. Canete A, Navarro S, Bermudez J, Dellin A, Castel V, Lombart-Bosh A. Angiogenesis in neuroblastoma: Relationship to survival and other prognostic factors in a cohort of neuroblastoma patients. J Clin Oncol 2000; 18: 27.

41. Caron H, Hogenbirk K, van Sluis P i in. Relative prognostic factors in neuroblastoma. Med Pediatr Oncol 1998; 31: 298.

42. 42. Caron H, Peter M, van Sluis P i in. Evidence for two tumor suppressor loci on chromosomal bands 1p35-36 involved in neuroblastoma: one probably imprinted, another associated with N-myc amplification. Hum Mol Genet 1995; 4: 535.

43. Caron H, van Sluis P, van Roy N i in. Recurrent 1; 17 translocations in human neuroblastoma reveal no homologous mitotic recombination during the S/G2 phase as a novel mechanism for loss of heterozygosity. Am J Hum Genet 1994; 55: 341.

44. Castleberry R. Clinical and biologic features in the prognosis and treatment of neuroblastoma. Curr Opin Oncol 1992; 4: 116.

45. Castleberry RI, Shuster JJ, Smith EI. The Pediatric Oncology Group experience with the international staging system criteria for neuroblastoma. Member Institutions of the Pediatric Oncology Group. J Clin Oncol 1994; 12: 2378.

46. Castleberry RP, Kun LE, Shuster JJ i in. Radiotherapy improves the outlook for patients older than 1 year with Pediatric Oncology Group Stage C Neuroblastoma. J Clin Oncol 1991; 9: 789.

47. Castleberry RP. Neuroblastoma Risk Grouping: a basis for patients management. Med Pediatr Oncol 1998; 31: 253.

48. Cattoretti G, Becker MHG, Key G i in. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave – processed formalin - fixed paraffin sections. J Pathol 1992; 168: 357.

49. Chlenski A, Liu S, Cohn SL. The regulation of angiogenesis in neuroblastoma. Cancer Lett 2003; 197: 47.

50. Chlenski A, Liu SE, Crawford OV i in. SPARK is a key Schwannian - derived inhibitor controlling neuroblastoma tumor angiogenesis. Cancer Res 2002; 62: 7357.

51. Cohn SL, London WB, Huang D. MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified MYCN. J Clin Oncol 2000; 18: 3604.

52. Coldman AJ, Fryer CJ, Elwood JM i in. Neuroblastoma: influenze of age at diagnosis, stage, tumor site and sex on prognosis. Cancer 1980; 46: 1896.

53. Combaret V, Gross N, Laser C i in. Clinical relevance of CD44 cell surface expression and MYCN amplification in neuroblastoma. Eur J Cancer 1997; 33: 2101.

54. Conville CM, Forsyth J. Neuroblastoma – a developmental perspective. Cancer Lett 2003; 197: 3.

55. Corvi R, Amler LC, Savelyvea L i in. MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 5523.

56. Cox D, Yuncken C, Spriggs A. Minute chromation bodies in malignant tumors of childhood. Lancet 1965; 2: 55.

57. Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M i in. Pigment epithelium - derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. J Cell Sci 2001; 114: 4421.

58. Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic option. Eur J Cancer 2000; 36: 1649.

59. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA i in. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of trombospondin –1. Science 1994; 265: 1582.

60. De Bernardi B, Monte M, Mancini A i in. Localised resectable neuroblastoma: Results of the second study of the Italia Cooperative Group for Neuroblastoma. J Clin Oncol 1995; 13: 884.

61. De Bernardi B, Nicolas B, Boni L i inni. Disseminated neuroblastoma in children older than one year at diagnosis: comparable results with free consecutive high dose protocols adopted by the Italian Co-operative Group for Neuroblastoma. J Clin Oncol 2003; 15: 1592.

62. Deplanque G, Harris AL. Anti-angiogenic agents: clinical trial design and therapies in development. Eur J Cancer 2000; 36: 1713.

63. Drożyńska E, Rachoń D, Myśliwska J i in. Serum concentrations of angiogenic cytokines in neuroblastoma patients. Polish J Environ Stud 2005; 14, suppl 2: 508.

64. Drożyńska E, Iżycka-Świeszewska E, Niedźwiecki M i in. A correlation of microvascular density and proliferative activity to clinical characteristics in neuroblastoma. Neoplasma 2006; 3: 247.

65. Dvorak HF. Vascular permability factor (Vascular Endothelial Growth Factor). A critical role cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. J Clin Oncol 2001; 20: 4368.

66. Eggert A, Ikegaki N, Kwiatkowski J i in. High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced stage in human neuroblastomas. Clin Cancer Res 2000; 6: 1900.

67. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. Eur J Cancer 1996; 32A: 2451.

68. Erdreich-Epstein A, Shimada H, Groshen S i in. Integrins alfa V beta 3 and alfa V beta 5 are expressed by endothelium of high-risk neuroblastoma and their inhibition is associated with increased endogenous ceramide. Cancer Res 2000; 60: 712.

69. Evans AE, D'Angio GJ, Propert K i in. Prognostic factors in neuroblastoma. Cancer 1987; 59: 1853-59.

70. Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's Cancer Study Group A. Cancer 1971; 27: 374,

71. Evans AE. A historical perspective 1864-1998. W: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y and Voute PA *Neuroblastoma,* Elsevier 2000; 1.

72. Fakhari M, Pullirsch D, Paya K i in. Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors is associated with advanced neuroblastoma. J Pediatr Surg 2002; 37: 582.

73. Faxellius G, Teger-Nilsson AC. Disseminated intravascular coagulation and congenital neuroblastoma. Acta Paediatr Skand 1975; 64: 667.

74. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of a vascular endothelial growth factor. Endocrin Rev 1997; 18: 4.

75. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. Eur J Cancer 1996; 32A: 2413-22.

76. Ferrara N, Chen H, Davis-Smith T i in. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. Nature Med 1998; 4: 336.

77. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem 1992; 267: 10931.

78. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid arthritis and other disease. Nature Med 1995; 1: 27.

79. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 1971; 285: 1182.

80. Fong C, Dracopoli NC, White PS. Loss of heterozygozity for short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3753.

81. Fox SB, Westwood M, Moghaddam i in. The angiogenic platelet derived endothelialcell growth factor, thymidine phosphorylase is upregulated in breast cancer epithelium and endothelium. Br J Cancer 1996; 73: 275.

82. Fukuzawa M, Sugiura H, Koshinaga T i in. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1 in human neuroblastoma using in situ hibridization. J Ped Surg 2002; 37: 1747.

83. Garmy-Susini B, Jin H, Zhu Y I in. Integrin $\alpha 1\beta 1$- VCAM1- mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessels maturation. J Clin Invest 2005; 115: 1542.

84. Gasparini G. Angiogenesis research up to 1996. A commentary on the state of the art and suggestions for future studies. J Cancer 1996; 32A: 2379.

85. Geoerger B, Hero B, Harms D i in. Metabolic activity and clinical features of primary ganglioneuromas. Cancer 2001; 15: 1905.

86. Gerdes J, Schwab U, Lemke H i in. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 1983; 31: 13.

87. Gilbert F, Feder M, Balaban G i in. Human neuroblastomas and abnormalities of chromosome 1 and 17. Cancer Res 1984; 44: 5444.

88. Goldsby E, Matthay K. Neuroblastoma. Evolving therapies for a disease with many faces. Pediatr Drugs 2004; 6: 107.

89. Graham D, Magee H, Kierce B i in. Evaluation of Ki-67 reactivity in neuroblastoma using paraffin embedded tissue. Pathol Res Pract 1995; 191: 87.

90. Grotzer MA, Geoerger B, Janss AJ i in. Prognostic significance of Ki-67 (MIB-1). Proliferation index in childhood primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. MPO 2001; 36: 268.

91. Haas D, Albin AR, Miller C i in. Complete pathologic maturation and regression of stage IV-s neuroblastoma without treatment. Cancer 1988; 62: 818.

92. Habrand JL, D'Angio GJ. Radiotherapy in neuroblastoma. W: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y and Voute PA. *Neuroblastoma*, Elsevier 2000; 479.

93. Habrand JL, Rubie H, Carrie C i in. The place of radiotherapy in the management of localised neuroblastoma (NBL). Experience of the French Society of Pediatric Oncology (SFOP). Med Pediatr Oncol (abstract) 1998; 31: 210.

94. Hall PA,Woods AL. Immunohistochemical markers of cellular proliferation achievements: problems and prospects. Cell Tissue Kinet 1990; 23: 505.

95. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57.

96. Hann H, Evans AE, Cohen J i in. Biologic differences between neuroblastoma stage IVs and IV measurement of serum ferritin and E-rosette inhibition in 30 children. N Engl J Med 1981; 305: 425.

97. Hann HW, Evans AE, Siegel SE i in. Prognostic importance of serum ferritin in patients with stage III and IV neuroblastoma. The Children's Cancer Study Group Experience. Cancer Res 1985; 45: 2843.

98. Hann HW, Bombardien E. Serum markers and prognosis in neuroblastoma: ferritin, LDH and NSE. W: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y and Voute PA. *Neuroblastoma*. Elsevier 2000; 371.

99. Harlozinska A, Sedlaczek P, Kulpa J i in. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentration is sera and tumor effusions from patients with ovarian carcinoma. Anticancer Res 2004; 24: 1149.

100. Hata Y, Naito H,Sasaki F i in. Fifteen years' experience of neuroblastoma: a prognostic evaluation according to Evans and UICC staging system. J Pediatr Surg 1990; 25: 326.

101. Hatzi E, Breit S, Zoephel A i in. MYCN oncogene and angiogenesis: downregulation of endothelial growth inhibitors in human neuroblastoma cells. Purification, structural and functional characterisation. Adv Exp Med Biol 2000; 476: 239.

102. Hayashi Y, Kanda N, Inaba T. Cytogenetic findings and prognosis in neuroblastoma with emphasis on marker chromosome 1. Cancer 1989; 63: 126.

103. Hedborg F, Ullerase E, Grimelius I. Evidence for hypoxia-induced neuronal –to chromaffin metaplasia in neuroblastoma. FASEB J 2003;17: 598.

104. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K i in. Biological characteristics of neuroblastoma are associated with different patterns of loss of heterozigosity on chromosome arm 1. Med. Pediatr Oncol 2001; 36: 67.

105. Holzer G, Obermair A, Koschet M i in. Serum VEGF in bone tumors. Med Pediatr Oncol, 2001; 36: 601.

106. Hoos A, Stojadinovic A, Mastorides S I in. High Ki-67 proliferative index predicts disease specific survival in patients with high risk soft tissue sarcomas. Cancer 2001; 15: 869.

107. Huang D, Rutkowski JL, Brodeur PM i in. Schwann cell-conditioned medium inhibit angiogenesis. Cancer Res; 2000; 60: 5966.

108. Huges M, Mardsen HB, Palmer MK. Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging . Cancer 1974; 34: 1706.

109. Ikeda H, Tsuschida Y i in. Experience with International Neuroblastoma Staging System and Pathology Classification. B JC 2002; 86: 1110.

110. Islam A, Kageyama H, Takada N i in. High expression of surviving, mapped to 17q25 is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. Oncogene 2000; 19: 617.

111. Jackson M. Analysis of biological importance of tumor heterogeneity. JCO 2001; 19: 3080.

112. Jogi A, Ora J, Nilsson H i in. Hypoxia dedifferentiation in neuroblastoma. Cancer Lett 2003; 197: 145.

113. Jones A, Fujijama C. Angiogeneza w nowotworach układu moczowego: wskaźnik rokowniczy, cel terapeutyczny. BJU (polska edycja) 1999; 1: 5.

114. Joshi VV, Cantor AB, Altshuler A i in. Recommendation for modification of terminology of neuroblastic tumors and prognostic significance of shimada classification: a clinicopathological study of 211 cases from the Pediatric Oncology Group. Cancer 1992; 69: 2197.

115. Joshi VV. Peripheral Neuroblastic Tumors: Pathologic Classification based on recommendations of International Pathology Committee (Modification of Shimada Classification). Ped Develop Pathol 2000; 3: 184.

116. Kaneko M, Tsushida Y, Uchino J i in. Treatment results of advanced neuroblastoma with the first Japanese Study Group Protocol. J Pediatr Hematol Oncol 1999; 21: 190.

117. Kaneko Y, Kanda N, Maseki N. Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas. Cancer Res 1987; 47: 311.

118. Katzenstein HM, Bowman LC, Brodeur GM i in. Prognostic significance of age< MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy and histology in 110 infants with stage DCSI method neuroblastoma. The Pediatric Oncology Group Experience – a Pediatric Oncology Group Study. J Clin Oncol 1998; 16: 2007.

119. Kawasaki H, Mukai K, Yajima S i in. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Immunostaining in neuroblastoma. Med Pediatr Oncol 1995; 24: 300.

120. Keim DR, Hailat N, Kuick R i in. PCNA levels in neuroblastoma are increased in tumors with an amplified N-myc gene and in metastatic stage tumors. Clin Exp Metastasis 1993; 11: 83.

121. Kerbl K, Ambros PF, Ambros IM i in. Neuroblastoma with focal MYCN amplification and bone marrow infiltration: a staging and treatment dilemma. Med Pediatr Oncol 2002; 38: 109.

122. Kim ES, Serur A, Huang J i in. Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 1399.

123. Klein GM, Steiner M, Wiener F i in. Human leukemia antigen- associated nuclear reactivity. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71: 685.

124. Kletzel M, Katzenstein HM, Haut PR i in. Treatment of high risk neuroblastoma with triple-tandem high dose therapy and stem-cell rescue of the Chicago Pilot II Study. J Clin Oncol 2002; 20: 2284.

125. Kletzel M, Katzenstein HM, Haut PR I in. Treatment of high risk neuroblastoma with triple tandem high dose therapy and stem cell rescue: results of the Chicago Pilot Study. J Clin Oncol 2002; 1: 2284.

126. Komuro H, Kaneko S, Kaneko M I in. Expression of angiogenic factors and tumor progression in human neuroblastoma. J Cancer Res Clin Oncol 2001; 127: 739.

127. Korzeniewska M, Kolomecki k, Stępień H i in. Stężenie czynników pro-i anty-angiogennych w surowicy krwi u pacjentów z guzami nadnerczy nieczynnymi hormonalnie. Endokr Pol 2005; 56: 39.

128. Kowalczyk J, Samardakiewicz M. Rozpoznanie choroby nowotworowej u dzieci. W: *Dziecko z chorobą nowotworową*. PZWL 1998: 9.

129. Krams M, Heidebrecht HJ, Hero B i in. *Repp86* expression and outcome in patients with neuroblastoma. J Clin Oncol 2003; 21: 1810.

130. Krams M, Hero B, Berthold F i in. Proliferation marker Ki-S5 discriminates between favorable and adverse prognosis in advances stages of neuroblastoma with and without MYCN amplification. Cancer 2002; 94: 854.

131. Kunz-Shughart LA, Knuechel R. Tumor associated fibroblasts: Functional impact on tumor issue. Histol Histopathol 2002; 17: 599.

132. Kushner BH, Gilbert F, Helson L. Familial neuroblastoma. Case reports, literature review and etiologic considerations. Cancer 1986; 57: 1887.

133. Kushner BH, Kramer K, LaQuaglia MP i in. Neuroblastoma in adolescents and adults: the Memorial Sloan-Kettering experience. Med Pediatr Oncol 2003; 41: 508.

134. La Quaglia MP, Kushner BH, Hellen G i in. Stage IV neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age: gross total resection and clinical outcome. J Pediatr Surg 1994; 29: 1162.

135. Labreveux de Cervens C, Hartmann O, Bonnin F i in. What is the prognostic value of osteomedullary uptake on MIBG scan in neuroblastoma patients under one year of age? Med Pediatr Oncol 1994; 22: 107.

136. Ladenstein R, Ambros IM, Potschger U i in. Prognostic significance od DNA ditetraploidy in neuroblastoma. Med Pediatr Oncol 2001; 36: 83.

137. Ladenstein R, Ambross PF, Urban C i in. Value of prognostic factors in the Austrian A-NB87 Neuroblastoma Study. Clin Pediatr 1996; 208: 210.

138. Ladenstein R, Lasset C, Philip T. Treatment duration before bone marrow transplantation in stage IV neuroblastoma. European Bone Marrow Transplant Group Solid Tumour Registry (letter). Lancet 1992; 340: 916.

139. Langer I, Vertongen P, Perret J i in. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in human neuroblastoma. Med Pediatr Oncol 2000; 34: 386.

140. Lewy-Trenda I. Nowotwory a angiogeneza. Pol Mer Lek 2002; 75: 225.

141. Liebhart M, Klepacka T, Michałek E. Zróżnicowanie histologiczne genów grupy neuroblastomy u dzieci w zależności od wieku. Med Wieku Rozw 1999; 3: 433.

142. Limon J, Dal Cin P, Sandberg AA. Application of long-term collagenase disagregation for cytogenetic analysis of human solid tumors. Cancer Genet Cytogenet 1986; 23: 392.

143. Lipska B, Limon J. Nerwiak zarodkowy (Nb) – znaczenie wyników badań cytogenetycznych i molekularnych w ustaleniu strategii leczenia i rokowania. Post Biol Kom 2005; 32: 59.

144. Look AT, Hayes FA, Nitchke R i in. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. N Engl J Med 1984; 311: 231.

145. Look T, Hayes FA, Schuster JJ. Clinical Relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group Study. J Clin Oncol1 1991; 4: 581.

146. Lu X, Pearson A, Lunec J. The MYCN oncoprotein as a drug development target. Cancer Lett 2003; 197: 125.

147. Łastowska M, Cotterill S, Bown i in. Breakpoint position on 17q identifies the most aggressive neuroblastoma tumors. Genes Chromosomes Cancer 2002; 34: 428.

148. Łastowska M, Cullinane C, Variena S i in. Comprehensive genetic and histopatologic study reveals three types of neuroblastoma tumors. J Clin Oncol 2001; 19: 3080.

149. Łastowska M, Nacheva E, McGuckin A i in. Comparative Genomic Hybridization Study of Primary Nauroblastoma Tumors. Genes Chromosomes Cancer 1997; 18: 162.

150. Łastowska M, Roberts P, Pearson ADJ i in. Promiscuous translocations of chromosome arm 17q in human neuroblastomas. Genes Chromosomes Cancer 1996; 17: 156.

151. Manohar CF, Bray JA, Salven HR i in. MYCN – mediated regulation of the MRP 1 promoter in human neuroblastoma. Oncogene 2004; 23: 753.

152. Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma J Clin Oncol 1999; 17: 2264.

153. Maris JM, Matthew J, Weiss i in. Loss of heterozygozity at 1p36 indepenently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: A Children Cancer Group Study. J Clin Oncol 2000; 18: 1888.

154. Martin L, Green B, Renshaw C i in. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. Br J Cancer 1997; 76: 1046.

155. Martinsson T, Sjoberg RM, Hedborg F i in. Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms. Cancer Res 1995; 55: 5681.

156. Martinsson T, Weith A, Cziepluch C i in. Chromosome 1 deletions in human neuroblastomas. Generation and fine mapping of microclones from the distal 1p region. Genes Chromosomes Cancer 1989; 1: 167.

157. Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR i in. Identify of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature 1984; 309: 374.

158. Matsunaga T, Shirasawa H, Hishiki T i in. Enhances expression of MYCN messenger RNA in neuroblastomas found by mass screening. Clin Cancer Res 2000; 6: 3199.

159. Matthay K. MYCN expression in neuroblastoma:a mixed message? J Clin Oncol 2000; 18: 3591.

160. Matthay KK, Castelberry RP. Treatment of advanced neuroblastoma. The US experience. W: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y and Voute PA *Neuroblastoma*, Elsevier 2000; 417.

161. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC i in. Treatment of high risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. N Engl J Med 1999; 341: 1165.

162. Matthay KK, Tan JC, Villablanca JG. Phase I dose escalation in iodine-131-metaiodobenzylguanidine with myeloablative chemotherapy and autologous stem-cell transplantation in refractory neuroblastoma: a new approaches to Neuroblastoma therapy consortium Study. J Clin Oncol 2006; 24; 500.

163. McConville CM, Forsyth J. Neuroblastoma – a developmental perspective. Cancer Lett 2003; 197: 3.

164. Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW i in. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. J Clin Oncol 1996; 14: 405.

165. Mejia M, Navarro S, Pellin A i wsp. Study of proliferation and apoptosis in neuroblastoma. Their relationship with other prognostic factors. Arch Med Res 2002; 33: 446.

166. Merrens F, Johansson B, Hoglund M i in. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. Cancer Res 1997; 57: 2763.

167. Minard V, Hartman O, Peyroulet MC i in. Adverse outcome of infants with metastatic neuroblastoma, MYCN amplification and/or bone lesions: results of the French Society of Pediatric Oncology. BJC 2000; 83: 973.

168. Miyauchi J, Matsuoka K, Oka T i in. Histopathological findings of advanced neuroblastoma after intensive induction chemotherapy. J Pediatr Surg 1997; 32: 1620.

169. Miyauchi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol 1978; 121: 2228.

170. Moens CB, Stanton BR, Parada LF i in. Defects in heart and lung development in compound heterozygotes for two different targeted mutations at the N-myc locus. Development 1993; 119: 485.

171. Mora J, Cheung NK, Chen L i in. Loss of cheterozygosity at 19q13.3 is associated with locally aggressive neuroblastoma. Clin Cancer Res 2001; 7, 1358.

172. Mora J, Cheung N-KV, Juan G i in. Neuroblastic and Schwannian stroma cells of neuroblastoma are derived from a tumoral progenitor cell. Cancer Res 2001; 61: 6892.

173. Morris JA, Schochat SJ, Smith EI I in. Biological variables in thoracic neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group Study. J Pediatr Surg 1955; 30: 296.

174. Mujtaba T, Mayer-Proschel M, Rao MS. A common neural progenitor for the CNS and PNS. Dev Biol 1998; 200: 1.

175. Nakagawara A. Neural crest developement and neuroblastoma: the genetic and biological link. Progr Brain Res 2004; 146: 233.

176. Nakagawara A., Azar CG, Scavarda NJ i in. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. Mol Cell Biol 1994; 14: 759.

177. Nickerson HJ, Matthey KK, Seeger RC i in. Favorable biology and outcome of stage IV-s neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group Study. J Clin Oncol 1997; 15: 85.

178. Nishihira H, Toyoda Y, Tanaka Y i in. Natural course of neuroblastoma detected by mass screening. A five-year prospective study at a single institution. J Clin Oncol 2000; 18: 3012.

179. Nitschke R, Smith EI, Shochat S i in. Localised neuroblastoma treated by surgery: A Pediatric Oncology Group Study. J Clin Oncol 1988; 6: 1271.

180. Noesel MM, Verteeg R. Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic „danse macabre". Gene 2004; 21: 1.

181. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar i in. Experince of the Izmir Pediatric Oncology Group in neuroblastoma IPOG-NBL-92 Protocol. Pediatr Hematol Oncol 2003; 20: 211.

182. O'Neill S, Ekstrom L, Łastowska M i in. MYCN amplification and 17q in neuroblastoma: evidence for structural association. Genes Chromosomes Cancer 2001; 30: 87.

183. O'Reilly MS, Holmpsen L, Shing Y i in. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Levis lung carcinoma. Cell 1994; 79: 315.

184. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y i in. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell 1997; 88: 277.

185. Oue T, Fukuzawa M, Kamata S i in. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antygen expression in human neuroblastoma. J Pediatr Surg 1995; 30: 528.

186. Pastewska K, Skopińska-Różewska E. Angiogeneza w raku nerki. Nowa Med, 1999; 3: 1-5.

187. Paul SR, Tarbell NJ, Korf B i in. Stage IV neuroblastoma in infants: long term survival. Cancer 1991; 67: 1493.

188. Pearson ADJ, Philip T. Prognosis of low risk and high risk neuroblastoma. W Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y and Voute PA. *Neuroblastoma*, Elsevier 2000, 551.

189. Pepper MS, Ferrara N, Montestano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. Biochem Biophys Res Commun 1992; 189: 824.

190. Perek D, Dembowska B., Więckowska J. Results of neuroblastoma treatment with own protocol. Ped. Pol 1997; 11,suppl: 26.

191. Pizzo PA, Brodeur GM, Castleberry RP. Neuroblastoma. W: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology,* Philadelphia PA,Lippincott Raven 1997; 761.

192. Plantaz D, Mohapatra G, Matthay KK i in. Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybrydisation. Am J Pathol 1997; 150: 81.

193. Poon RT. Crucial role of VEGF in regulation of angiogenesis. J Clin Oncol 2001; 19: 1207.

194. Poremba C, Willenbring H, Hero B i in. Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis. Ann Oncol 1999; 10: 715.

195. Pritchard J, Hickman JA. Why does stage IVs neuroblastoma regress spontaneously? Lancet 1994; 344: 869.

196. Protokoły CCG: Pritchard J, Mc Elwain TJ, Graham Pole J I in. High dose melphalan with autologous marrow for treatment of advances neuroblastoma. Br J Cancer 1982; 45; 86.

197. Pearson ADJ, Pinkerton CR, Lewis IJ. The European Neuroblastoma Group Fifth Study (ENSGS). A randomized study of dose intensity in stage 4 neuroblastoma over the age of one. W: Evans AE, Biedler JL, Brodeur GM, D'Angio G, Nakagawara A. *Advances in neuroblastoma research*, New York, Wiley Liss Inc, 1994; 444.

198. Quinn JJ, Altman AJ, Frantz CN. Serum lactic dehydrogenase, an indicator of tumor activity in neuroblastoma. J Pediatr 1980; 97: 89.

199. Radzikowski C, Opolski A, Wietrzyk J. Znaczenie angiogenezy w dynamice wzrostu nowotworu. Post Hig Med. Dośw 1998; 52: 553.

200. Radzikowski C, Opolski A. Cancer invasion and metastasis. W: Kornafel J, Chybicka A. *Recent advances in the knowledge of cancer.* AM Wrocław "Plevax" 1999; 123.

201. Raff M, Barres B, Burne J i in. Programmed cell death and the control of the cell survival: lessons from the nervous system. Science 1993; 262: 695.

202. Rees MCP, Bicknel R. Angiogenesis in the endometrium. Angiogenesis 1998; 2: 29.

203. Reich A, Kazanowska B, Drożyńska E i in. Prognostic significance of telomerase activity in neuroblastoma like tumors. Nowotwory 2004; 54: 230.

204. Ribatti D, Vacca A, Nico B. i in. Angiogenesis and anti-angiogenesis in neuroblastoma. Eur J Cancer 2002; 38: 750.

205. Ribatti D, Vacca A, Nico B. New non-angiogenesis dependent pathways for tumour growth. Eur J Cancer 2003; 39: 1835.

206. Riley RD, Heney D, Jones DR i in. A systematic review of molecular and biological markers in neuroblastoma. Clin Cancer Res 2004; 10: 4.

207. Risseau W. What if anything, is an angiogenic factor? Cancer Metast Rev 1996; 15: 149.

208. Ross RA, Biedler JL, Spengler BA. A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. Cancer Lett 2003; 197: 35.

209. Rossler J, Breit S, Havers W i in. Vascular endothelial growth factor expression in human neuroblastoma. Int J Cancer 1999; 81: 113.

210. Rubie H. Loss of chromosome 1p may have a prognostic value in localised neuroblastoma: results of the French NBL 90 Study. Neuroblastoma Study Group of the Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique (SFOP). Eur J Cancer 1997; 33: 1917.

211. Rudolph P, Lappe T, Hero B i in. Prognostic significance of the proliferative activity in neuroblastoma. Am J Pathol 1997; 1509: 133.

212. Ryan PR, Penson RT, Ahmed S i in. Reality testing in cancer treatment: the phase I trial of endostatin. Oncologist 1999; 4: 501.

213. Salven P, Teerenhovi L, Joensun H. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. Clin Cancer Res 1997; 3: 647.

214. Sanak M. Molekularne podstawy karcinogenezy. W*: Podstawy medycyny molekularnej*. Med Prakt wyd specj. 2001; 1: 60.

215. Sawaguchi S, Kaneko M, Uchino J i in.. Treatment of advanced neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy. A report from The Study Group of Japan. Cancer 1990; 66: 1879.

216. Savelyeva L, Corvi R, Schwab M. Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells. Am J Hum Genet 1994; 55: 334-40.

217. Schmidt ML, Lukens JN, Seeger RC i in. Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: A prospective Children's Cancer Group Study. J Clin Oncol 2000; 18: 1260.

218. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J

Cell Physiol 2000; 182: 311.

219. Schuster JJ, McWilliams NB, Castelberry R i in. Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group Recursive Partitioning Study. Am J Clin Oncol 1992; 15: 295.

220. Schwab M, Alitalo K, Klemnauer KH. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor. Nature 1983; 305: 245.

221. Schwab M, Praml Ch, Amler LC. Genomic instability in 1p and human malignances. Genes Chromosomes Cancer 1996; 16: 211.

222. Schwab M, Shimada H, Joshi V, Brodeur GM. Peripheral neuroblastic tumours. W: Kleihues P, Cavenee WK. *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*, IARC Press Lyon 2000: 149.

223. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM i in. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. Nature 1984; 308: 288.

224. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. Nature 1985; 316: 160.

225. Schwab M, Westermann F, Hero B i in. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. Review. Lancet Oncol 2003; 4: 472.

226. Schwab M. Human neuroblastoma: from basic science to clinical debut of cellular oncogenes. Naturwissenschaften 1999; 86: 71.

227. Schweigerer L. Clinical perspectives of tumor angiogenesis in pediatric oncology. Review. Klin Padiatr 1997; 209: 257.

228. Schwab M. Matthay KK. Neuroblastoma: a clinical challenge and biological puzzle. CA Cancer J Clin 1995; 45: 179.

229. Shamberger MKJ, Litman H, von Allmen D i in. Primary tumor control in patients with stage unfavorable neuroblastoma treated with tandem double autologous stem cell transplants. J Pediatr Hematol Oncol 2003; 25: 934.

230. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin fixed paraffin embeded tissues: an enhacement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histochem Cytochem 1991; 39: 741.

231. Shimada H, Ambros I, Dehner L i in. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). Cancer 1999; 86: 354.

232. Shimada H, Chatten J, Newton WA i in. Histopatologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. J Natl Cancer Inst 1984; 73: 405.

233. Shinji T, Tatsuro T, Shin-ichi N i in. Clinical significance of highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of MYCN in neuroblastoma. J Pediatr Surg 2004; 39: 63.

234. Shorter NA, Davidoff AM, Evans AE i in. The role of surgery in the management of stage IV neuroblastoma: a single institution study. Med Pediatr Oncol 1995; 24: 287.

235. Siegel SE, Laug WE. Initial urinary catecholamine metabolites and prognosis in neuroblastoma. Pediatrics 1978; 62: 77.

236. Simon T, Hero B, Hunneman DH i in. Tumour markers are poor predictors for relapse or progression in neuroblastoma. Eur J Cancer 2003; 39: 1899.

237. Spitz R, Hero B, Ernestus K i in. FISH analyses for alterations in chromosomes 1,2,3 and 11 define high risk groups in neuroblastoma. Med Pediatr Oncol 2003; 41: 30.

238. Spunt SL, Poquette Ca, Hurt YS i in. Prognostic factors for children and adolescents with surgically resected nonrhabdomyosarcoma soft tissue sarcoma: An analysis of 121 patients treated at St Jude Children's Research Hospital. J Clin Oncol 1999; 17: 3697.

239. Staalmach ChR, Hoefnagel CA. Imaging of neuroblastoma and metastasis. W: Brodeur GM, Sawada T *Neuroblastoma*, Elsevier 2000; 303.

240. Stanton BL, Parada L. The N-myc proto-oncogene: developmental expression and in vivo site-directed mutagenesis. Brain Pathol 1992; 2: 71.

241. Stark B, Jeison M, Glaser-Gabay L i in. Der(11)t(11;17): distinct cytogenetic pathway of advanced stage neuroblastoma (NBL)-detected by spectral karyotyping (SKY). Cancer Lett 2003; 197: 75.

242. Stellmach V, Volpert OV, Crawford SE i in. Tumor supressor genes and angiogenesis: the role of TP53 in endothelial fibroblasts. Eur J Cancer 1996; 32A: 2394.

243. Stephens JC, Cavanaugh ML, Gradie MI i in. Mapping the human genome. Current status. Science 1990; 250: 237.

244. Strother D, Shuster JJ, McWilliams N i in. Results of pediatric Oncology Group Protocol 8104 for infants with stages D and Ds neuroblastoma. J Pediatr Hematol Oncol 1995; 17: 254.

245. Sun XF, Liu DG, Su YS i in. Evaluation of efficancy of treatment for 30 children with neuroblastoma. (abstract w Medline), Ai Zheng 2003; 22: 1343.

246. Suwiński R, Withers HR. Ocena zależności między objętością guza pierwotnego a ryzykiem wystąpienia przerzutów i jej implikacje kliniczne. Nowotwory 1999; 49: 513.

247. Tabone MD, Landman-Parker J, Arcil B i in. Are basic Fibroblasts Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor prognostic indicators in pediatric patients with malignant solid tumors? Clin Cancer Res 2001; 7: 538.

248. Tanaka T, Ichara T, Sugimoto Ti in. Diversity in neuroblastomas and discrimination of the risk to progress. Cancer Lett 2005; 228: 267.

249. Teitz T, Wei T, Valentine MB. Caspase 8 is detected or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. Nature Med 2000; 6: 529.

250. Terui E, Matsunaga T, Yoshida H i in. Shc family expression in neuroblastoma: high expression of chc C is associated with a poor prognosis in advanced neuroblastoma. Clin Cancer Res 2005; 11: 3280.

251. Thomas SK, Messam CA, Spengler BA i in. Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells. J Biol Chem 2004, 279: 279.

252. Tonini GP, Boni L, Pession A i in. MYCN oncogene amplification in neuroblastoma is associated with worse prognosis, except in stage IVs: the Italia experience with 295 children. J Clin Oncol 1997; 15: 85.

253. Tonini GP, Lo Cunsolo C, Cusano R I in. Loss of heterozygosity for chromosome 1p in familial neuroblastoma. Eur J Cancer 1997; 33: 1953.

254. Tonini GP, Longo L, Coco S i in. Familial neuroblastoma: a complex heritable disease. Review. Cancer Lett 2003; 18: 41.

255. Tonini GP, Romani M. Genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma. Cancer Lett 2003; 197: 69.

256. Tornóczky T, Kalman E, Kajter PG i in. Large cell neuroblastoma. A distinct phenotype of neuroblastoma with aggressive clinical behavior. Cancer 2000; 15: 390.

257. Trakhtenbrot L, Cohen N, Betts DR i in. Interphase fluorescence in situ hybridisation detection of chromosome 17q region gains in neuroblastoma: are they secondary events? Cancer Genet Cytogenet 2002; 137: 95.

258. Tsuschida Y, Yokoyama J, Kaneko M i in. Therapeutic significance of surgery in advanced neuroblastoma: A report from the study group of Japan. J Paediatr Surg 1992; 27: 616.

259. Tonini GP, Romani M. Genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma. Cancer Lett 2003; 197: 69.

260. Toi M, Tanigushi T, Yamamoto y i in. Clinical significance of the determination of angiogenic factors. Eur J Cancer 1996; 32A: 2513.

261. Valent A, Le Roux G, Barrois M i in. MYCN gene overepresentation detected in primary tumour cells without amplification. J Pathol 2002; 198: 495.

262. Valentij L, Koppen A, Asperen R. Inhibition of a new differentation pathway in neuroblastoma by copy number defects of N-myc, cdc 42 and nm23 genes. Cancer Res 2005; 65: 3136.

263. Van Hoef ME, Knox WF, Dhesi SS i in. Assessment of tumor vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. Eur J Cancer 1993; 29A: 1141.

264. Van Roy N, Van Limbergen H, Vandesompele J i in. Combined M-Fish and CGH analysis allows comprehensive description of genetic alterations in neuroblastoma cell lines. Genes Chromosomes Cancer 2001; 32: 126.

265. Vandesompele J, Speleman F, Van Roy N i in. Multicentre analysis of patterns of DNA gains and losses in 204 neuroblastoma tumors: how many genetic subgroups are there? Med. Pediatr Oncol 2001; 36: 5.

266. Vandesompele J, Van Roy N, Van Gele M i in. Genetic heterogeneity of neuroblastoma studied by CGH. Genes Chromosomes Cancer 1998; 23: 141.

267. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB i wsp. Quantification of angiogenesis in solid human tumors. An international consensus on the methology and criterie evamation. Eur J Cancer 1996; 32A: 2472.

268. Vesely D, Astl J, Matucha P i in. Serum levels of angiogenic growth factors in patients with thyroid gland tumors and parathyroid adenoma. Neuro Endocrinol Lett 2003; 24: 417.

269. Volpert OV, Lawler J, Bouck NP. A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via trombospondin-1. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 634.

270. Voute PA. 131I metaiodobenzylguanidine therapy after conventional therapy for neuroblastoma. J Nucl Biol Med 1991; 35: 202.

271. Wang GL, Jiang BH, Rue EA i in. Hypoxia-inducible factor-1 is a basic helix-loop helix PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 5510.

272. Wassem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen. J Cell Sci 1990; 96: 121.

273. Weidner N. Angiogenesis as a predictor of clinical outcome in cancer patients. Hum Pathol 2000; 31: 403.

274. Weinstein JL, Katzenstein HM, Cohn SL. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. Oncologist 2003; 8: 278.

275. Wexter LH, Hemal LJ .Rhabdomyosarcoma and the undifferentiated sarcomas. W : Pizzo PA, Poplack DG . *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, wyd 3. Philadelphia, PA, Lippincott Raven 1997; 799.

276. Wenzel A, Cziepluch C, Hamann U i in. The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max (p20/22) in human neuroblastoma cells. EMBO J 1991; 10: 3703.

277. Wittke I, Magde B, Wiedemeyer R i in. DAP-5 is involved in MycN/IFNgamma- induced apoptosis in human neuroblastoma cells. Cancer Lett 2001; 162: 237.

278. Wołowiec D. Cell cycle regulatory. W: Kornafel J, Chybicka A *Recent advances in the knowledge of cance*, wyd AM Wrocław "Plevax" 1999; 12.

279. Yunis JJ, Roldan L, Yasminek WG I in. Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes. Nature 1971; 231: 532.

280. Zelter PM, Marangos PJ, Evans AE i in. Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma. Relationship to stage and disease course. Cancer 1986, 57: 1230.

281. Zhang Y, Deng Y, Luther T i in. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. J Clin Invest 1994; 94: 1320.

10. ZAŁĄCZNIKI

10.1. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA

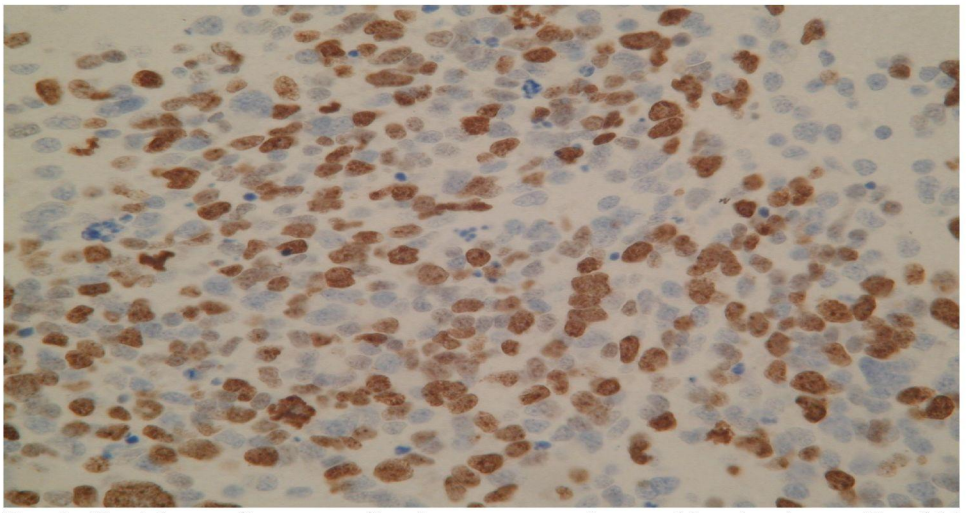
Dokumentację fotograficzną badań immunohistochemicznych i cytogetycznych sporządzono przy użyciu filmów negatywowych Kodak Gold Ultra ISO 400/27°.

Przedstawione na fotografiach preparaty immunohistochemiczne (fot. 1-16) wykonane zostały przez dr Ewę Iżycką-Świeszewską w Zakładzie Patomorfologii AMG (kierownik – dr hab. Kazimierz Jaśkiewicz, prof. ndzw. AMG).

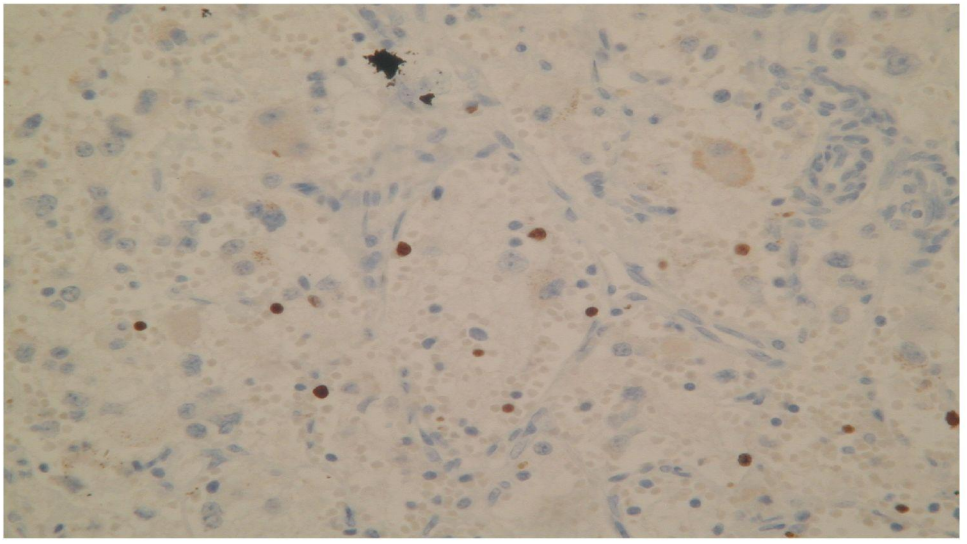
Przedstawione na fotografiach preparaty cytogenetyczne (fot. 17-22) wykonane zostały przez dr Iwonę Kardaś w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki AMG (kierownik – prof. dr hab. Janusz Limon).

10.2. WZÓR ANKIETY DANYCH KLINICZNYCH

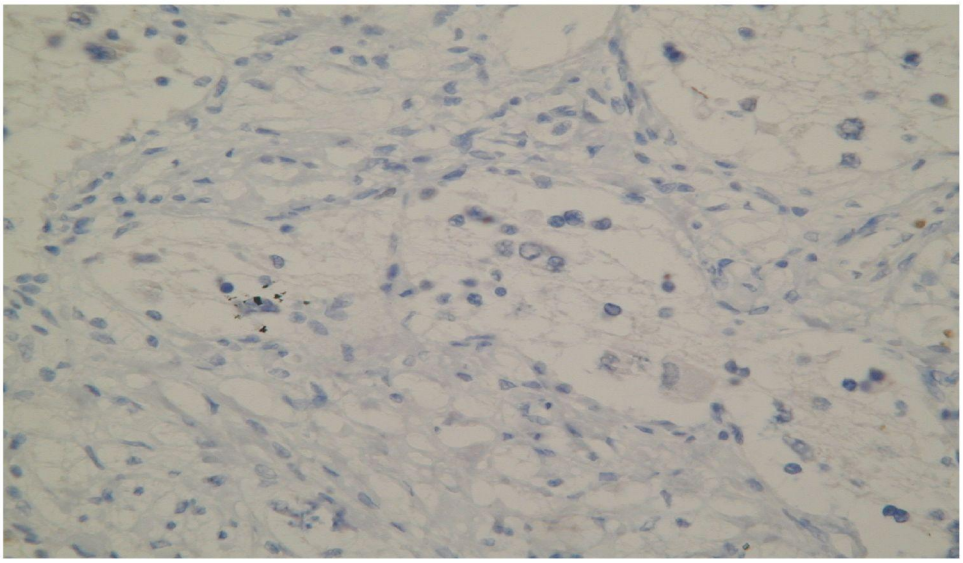
Opracowany został przez autorkę badań.



Fot. 1. Zwojak zarodkowy współczulny - preparat immunohistochemiczny. Komórki znakowane przeciwciałami p/w Ki-67 (pow. mikroskop. 400x). Wysoki IP=72%.
Phot.1. Neuroblastoma - immunohistochemical staining of Ki-67 positive cells (microscop. magnific. 400x). High PI=72%.

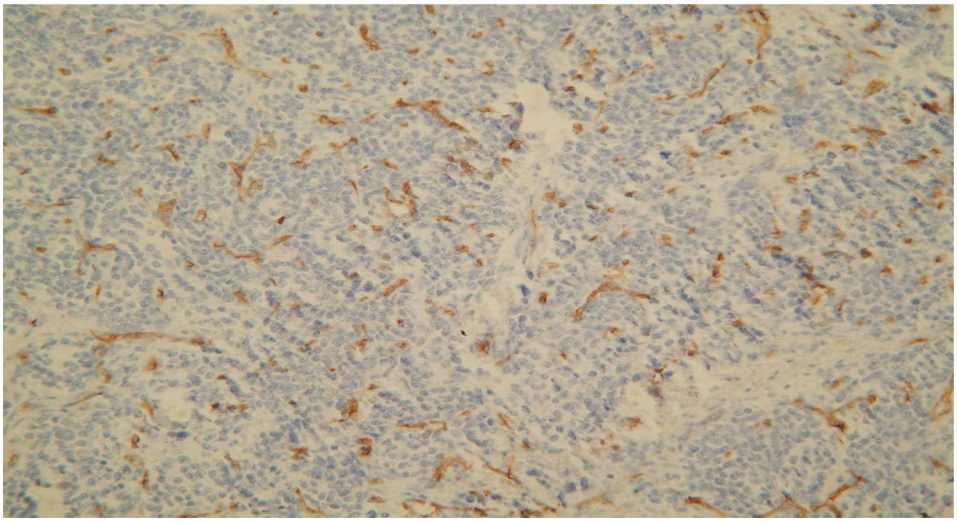


Fot. 2. Zwojak zarodkowy współczulny - preparat immunohistochemiczny. Komórki znakowane przeciwciałami p/w Ki-67 (pow. mikroskop. 400x). Niski IP=5%.
Phot. 2. Neuroblastoma - immunohistochemical staining of Ki-67 positive cells (microscop. magnific. 400x). Low PI=5%.



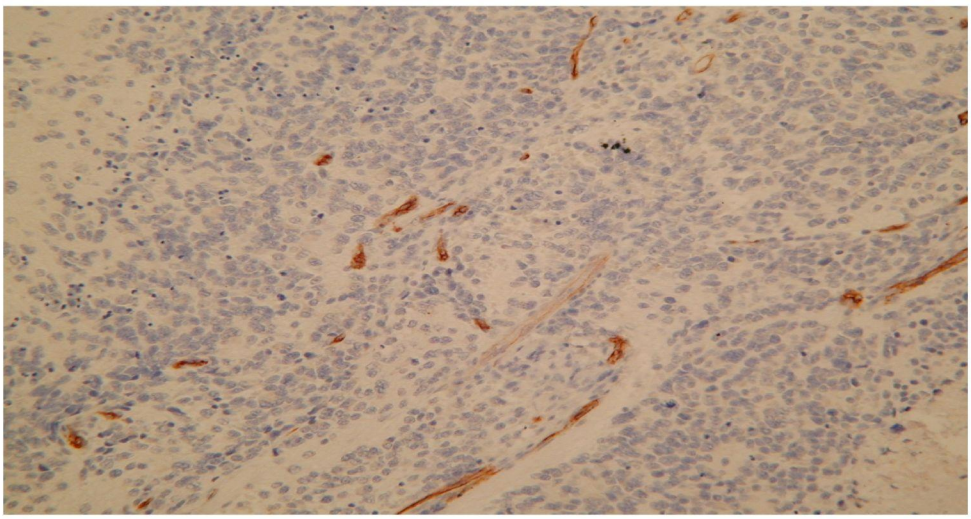
Fot. 3. Ganglioneuroblastoma - preparat immunohistochemiczny wykonany z zastosowaniem przeciwciał p/w Ki-67 (pow. mikroskop. 400x). Brak komórek immunopozytywnych. IP=0%.

Phot.3. Ganglioneuroblastoma - immunohistochemical staining of KI-67. Lack of Ki-67 positive cells (microscop. magnific. 400x). IP=0%.

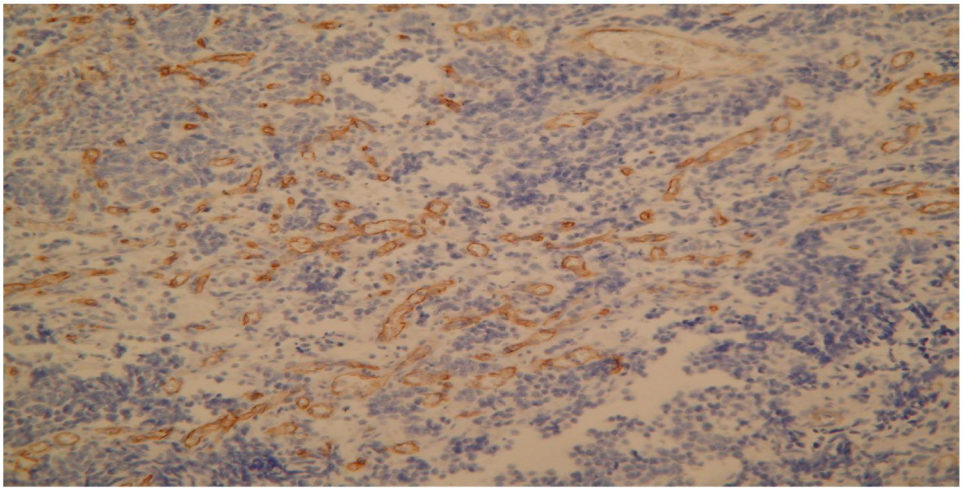


Fot. 4. Zwojak zarodkowy współczulny - preparat immunohistochemiczny (pow. mikroskop. 200x). Widoczne są naczynia w „gorącym polu" znakowane przeciwciałami p/w CD34. Stwierdzono wysoką gęstość naczyń MVD =304 naczyń/mm^2.

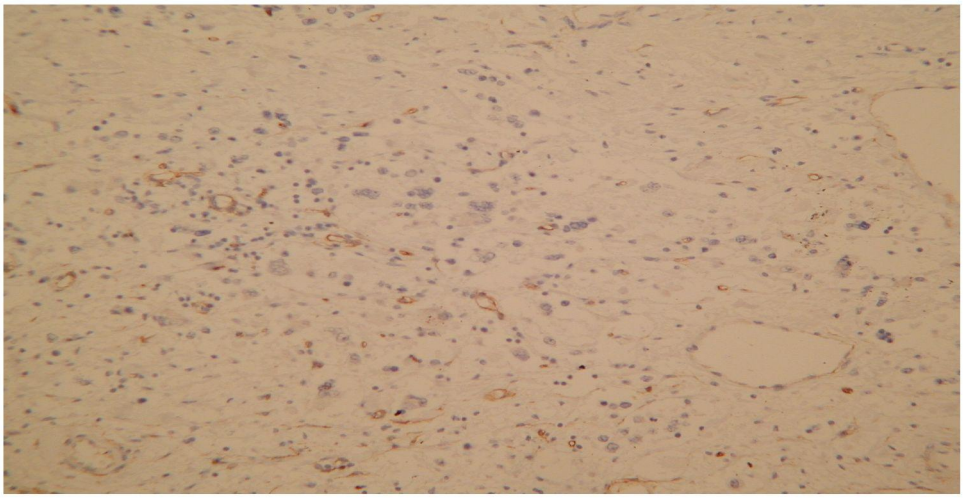
Phot.4. Neuroblastoma – immunohistochemical staining for CD 34 (microscop. magnific. 200x). The vessels are visualized in "hot spot". The high vasularity is stated MVD=304 vessels/mm^2.



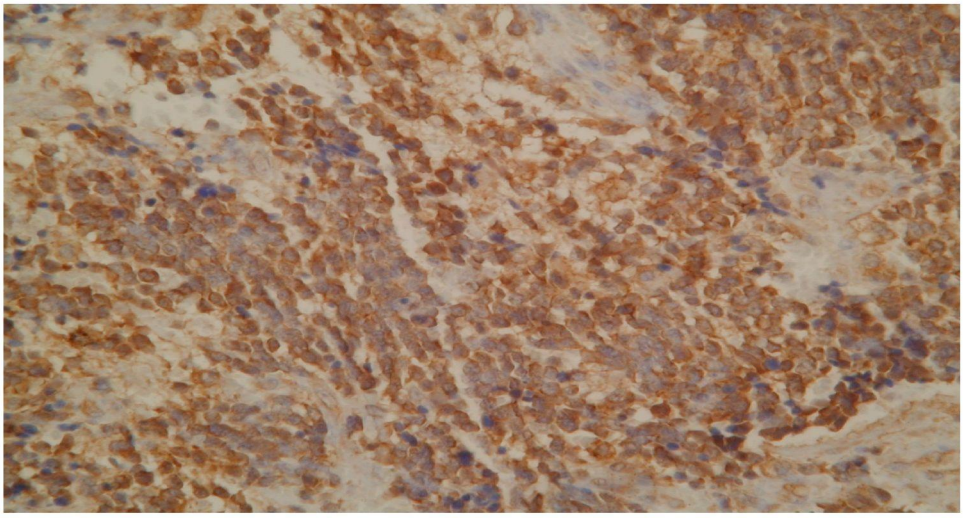
Fot. 5. Zwojak zarodkowy współczulny - preparat immunohistochemiczny (pow. mikroskop. 200x). Widoczne są naczynia w „gorącym polu" znakowane przeciwciałami p/w CD34. Gęstość naczyń w „gorącym polu" jest niska MVD=48 naczyń/mm^2.
Phot.5. Neuroblastoma – immunohistochemical staining for CD 34 (microscop. magnific. 200x). The vessels are visualized in "hot spot". The low vasularity is stated MVD=48 vessels/mm^2.



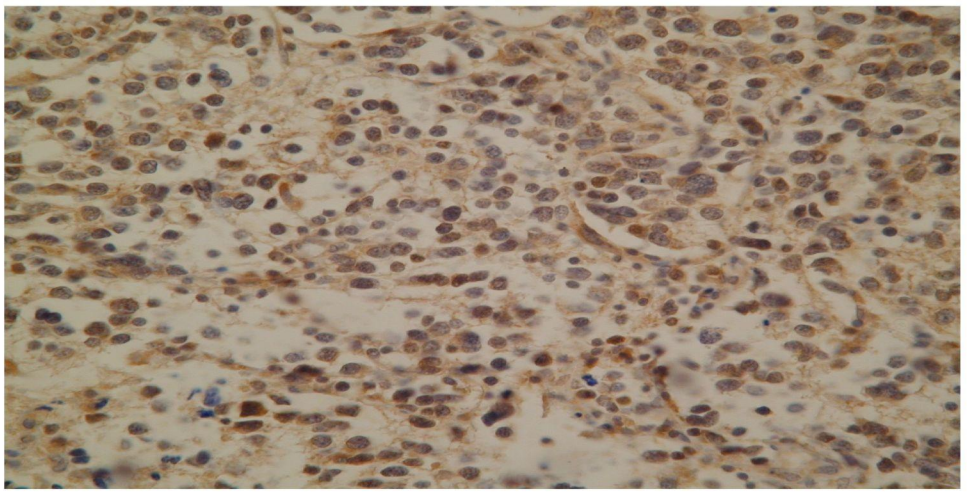
Fot. 6. Zwojak zarodkowy współczulny - preparat immunohistochemiczny (pow. mikroskop. 200x). Widoczne są naczynia w „gorącym polu" znakowane przeciwciałami p/w CD34. Gęstość naczyń w „gorącym polu" jest niska MVD=96 naczyń/mm^2.
Phot.6. Neuroblastoma – immunohistochemical staining for CD 34 (microscop. magnific. 200x). The vessels are visualized in "hot spot". The low vasularity is stated MVD=96 vessels/mm^2.



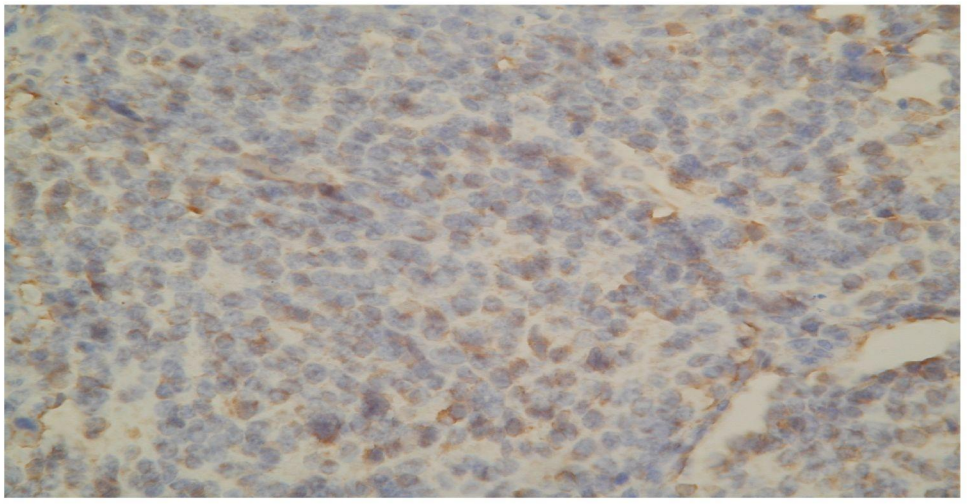
Fot. 7 Ganglioneuroblastoma - preparat immunohistochemiczny (pow. mikroskop. 200x). Widoczne są naczynia znakowane przeciwciałami p/w CD34. Gęstość naczyń jest niska MVD=64 naczyń/mm^2.
Phot.7. Ganglioneuroblastoma – immunohistochemical staining for CD 34 (microscop. magnific. 200x). The vessels are visualized. The low vasularity is stated MVD=64 vessels/mm^2.



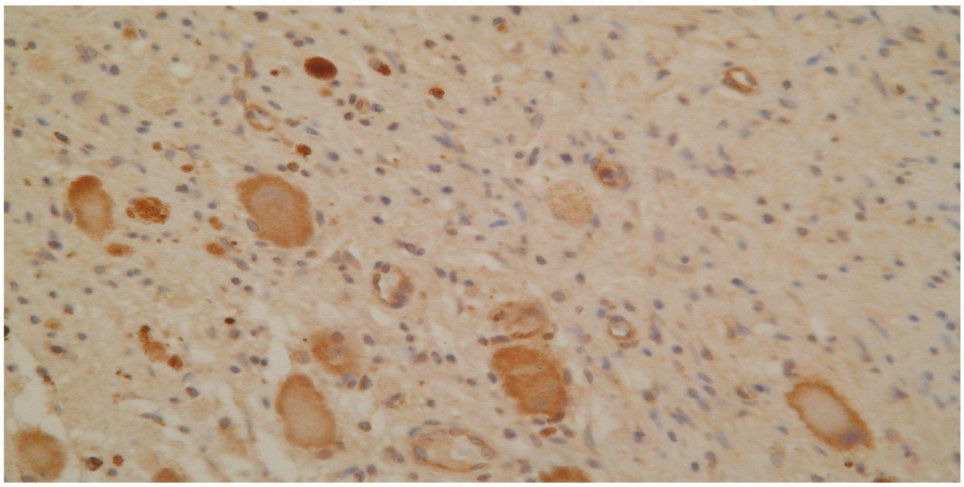
Fot. 8. Zwojak zarodkowy współczulny - preparat immunohistochemiczny znakowany przeciwciałami przeciw VEGF (pow. mikroskop. 200x). Wysoka ekspresja VEGF w „gorącym polu" (+++).
Phot.8. Neuroblastoma – immunohistochemical staining for VEGF (microscop. magnific. 200x). There is high VEGF expression in "hot spot" (+++).



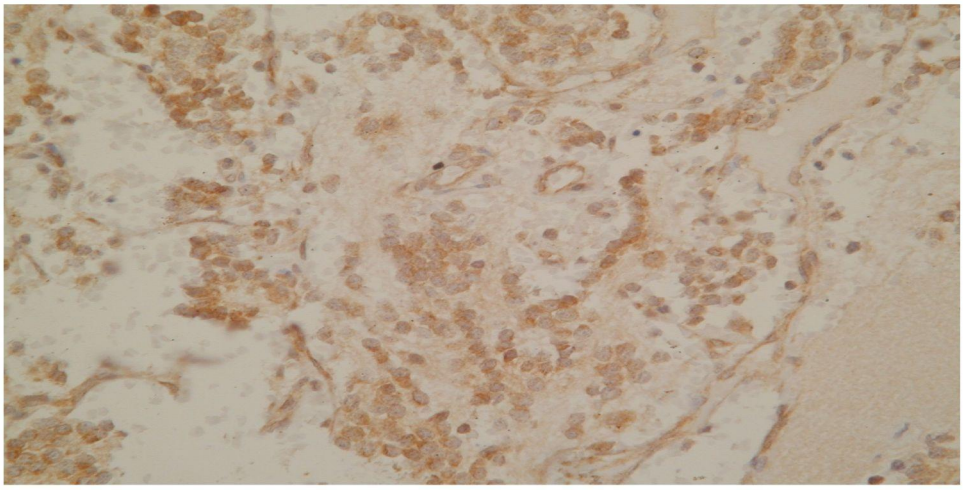
Fot. 9. Zwojak zarodkowy współczulny-preparat immunohistochemiczny znakowany przeciwciałami przeciw VEGF (pow. mikroskop. 200x). Ekspresja VEGF w „gorącym polu" (++).
Phot.9. Neuroblastoma – immunohistochemical staining for VEGF (microscop. magnific. 200x). The VEGF expression in „hot spot"(++).



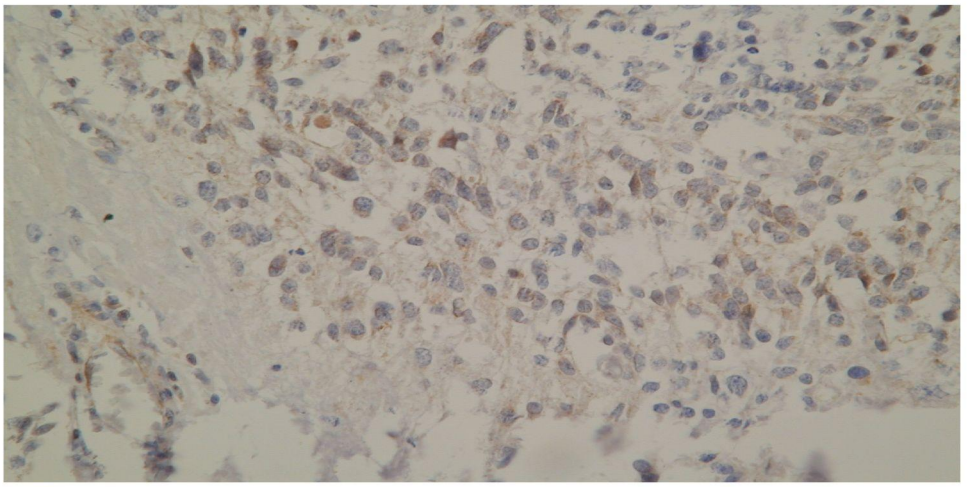
Fot. 10. Zwojak zarodkowy współczulny - preparat immunohistochemiczny znakowany przeciwciałami przeciw VEGF (pow. mikroskop. 200x). Niska ekspresja VEGF w „gorącym polu" (+).
Phot.10. Neuroblastoma – immunohistochemical staining for VEGF (microscop. magnific. 200x). There is low VEGF expression in "hot spot" (+).



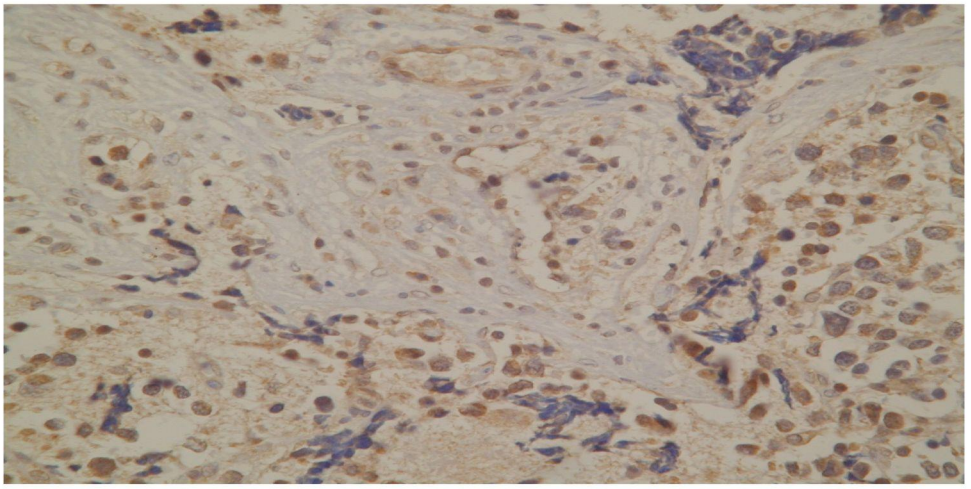
Fot. 11. Ganglioneuroblastoma - preparat immunohistochemiczny znakowany przeciwciałami przeciw VEGF (pow. mikroskop. 200x). Wysoka ekspresja VEGF w komórkach zwojowych (+++).
Phot.11. Ganglioneuroblastoma – immunohistochemical staining for VEGF (microscop. magnific. 200x). There is high VEGF expression in "hot spot" (+++).



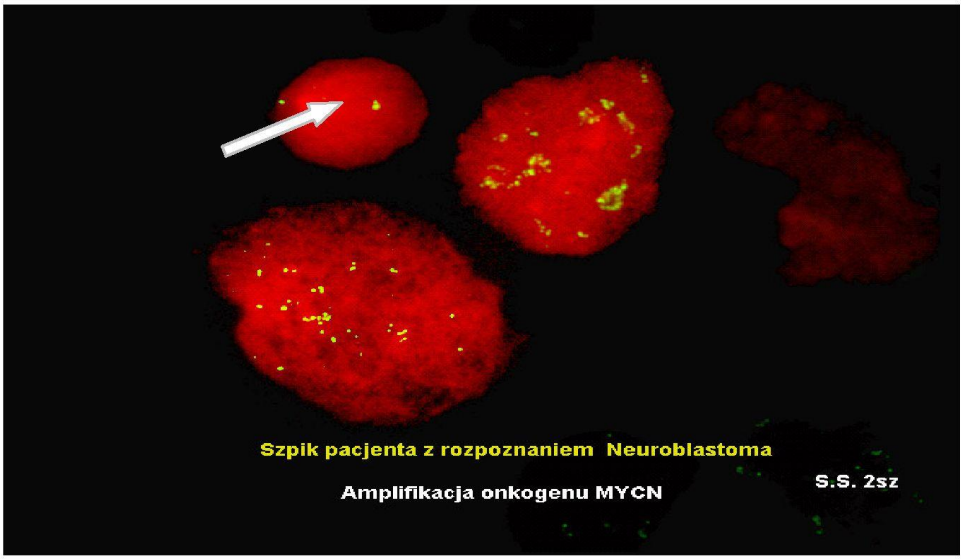
Fot. 12. Zwojak zarodkowy współczulny-preparat immunohistochemiczny znakowany przeciwciałami przeciw Flk-1 (pow. mikroskop. 400x). W „gorącym polu widoczne są komórki naczyń z wysoką ekspresją Flk-1 (+++).
Phot.12. Neuroblastoma – immunohistochemical staining for Flk-1 (microscop. magnific. 400x). There is high Flk-1 expression in "hot spot" (+++).



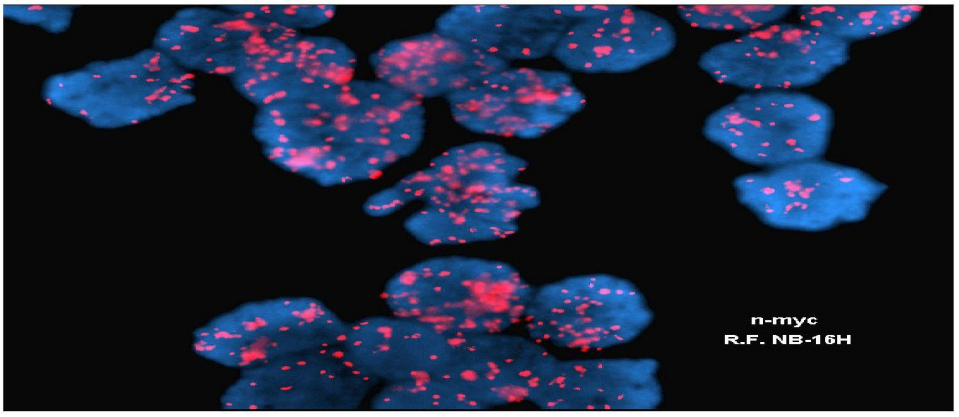
Fot. 13. Zwojak zarodkowy współczulny - preparat immunohistochemiczny znakowany przeciwciałami przeciw Flk-1 (pow. mikroskop. 400x). W „gorącym polu" widoczna jest niska ekspresja Flk-1- w pojedynczych komórkach nowotworowych(+).
Phot.13. Neuroblastoma – immunohistochemical staining for Flk-1 (microscop. magnific. 400x). There is low Flk-1 expression inside several cells in "hot spot" (+).



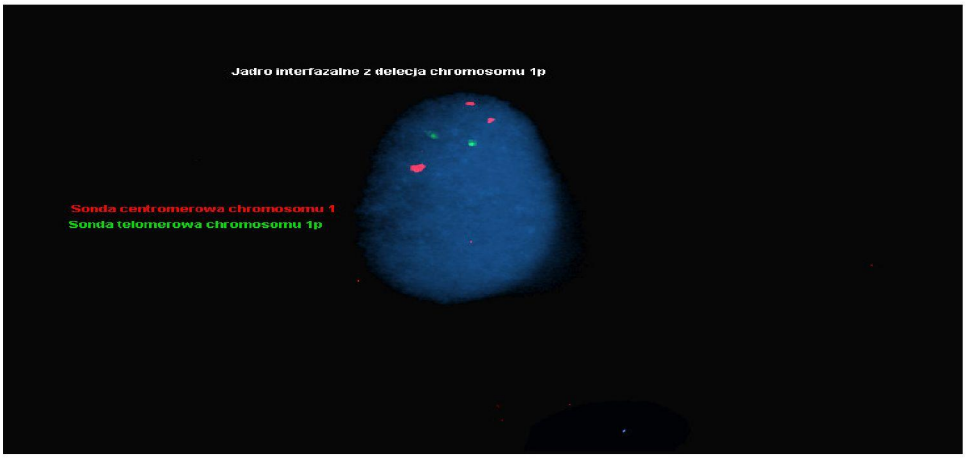
Fot. 14. Zwojak zarodkowy współczulny - preparat immunohistochemiczny znakowany przeciwciałami przeciw Flk-1 (pow. mikroskop. 400x). Widoczna jest ekspresja Flk-1 w komórkach nowotworowych i naczyniach (++).
Phot.14. Neuroblastoma – immunohistochemical staining for Flk-1 (microscop. magnific. 400x). Flk-1 expression is visualized inside the neoplasmatic cells and in the vessels (++).



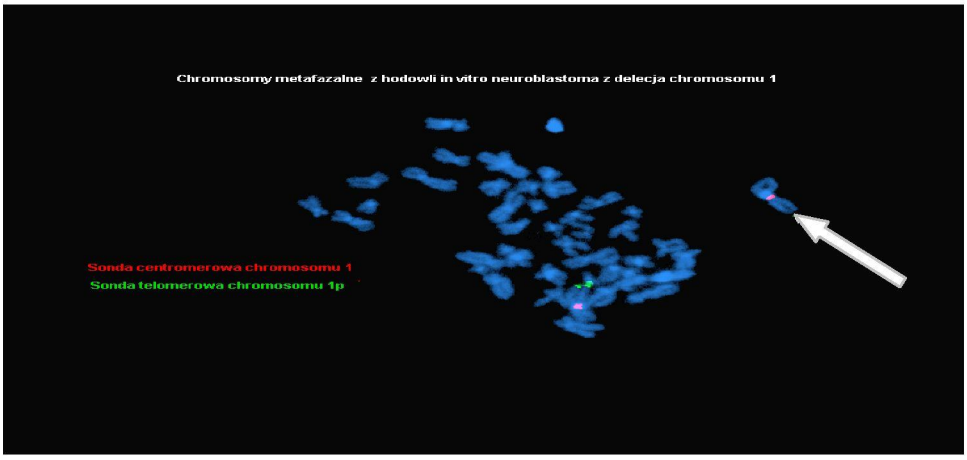
Fot. 15. Amplifikacja *NMYC*. Badanie metodą FISH komórek Nb z rozmazu szpiku. Sonda malująca: LSI N-myc Spectrum Orange (pow. mikroskop. 1250 x). Strzałka wskazuje sygnał onkogenu *NMYC* w jądrze kom. z obecnością dwóch kopii *NMYC*, w pozostałych jądrach stwierdza się zwiększoną liczbę sygnałów.
Phot.15. MYCN amplification. FISH analysis of Nb cells from bone marrow smear. Paint probe: LSI N-myc Spectrum Orange (microscop. magnific. 1250x). Arrow-head indicate signal of oncogen MYCN in the cell nucleus with two copies of MYCN, in the rest nuclei multiplication of signals is seen



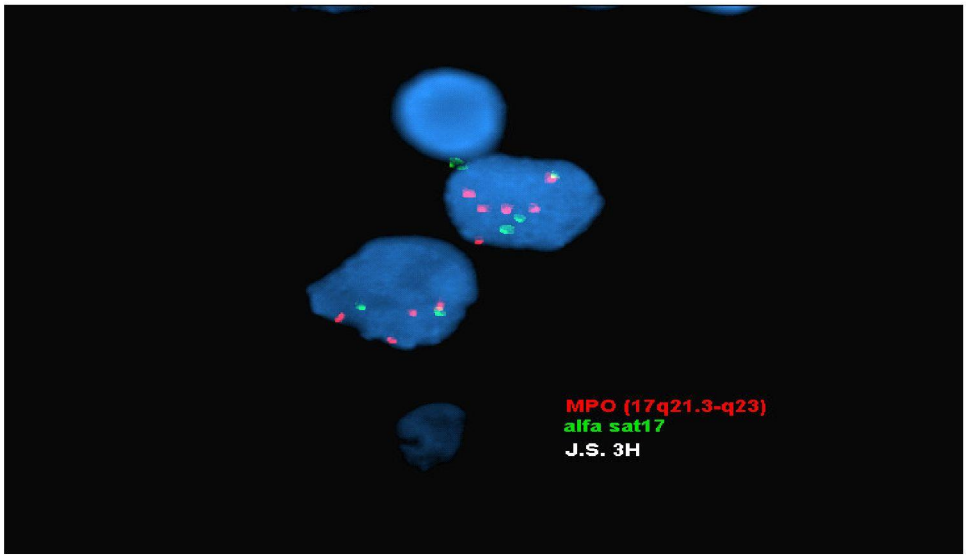
Fot. 16. Amplifikacja *NMYC*. Badanie metodą FISH komórek Nb z preparatu odciskowego guza. Sonda malująca: LSI N-myc Spectrum Orange (pow. mikroskop. 1250 x). We wszystkich jądrach występuje masywna amplifikacja badanego onkogenu.
Phot.16. MYCN amplification. FISH analysis of Nb cells from the imprint slide of a primary tumor. Paint probe: LSI N-myc Spectrum Orange (microscop. magnific. 1250x). The massive amplification of MYCN is seen in every cell nucleus.



Fot. 17. Komórka z delecją fragmentu krótkiego ramienia chromosomu 1. Badanie metodą FISH komórek Nb z preparatu odciskowego guza (pow. mikroskop. 1250 x). Zastosowano sondę centromerową (kolor czerwony) oraz telomerową (kolor zielony) chromosomu 1. Stosunek sygnałów zielonych do czerwonych wskazuje na delecję w chromosomie 1p.
Phot.17. Deletion of the part of short arm of chromosome 1. FISH analysis of Nb cell from the imprint slide of a primary tumor (microscop. magnific. 1250x). Painted probes: centromeric probe (green colour) and telomeric probe (red colour) of chromosome 1. The rate of green signals to the red signals indicates the presence of del(1p).



Fot. 18. Chromosomy metafazalne z delecją chromosomu 1p. Zastosowano badanie metodą FISH chromosomów uzyskanych z komórek metafazalnych hodowanych in vitro (pow. mikroskop. 1250x). Zaznaczony strzałką chromosom 1 (obszar okołocentromerowy świeci na czerwono) pozbawiony jest okołotelomerowego fragmentu (brak zielonego sygnału).
Phot.18. Metaphase chromosomes with del(1p). FISH analysis of chromosomes from Nb cells from tumor tissue culture (microscop. magnific. 1250x). Arrow-head indicate chromosome 1 (centromeric red signal without telomeric green signal)



Fot. 19. Częściowa trisomia chromosomu 17q w jądrach komórkowych Nb. Badanie metodą FISH komórek z preparatu odciskowego (powiększenie: 100x12,5). Poprzez analizę stosunku sygnałów czerwonych (sonda specyficzna dla obszaru 17q21.3-q23) oraz zielonych (sonda centromerowa chromosomu 17) wykazano częściową trisomię chromosomu 17.

Phot.19. Partial 17q gain in Nb cells nuclei. FISH analysis from the imprint slide of a primary tumor (microscop. magnific. 1250x). Analysis of the rate of probe signals: red signals (specific probe for 17q21.3-q23 region) to green signals (centromeric probe of chromosome 17) indicates the presence of partial 17q gain.

10.3. NEUROBLASTOMA

Ankieta danych klinicznych

Część I

Dane wstępne:

data .....

Imię i nazwisko pacjenta .....

Data urodzenia pacjenta .....

Data rozpoczęcia leczenia .....

Rozpoznanie hist.-pat .....

Nr hist-pat .....

Lokalizacja ogniska pierwotnego .....

Wielkość ogniska pierw. .....

Lokalizacja przerzutów .....

.....

Stadium zaawansowania .....

Schemat leczenia .....

Czy wykonano: Zabieg operacyjny resekcji ogniska pierwotnego?
Tak Nie (podkreślić)
Data zabiegu: .....

Biopsję guza
Tak Nie
Data biopsji: .....

Wyjściowe parametry biochemiczne:

LDH w surowicy	.....	Normy: .....
VMA w moczu	.....	Normy: .....
Inne katecholaminy	.....	Normy: .....
OB.	.....	
Ferrytyna	.....	
NSE	.....	

Część II ankiety

Dane dotyczące przebiegu choroby

Początek leczenia - stosowany protokół .....

od..... do.....

Kolejne schematy leczenia

.....

.....

.....

Zabiegi operacyjne:

Data zabiegu ..... typ zabiegu .....

Radykalność.....

Data zabiegu ..... typ zabiegu .....

Radykalność.....

Data zabiegu ..... typ zabiegu .....

Radykalność.....

Radioterapia

Data

od.... ..... do..... dawka .....

pole naświetlań .....

Inne metody leczenia

Terapia mieloablacyjna z autoprzeszczepem Tak Nie

Data

od ..... do.....

Kwas retinoinowy Tak Nie

Data

od .....do.....

Inne stosowane metody terapii

.....

.....

Uzyskany dotychczasowy efekt leczenia (1.06.04)

Czy wystąpiła wznowa choroby? Tak Nie

Data wznowy .....

Leczenie wznowy-schemat .....

.....

Obecnie pacjent:	nie zakończył leczenia
	zakończył leczenie (CR1)
	wznowa – obecnie w trakcie leczenia
	zakończył leczenie wznowy(CR2)
kiedy zakończył leczenie	z uzyskaniem CR1 .....
	z uzyskaniem CR2 .....
Aktualny efekt leczenia (1.06.04)	
(podkreślić):	remisja całkowita
	remisja częściowa
	choroba stabilna
	progresja choroby
	zgon: data zgonu.....
	z powikłań
	z progresji choroby

11. ANEKS: PRACE OPUBLIKOWANE