POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 32 2005 NR 1 (59–76)

NERWIAK ZARODKOWY (NEUROBLASTOMA) – ZNACZENIE WYNIKÓW BADAŃ CYTOGENETYCZNYCH I MOLEKULARNYCH W USTALENIU STRATEGII LECZENIA I ROKOWANIA*

NEUROBLASTOMA – THE SIGNIFICANCE OF CYTOGENETIC AND MOLECULAR FACTORS IN THE ASSESSMENT OF THE STRATEGY OF TREATMENT AND PROGNOSIS

Beata Stefania LIPSKA**, Janusz LIMON

Katedra i Zakład Biologii i Genetyki, Akademia Medyczna w Gdańsku

Streszczenie: Praca przedstawia najnowsze poglądy z zakresu biologii nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma) szczególną uwagę poświęcając możliwościom wykorzystania czynników molekularnych i cytogenetycznych w ustalaniu strategii leczenia i rokowania pacjentów chorych na ten nowotwór. Ponadto zaprezentowany został genetyczny model onkogenezy tego nowotworu oraz jego zastosowanie w procesie stratyfikacji pacjentów do grup ryzyka nawrotu choroby.

Słowa kluczowe: nerwiak zarodkowy, czynniki rokownicze, aberracje chromosomowe, amplifikacja *MYCN,* apoptoza, geny oporności wielolekowej, telomeraza, receptory dla neurotrofin, geny supresorowe.

Summary: This review discusses recent advances in the understanding of the biology of neuroblastoma, particular attention is paid to the emerging molecular and cytogenetic factors used to determine the strategy of treatment and prognosis in patients with this tumour. In addition, the genetic model of neuroblastoma development and its application in the process of stratification of patients into risk groups is presented.

Key words: neuroblastoma, prognostic factors, chromosomal aberrations, *MYCN* amplification, apoptosis, multidrug resistance genes, telomerase, neurotrophin receptors, tumour suppressor genes.

*Praca finansowana w ramach projektu KBN nr 6 P05E 09121 oraz częściowo ze środków Fundacji Bankowej im. L. Kronenberga.**Słuchaczka Studium Medycyny Molekularnej przy Akademii Medycznej w Warszawie.

WSTĘP

Nerwiak zarodkowy (neuroblastoma) jest najczęstszym dziecięcym guzem litym zlokalizowanym poza ośrodkowym układem nerwowym, stanowiącym około 50% wszystkich nowotworów rozpoznawanych w wieku niemowlęcym. Nowotwór ten wyróżnia się nadzwyczaj szerokim spektrum przebiegu klinicznego, od samoistnej regresji zmian poprzez spontaniczne lub indukowane dojrzewanie w kierunku zwojakonerwiaka (ganglioneuroma), aż do dramatycznej progresji choroby pomimo zastosowanego agresywnego leczenia. Niemowlęta, nawet w przypadku zaawansowanej choroby, mają bardzo dobre rokowanie, natomiast u dzieci starszych mimo intensywnych i złożonych protokołów leczniczych wciąż z trudnością udaje się zatrzymać progresję choroby [1].

Najnowsze doniesienia z zakresu genetyki i biologii nerwiaka zarodkowego są pomocne w znajdowaniu nowych czynników prognostycznych, które, wprowadzone do codziennej praktyki klinicznej, ułatwiłyby stratyfikację pacjentów na grupy niskiego, średniego lub wysokiego ryzyka oraz zoptymalizowały dobór strategii leczenia. Przy ustalaniu rokowania, oprócz danych klinicznych i histopatologicznych, uwzględnia się obecnie profil genetyczny guza obejmujący stopień ploidii komórek guza, obecność amplifikacji onkogenu *MYCN* oraz występowanie charakterystycznych aberracji chromosomowych. Wydaje się, że w najbliższej przyszłości do panelu badań prognostycznych zostanie również włączona ocena parametrów molekularnych, np. ocena stopnia ekspresji genów kodujących białka z rodziny receptorów dla neurotrofin, pomiar aktywności telomerazy czy też ekspresji genów oporności wielolekowej *MDR1* i *MRP*.

Do najważniejszych klasycznych czynników rokowniczych zalicza się klasyfikację histologiczną *International Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC) z 1999 roku [47]. Klasyfikacja INPC określa budowę histologiczną guza jako korzystną lub niekorzystną w zależności od stopnia zróżnicowania komórek oraz obecności komórek podścieliska zgodnie z historyczną klasyfikacją Shimada (w 1984 Shimada jako pierwszy uznał liczebność komórek podścieliska (komórek Schwanna) za główny parametr odzwierciedlający stopień zróżnicowania guza). Dodatkowo INPC zaleca ocenę stopnia atypii jąder komórkowych (MKI: *mitosis-karyorrhexis index*), indeksu mitotycznego oraz obecności ognisk wapnienia będących histologicznymi czynnikami rokowniczymi. Ważnym uzupełnieniem histopatologicznej oceny agresywności nowotworu są badania określające profil genetyczny guza, a ich wspólna analiza może okazać się nadzwyczaj użytecznym narzędziem przy podejmowaniu decyzji o wyborze leczenia. W niniejszej pracy scharakteryzowane zostaną czynniki genetyczne i markery molekularne wykazujące już udokumentowane, jak i potencjalne znaczenie w ustalaniu rokowania pacjentów z rozpoznaniem nerwiaka zarodkowego. Ponadto przedstawiony zostanie genetyczny model tego nowotworu, który poprzez ukazanie wzajemnych powiązań pomiędzy różnymi elementami profilu genetycznego podejmuje próbę wyjaśnienia procesu onkogenezy tego nowotworu.

W odróżnieniu od nowotworów pochodzenia nabłonkowego, zwłaszcza gruczolakoraków jelita grubego, dla których zaproponowano szczegółowy, wieloetapowy model onkogenezy [11], w przypadku nerwiaka zarodkowego pomimo szczegółowej charakte-

rystyki genetycznej, uwzględnianej w procesie terapeutycznym i rokowniczym, patogeneza procesu nowotworowego pozostaje nadal niejasna. Obserwowane zmiany w profilu genetycznym są różnorodne i do dziś nie udało się wytypować tej jednej, kluczowej dla inicjacji procesu nowotworowego.

Predyspozycja genetyczna

U dzieci chorych na nerwiaka zarodkowego nie stwierdza się charakterystycznych cech dysmorficznych ani częstszego występowania wad wrodzonych [60]. Niewielki odsetek (1–2%) rodzin pacjentów wykazuje autosomalny dominujący charakter predyspozycji genetycznej zachorowania na ten nowotwór o wysokiej penetracji (MIM 256700) [60]. W rodzinach tych średnia wieku w momencie rozpoznania jest znacząco niższa w porównaniu z przypadkami występującymi sporadycznie: 14 miesiąc życia wobec 23 miesięcy. Ponadto pierwotnie wieloogniskową lokalizację choroby spotyka się w 25% przypadków dziedzicznego nerwiaka zarodkowego. Pacjentów z rodzinnie występującym nowotworem charakteryzuje ta sama różnorodność przebiegu klinicznego co pacjentów ze sporadycznym guzem: obserwuje się zarówno przypadki spontanicznej regresji, jak i wysokiej agresywności nowotworu w obrębie członków tej samej rodziny [36].

W historycznej pracy z 1972 roku Knudson i Strong oszacowali, iż do 22% przypadków nerwiaka zarodkowego może być wynikiem mutacji generatywnej nieznanego genu supresorowego [30]. Pomimo iż od ogłoszenia wyników analizy statystycznej potwierdzających zgodność mechanizmu onkogenezy nerwiaka zarodkowego z hipotezą dwuuderzeniowej mutacji Knudsona upłynęło już ponad 30 lat, dotychczas nie udało się zidentyfikować żadnego genu supresorowego, którego mutacja odpowiadałby za inicjację transformacji nowotworowej. Na podstawie analizy sprzężeń w obrębie rodzin z dziedziczną postacią nerwiaka zarodkowego wykluczono lokalizację tego genu w regionie chromosomu 1p36, który ulega częstym rearanżacjom w guzach (35% przypadków sporadycznych) [33]. Najnowsze doniesienia wskazują na region chromosomu 16p12-13 jako potencjalny locus tego genu [36].

CYTOGENETYKA

Znacząca większość przypadków nerwiaka zarodkowego występuje sporadycznie. W ich patogenezie kluczową rolę odgrywają somatyczne zmiany genetyczne na poziomie genów, jak i chromosomów, będąc obszarem zainteresowania zarówno cytogenetyki, jak i biologii molekularnej.

Ploidia DNA

Zawartość DNA w komórkach nowotworowych jest w praktyce klinicznej jednym z najszerzej stosowanych wskaźników cytogenetycznych dla określenia prawdopodobieństwa przeżycia pacjentów z rozpoznaniem nerwiaka zarodkowego. Klasyczna analiza cytogenetyczna aberracji chromosomowych udaje się tylko w 20–30% pierwot-

nych guzów [32], dlatego też do oceny zawartości DNA w komórkach najczęściej wykorzystuje się półautomatyczną metodę cytometrii przepływowej, która jednak nie pozwala ocenić ewentualnych zmian w strukturze chromosomów.

W przypadku niemowląt stwierdzenie triploidalnej (~3n) liczby chromosomów oznacza istotnie lepsze rokowanie w porównaniu z pacjentami tej samej grupy wiekowej z diploidalną (~2n) lub tetraploidalną (~4n) ich liczbą [31]. Niestety, w przypadku starszych dzieci, ploidia DNA traci moc prognostyczną. Prawdopodobnie związane jest to z powstawaniem dodatkowych zmian genetycznych w komórce polegających na występowaniu aberracji strukturalnych, przede wszystkim dotyczących chromosomu 1p oraz obecności często licznych acentrycznych, podwójnych, malutkich chromosomów – *double minutes (dmin)* [27].

Aberracje chromosomowe

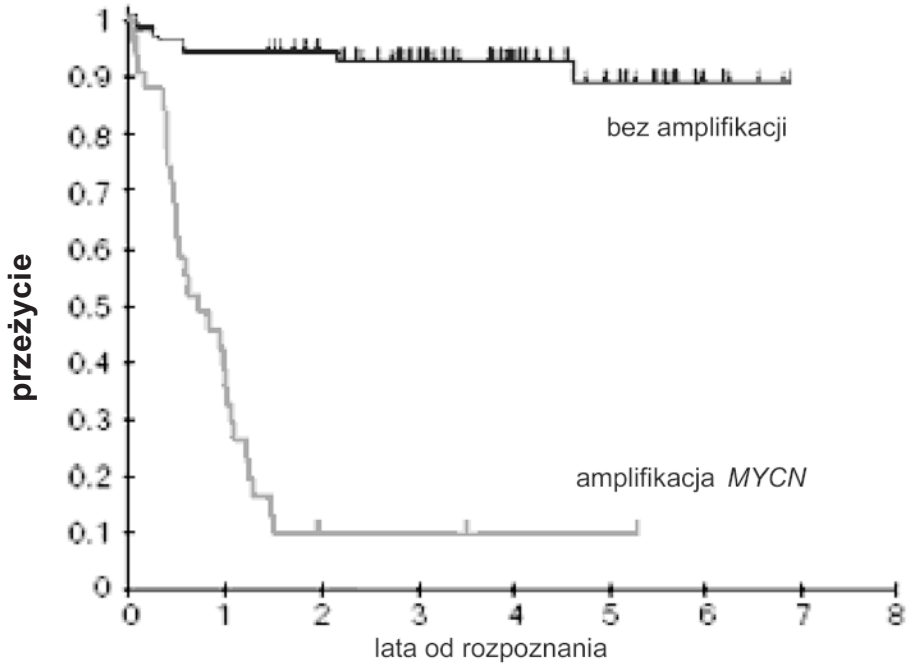
W przeciwieństwie do innych nowotworów wieku dziecięcego, trudno jest wskazać charakterystyczną aberrację chromosomową czy mutację genową, która mogłaby być czynnikiem wywołującym kaskadę zdarzeń na poziomie molekularnym prowadzących do niepohamowanego rozrostu komórek nowotworowych. Poszukiwanie analogii do innych guzów litych, jak np. mięsak Ewinga, gdzie opisywane aberracje strukturalne swoiście dotyczą translokacji chromosomu 11 i chromosomu 22 t(11;22)(q24;q12) formując gen fuzyjny *EWS/FLI*, nie przyniosło konstruktywnych wyników. Najczęściej spotykane w komórkach nerwiaka zarodkowego aberracje chromosomowe to dodatkowa kopia chromosomu 17q [4,5] oraz delecje chromosomów 1p[37] i 11q[17]. Zmiany te pojawiają się na różnych etapach onkogenezy i żadna z nich nie może być uważana za zmianę o charakterze pierwotnym, inicjującym proces nowotworowy.

Amplifikacja onkogenu *MYCN*

Charakterystyka cytogenetyczna niektórych guzów wykazała obecność acentrycznych chromosomów *(dmin)* – które mogą wbudować się do innych chromosomów tworząc regiony o zatartej strukturze prążkowej *HSRs (homogeneously staining regions)*. *Dmin* i *HSRs* są cytogenetycznymi wykładnikami amplifikacji genu, którego sekwencję zidentyfikowano jako należącą do rodziny onkogenów *MYC* [50].

Prawidłową lokalizacją protoonkogenu *MYCN* jest chromosom 2p24, jednak w przypadku komórek wykazujących jego amplifikację, sekwencje *MYCN* hybrydyzują również do *dmin* i *HSRs*. W poszczególnych przypadkach procesowi amplifikacji podlega duży fragment krótkiego ramienia chromosomu drugiego, niezmiennie jednak obejmujący locus *MYCN,* a także, w pewnej liczbie przypadków, inne geny, w tym oddalony o 400kb od *MYCN* gen *DEAD* box (*DDX1*) [45]. Produkt białkowy genu *DDX1*, koamplifikowanego z *MYCN* w 50–70% przypadków, ma wpływ na strukturę drugorzędową RNA warunkując stabilność mRNA, czym uzupełnia i wzmacnia efekt regulacji ekspresji genów przez czynnik transkrypcyjny, jakim jest *MYCN*.

Amplifikacja *MYCN* występuje w ~25% przypadków nerwiaka zarodkowego, a jej obecność silnie koreluje z zaawansowanym stopniem choroby, szybką progresją guza, opornością na chemioterapię oraz złym rokowaniem niezależnie od stopnia zaawan-



RYCINA 1. Czas przeżycia niemowląt < 1r.ż. z rozsianą postacią nerwiaka zarodkowego na podstawie statusu *MYCN*, za [47]

sowania klinicznego i wieku pacjenta [6]. Wpływ statusu *MYCN* na przeżycie pacjentów najwyraźniej obrazują wyniki uzyskane w grupie dzieci <1 r.ż. z IV stopniem zaawansowania klinicznego choroby (ryc. 1) [48]. Dla niemowląt bez stwierdzonej amplifikacji *MYCN* w guzie 3-letnie przeżycie (*event-free survival*) wynosiło 93% w porównaniu z zaledwie 10% w grupie z amplifikacją tego onkogenu.

Wciąż niewiele wiadomo o mechanizmie, w którym amplifikacja onkogenu *MYCN* prowadzi do powstania agresywnego fenotypu. Istnieje silna korelacja pomiędzy liczbą kopii tego genu w komórce a poziomem ekspresji jego produktu, tj. białka MYCN. Otóż w guzach z amplifikacją stwierdza się znacząco większe ilości białka, a pod względem klinicznym guzy te mają bardzo złośliwy przebieg. Nierozstrzygnięte pozostaje jednak znaczenie określania poziomu ekspresji białka MYCN jako niezależnego czynnika rokowniczego, zwłaszcza w grupie guzów bez amplifikacji, gdyż dotychczas uzyskane wyniki są sprzeczne [6]. Białko MYCN jest czynnikiem transkrypcyjnym kontrolującym przejście komórek w fazę G1 cyklu komórkowego. Razem z białkiem MAX tworzy heterodimer pełniący funkcję aktywatora transkrypcji. Jeżeli jednak ekspresja białka MYCN jest niska, białko MAX tworzy homodimer, który pełni rolę antagonistyczną – inhibitora transkrypcji, uniemożliwiając komórkom rozpoczęcie cyklu podziału komórkowego [49]. Dotychczas poznano zaledwie kilka genów regulowanych bezpośrednio przez układ białek MYCN/MAX: geny *MCM7* odpowiedzialny za

utrzymanie euplodii DNA podczas podziału komórkowego [51] oraz *MRP* kodujący oporność wielolekową (opis poniżej) [18].

Status amplifikacji onkogenu *MYCN* uwzględniany jest w protokołach leczniczych na całym świecie, będąc jednym z czynników kwalifikujących pacjentów do grupy wymagającej najbardziej agresywnego postępowania terapeutycznego.

Dodatkowa kopia chromosomu 17q

Metoda porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH) wykorzystana dla analizy cytogenetycznej pierwotnych guzów wykazała, iż nieprawidłowości chromosomu 17 są najczęstszą zmianą chromosomową w nerwiaku zarodkowym. Dodatkową kopię długiego ramienia chromosomu 17 stwierdza się w 2/3 przypadków, a jej obecność silnie koreluje z zaawansowanym stadium choroby, wiekiem pacjentów powyżej 1 r.ż., a także współwystępowaniem amplifikacji *MYCN* oraz delecji ramion p chromosomu 1 [5]. Najczęściej zjawisko to pojawia się w przypadku translokacji ramion 17q na ramiona p chromosomu 1 i ma charakter translokacji niezrównoważonej, co wyjaśnia częste ich współwystępowanie [4].

W obrębie chromosomu 17q zlokalizowano gen kodujący białko – surwiwinę, będące silnym inhibitorem procesu apoptozy. Nadmierna ekspresja tego białka wywołana istnieniem nadliczbowych kopii genu prowadzi do zahamowania wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy zależnego od kaspazy 9, której swoistym inhibitorem jest właśnie surwiwina [42]. Obserwacja kliniczna przypadków potwierdziła, iż pacjenci, których guzy wykazują wysoką ekspresję tego białka, mają znacznie gorsze rokowanie [26]. Obecność dodatkowej kopii chromosomu 17q w komórce jest silnym niezależnym czynnikiem prognostycznym, jej wykrycie w komórkach guza umożliwia zaszeregowanie pacjentów do grupy o niepomyślnym rokowaniu [5].

Delecja i utrata heterozygotyczności (LOH) chromosomu 1p

W porównaniu z konstytucyjnym genotypem, w tkance guza dość często stwierdza się utratę heterozygotyczności (LOH) niektórych markerów mikrosatelitarnych w obrębie ramion p chromosomu 1 [35]. Występuje ona w ok. 35% przypadków nerwiaka zarodkowego [4, 6] i dotychczas nie udało się wykryć genu w tym rejonie, który mógłby pełnić funkcję genu supresorowego (TSG), a którego utrata prowadziłaby do transformacji nowotworowej. Jak już wspomniano powyżej, w nerwiaku zarodkowym często dochodzi do niezrównoważonej translokacji ramion 17q na ramiona p chromosomu 1 prowadzącej do delecji dystalnego fragmentu tych ramion. Na podstawie analizy porównawczej udało się zawęzić kluczowy region tej delecji do fragmentu 1p35-36, w obrębie którego postuluje się istnienie dwóch niezależnych loci dla genów TSG, w tym jednego podlegającego zjawisku piętna genomowego (*genomic imprinting)* [8].

Istnieje silna korelacja współwystępowania amplifikacji *MYCN* i LOH ramion p chromosomu 1. Grupa pacjentów, u których w guzach stwierdza się równoczesne występowanie obu tych markerów, charakteryzuje się najbardziej złośliwym przebiegiem choroby. Znaczenie LOH 1p jako niezależnego czynnika rokowniczego jest wciąż kontrowersyjne. Jej występowanie pozwala na podział pacjentów pod względem

agresywności przebiegu choroby i ryzyka progresji, nie ma jednak wpływu na ostateczne prawdopodobieństwo przeżycia [35]. Natomiast współwystępowanie z amplifikacją *MYCN* lub dodatkową kopią chromosomu 17q jest silnie związane z niepomyślnym rokowaniem [4].

Analiza pierwotnych guzów przy pomocy porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH) wykazała istnienie w obrębie genomu jeszcze kilku innych miejsc, w których dochodzi do delecji, jednak ich rola w patomechanizmie transformacji nowotworowej nerwiaka zarodkowego ani ewentualne znaczenie prognostyczne nie zostały dotychczas ustalone [4].

MARKERY MOLEKULARNE

W ostatnich latach możliwości analizy profilu genetycznego znacznie wzbogaciły się dzięki zastosowaniu metod opartych o najnowsze osiągnięcia z dziedziny biologii molekularnej. Obecnie, na poziomie molekularnym, diagnostyka nerwiaka zarodkowego obejmuje zarówno analizę materiału genetycznego: poszukiwanie mutacji i polimorfizmów w obrębie genów, ocenę utraty heterozygotyczności (LOH) jak również analizę zjawisk epigenetycznych. Upowszechnienie badań molekularnych znacznie poszerzyło panel informacji o biologii nerwiaka zarodkowego oraz dostarczyło nowych czynników rokowniczych o silnym znaczeniu prognostycznym. Poniżej scharakteryzowane zostaną dotychczas poznane markery molekularne, przedstawione ich mechanizmy działania oraz nakreślone kierunki dalszych badań nad profilem genetycznym tego nowotworu.

LOH chromosomów 11q i 14q

Oprócz przedstawionej powyżej utraty materiału genetycznego z chromosomu 1p LOH zaobserwowano także w innych regionach genomu komórek nerwiaka zarodkowego, w szczególności w chromosomach 11q (43% guzów) [17] i 14q (23%) [56]. Interesujący jest fakt, że w większości wypadków stwierdzenie powyższych anomalii genetycznych wykluczało obecność amplifikacji *MYCN* i LOH chromosomu 1p. Rokowanie pacjentów z LOH chromosomu 11q było niepomyślne, pomimo iż komórki guza miały prawidłową liczbę kopii *MYCN* – jest to bardzo istotne spostrzeżenie, jako że jest to najczęściej spotykane miejsce utraty heterozygotyczności w nerwiaku zarodkowym. Natomiast dla LOH 14q, która najczęściej współwystępuje w guzach z LOH 11q, do tej pory nie wykazano żadnej korelacji z przebiegiem klinicznym i długoletnim przeżyciem.

Geny supresorowe : *TP53, TP73, NF1*

Geny supresorowe (TSG) poprzez sprawowanie kontroli nad proliferacją komórek zapobiegają procesom nowotworzenia. W trakcie onkogenezy, w większości nowotworów człowieka dochodzi do zaburzeń ich funkcjonowania i w następstwie do utraty kontroli nad cyklem komórkowym. Może się to dokonać w wyniku wielorakich procesów: mutacji somatycznej, utraty heterozygotyczności fragmentu chromosomu, a także

poprzez mechanizmy epigenetyczne, np. metylację regionów promotorowych czy acetylację histonów [10]. W trakcie badań nad profilem genetycznym nerwiaka zarodkowego został przeanalizowany stopień ekspresji większości znanych TSG, jednak dotychczasowe wyniki nie przyniosły jednoznacznych rozstrzygnięć co do roli, jaką odgrywać mogą one w onkogenezie tego nowotworu. Poniżej przedstawione zostaną wyniki badań, które podejmują próbę choć częściowego wyjaśnienia ich udziału w procesie nowotworzenia nerwiaka zarodkowego.

Gen ***TP53*** kodujący białko p53, który pełni kluczową rolę w procesie stabilizacji materiału genetycznego komórki, jest jednym z genów supresorowych najczęściej podlegających mutacjom w większości nowotworów człowieka. Intrygujące jest więc spostrzeżenie, iż mutacje tego genu są rzadkością w nerwiaku zarodkowym [25, 58]. Wykazano jednak, iż w wypadku guzów o znaczącym stopniu niezróżnicowania dochodzi do zaburzenia prawidłowego funkcjonowania białka p53 poprzez zaburzenie jego transportu do jądra komórkowego [57]. Niewyjaśnione dotychczas mechanizmy epigenetyczne uniemożliwiają transport białka do jądra komórkowego paraliżując pełnienie przez nie funkcji ochronnej genomu. Obserwacja ta wiązana jest z utartą zdolności neuroblastów do różnicowania w kierunku zmian o łagodnym charakterze.

W regionie chromosomu 1p36.33, najczęściej występującej w nerwiaku zarodkowym delecji, znajduje się **gen *TP73*** wykazujący duże podobieństwo do *TP53* zarówno pod względem organizacji genu, jak i sekwencji [52]. Gen *TP73* nie spełnia jednak klasycznych kryteriów Knudsona dla genu supresorowego [46] – wyjątkowo rzadko dochodzi do mutacji w jego obrębie, ponadto model zwierzęcy nie cechuje się częstym występowaniem nowotworów. U myszy pozbawionej ekspresji białka p73 w trakcie rozwoju embrionalnego dochodzi do różnorakich zaburzeń ontogenezy, nie wykazuje ona jednak zwiększonej skłonności do chorób nowotworowych [59]. Białko p73 pełni natomiast kluczową rolę w różnicowaniu tkanki nerwowej [38]. W przeciwieństwie do swego homologu *TP53*, gen *TP73* dzięki dwóm alternatywnym promotorom oraz niejednolitemu składaniu potranskrypcyjnemu (*differential splicing*) koduje wiele izoform białka p73. Niedawno stwierdzono występowanie w tkance nerwiaka zarodkowego izoform białka p73 pozbawionych fragmentu N-końcowego (**ΔNp73**), wykazujących właściwości proonkogenne. W odróżnieniu od wariantów białka p73 prawidłowej długości, które, tak jak p53, są silnymi induktorami apoptozy, ΔNp73 silnie hamuje proapoptyczne działanie zarówno p53, jak i p73 [46]. Stwierdzenie ekspresji ΔNp73 w nerwiaku zarodkowym jest niezależnym negatywnym czynnikiem rokowniczym [9]. Uniemożliwienie przez nie prawidłowego funkcjonowania białka p53 oraz zahamowanie procesu różnicowania neuronalnego poprzez szlak zależny od p73 jest jednym z mechanizmów epigenetycznych odgrywających rolę w onkogenezie nerwiaka zarodkowego.

Jedynym genem supresorowym, w obrębie którego udało się stwierdzić występowanie mutacji w dwóch liniach komórkowych nerwiaka zarodkowego, jest ***NF1***. Niestety obserwacje te nie zostały potwierdzone na materiale guzów pierwotnych [55]. Ponadto nie udało się wykazać zwiększonej częstości występowania nerwiaka zarodkowego u pacjentów chorych na nerwiakowłokniakowatość typu 1 (NF-1), u których występuje germinalna mutacja tego genu.

Na koniec należy wspomnieć, iż również żaden ze znanych genów supresorowych z rodziny inhibitorów CDK: ***CDKN2A-C*** kodujących zależne od cyklin inhibitory kinaz (p16, p21, p18), wyjątkowo często podlegających mutacjom w innych nowotworach, nie odgrywa znaczącej roli w procesie onkogenezy nerwiaka zarodkowego [42], potwierdzając unikatowość tego nowotworu.

Telomeraza

Telomeraza jest białkiem z rodziny odwrotnych transkryptaz odpowiedzialnym za długość telomerów – struktur znajdujących się na końcach chromosomów i zapewniających ich integralność strukturalną. Wzmożona aktywność telomerazy jest cechą wspólną dla wielu nowotworów, będąc *per se* w większości wypadków jedynie niespecyficzną zmianą wtórną ułatwiającą rozrost tkanki nowotworowej niż kluczowym etapem onkogenezy. Tylko skrajne (wysoki lub nieoznaczalny) poziomy ekspresji białka mogą mieć bezpośrednie znaczenie rokownicze, co niestety dotyczy jedynie niewielkiej subpopulacji nerwiaków zarodkowych. Hiyama [22] stwierdził brak aktywności telomerazy oraz równoczasowe skracanie się telomerów w guzach o stopniu zaawansowania 4-S wg INSS (*International Neuroblastoma Staging System*), które uległy spontanicznej regresji. Z drugiej strony, guzy ze stwierdzoną amplifikacją *MYCN* wykazywały nadzwyczaj wysoką ekspresję białka, a ich przebieg kliniczny był niepomyślny. Obserwacje te zostały potwierdzone w kolejnych badaniach [21, 44], co pozwala uznać brak ekspresji telomerazy w tkance guza za wskaźnik dobry prognostycznie, natomiast wybitnie wysoką aktywność oraz jej współwystępowanie z amplifikacją *MYCN* za bardzo niekorzystny czynnik rokowniczy [23].

Markery procesu apoptozy

Indukcja apoptozy jest podstawowym mechanizmem wykorzystywanym podczas tworzenia się sieci neuronalnej w trakcie embriogenezy. Zaburzenie procesu eliminacji komórek, które nie wykształciły wystarczającej liczby połączeń interneuronalnych, może prowadzić ostatecznie do odwrócenia tego procesu i inicjacji nowotworzenia.

Do aktywacji procesu programowanej śmierci komórki dochodzi pod wpływem różnorodnych bodźców, np. obecności lub braku zewnątrzkomórkowego ligandu dla receptorów z rodziny TNFR (CD95, p75), uszkodzenia DNA lub wzrostu przepuszczalności błon mitochondrialnych – w tym przypadku za przesyłanie sygnału apoptycznego odpowiedzialna jest rodzina mitochondrialnych białek błonowych Bcl. W nerwiaku zarodkowym bardzo często stwierdza się wysoką ekspresję antyapoptycznego **białka Bcl-2,** a jej poziom jest odwrotnie proporcjonalny do procentu komórek podlegających apoptozie oraz do stopnia ich zróżnicowania [15].

Niezależnie od czynnika inicjującego, ostatecznie w komórce ulegają aktywacji białka efektorowe: kaspazy, które uruchamiają sekwencję zdarzeń prowadzących do apoptozy i śmierci komórki [41]. W przypadku nerwiaka zarodkowego stwierdzenie wysokiej ekspresji białek z rodziny kaspaz w tkance guza jest, zgodnie z oczekiwaniem, związane z dobrym rokowaniem. Zjawisko apoptozy jest również kluczowym procesem odpowiedzi tkanki guza na chemioterapię. Cisplatyna, doksorubicyna oraz etopozyd indukują szlak

CD95/CD95L-kaspaza8 [16]. Jednak w grupie guzów z amplifikacją *MYCN* gen kodujący **kaspazę-8** jest hamowany poprzez metylację jego promotora [54], uniemożliwiając ekspresję tego białka, co przejawia się opornością tych guzów na stosowane obecnie leczenie. Natomiast komórki wrażliwe na chemioterapię wykazują wysoką ekspresję białek z rodziny kaspaz [15]. Następuje to poprzez indukcję białka transbłonowego **p75**, będącego receptorem o niskim powinowactwie do NGF (*nerve growth factor*). Ekspresja wspomnianego już antyapoptycznego białka bcl2 jest natomiast wiązana z procesami nabytej odporności na chemioterapię [12].

Na podstawie powyższych obserwacji można uznać iż nerwiak zarodkowy, którego profil genetyczny sugeruje podatność na procesy apoptozy, ze względu na wysoką ekspresję wspomnianych genów, o wiele częściej podlega zjawisku spontanicznej regresji oraz dobrze odpowiada na stosowane leczenie cytotoksyczne. Należy jednak również wspomnieć, iż analiza procesu spontanicznej regresji w przebiegu nerwiaka zarodkowego przyniosła pierwsze dowody potwierdzające przypuszczenia iż, obok apoptozy, istnieją inne procesy zaprogramowanej śmierci komórek, niezależne od kaspaz [29].

Dziś można stwierdzić, iż w patomechanizmie zjawiska spontanicznej regresji w przebiegu nerwiaka zarodkowego odgrywa rolę kilka niezależnych szlaków prowadzących do śmierci komórki. W komórkach guza podlegających regresji tylko w części przypadków stwierdzono obecność wykładników procesu apoptozy [28]. W preparatach nerwiaka zarodkowego analizowanych z wykorzystaniem technik mikroskopii elektronowej nie zawsze stwierdzano występowanie ciał apoptycznych, zamiast których często obserwowano nagromadzenie zmian o charakterze degeneracyjnym, charakterystycznych dla procesu degeneracji autofagalnej [29].

Geny oporności wielolekowej

Pojawienie się oporności na wiele chemioterapeutyków należących do niezależnych grup cytostatyków jest zjawiskiem obserwowanym w przebiegu klinicznym nerwiaka zarodkowego, za które odpowiedzialna jest przede wszystkim nadmierna ekspresja białek z rodziny transporterów kasetowych wiążących ATP (ATP-*binding casette transporters*). Głównymi przedstawicielami tej rodziny są: **glikoproteina P** – kodowana przez **gen *MDR1*** (*multi-drug resistance gene 1*) oraz **białko MRP** (*multi-drug resistance-related protein*) kodowane przez gen o tej samej nazwie. Sterowany przez nie proces usuwania cytostatyków z komórki dokonuje się z wykorzystaniem aktywnego, zależnego od ATP, transportu przezbłonowego [20]. Najnowsze doniesienia sugerują, iż onkogen *MYCN* wpływa na stopień odpowiedzi guza na stosowaną chemioterapię poprzez regulację ekspresji genu *MRP* [18] – obserwacja ta stanowi ogniwo łączące fenotyp guza o wysokiej złośliwości z fenotypem lekoopornym. Już wcześniej stwierdzono, iż wysoki stopień ekspresji genu *MRP* w nerwiaku zarodkowym jest niezależnym negatywnym czynnikiem rokowniczym [43]. Również ekspresja genu *MDR1*, który w odróżnieniu od *MRP* nie wykazuje współzależności z występowaniem amplifikacji *MYCN*, w niektórych grupach pacjentów: populacji dzieci starszych (>1 r.ż.) oraz w grupie guzów bez amplifikacji *MYCN* jest markerem złej prognozy [19].

Od ponad dekady znane są substancje farmakologiczne zdolne do odwrócenia efektu lekooporności zależnego od P-glikoproteiny (verapamil, cyklosporyna), jednak ich stosowanie nasila toksyczność winkrystyny i doksorubicyny [20]. Konieczne wydaje się więc poszukiwanie bardziej bezpiecznych leków oraz ich indywidualne stosowanie w przypadkach nerwiaka zarodkowego o stwierdzonej wysokiej ekspresji genów oporności wielolekowej.

Większość badań nad mechanizmem powstawania wielolekooporności i możliwości jej odwrócenia w przebiegu nerwiaka zarodkowego przeprowadzono na liniach komórkowych w warunkach *in vitro*, dlatego też znaczenie kliniczne tych obserwacji pozostaje wciąż do ostatecznego wyjaśnienia.

Rodzina receptorów dla neurotrofin oraz RAS

Kształtowanie się sieci neuronalnej będące wyrazem dojrzewania tkanki nerwowej jest procesem kontrolowanym zarówno czasowo, jak i przestrzennie przez układ neurotrofin i ich receptorów – transbłonowych białek z rodziny Trk wykazujących aktywność kinazy tyrozynowej. Najważniejsi przedstawiciele tej rodziny to: **TrkA** będący selektywnym receptorem dla NGF (*nerve growth factor*) oraz NT-3 (*neurotrophin 3*); **TrkB** wiążący BDNF (*brain derived nerve factor*), jak i NT-4 (*neurotrophin 4*) oraz białko **p75**, które wykazuje niskie powinowactwo do wszystkich neurotrofin. Ekspresja TrkA jest niezależnym, pozytywnym czynnikiem rokowniczym [53]. Przeciwnie, obecność białka TrkB stwierdzana jest w guzach o agresywnym przebiegu klinicznym i często współwystępuje z amplifikacją *MYCN* [40].

Podlegający ścisłej kontroli poziom NGF jest głównym czynnikiem regulującym proces kształtowania się obwodowej sieci neuronalnej układu współczulnego. Pod koniec okresu embrionalnego stwierdza się wysoką ekspresję TrkA i p75 w komórkach dojrzewającego układu sympatycznego. NGF, będący ich swoistym ligandem, promuje proces różnicowania się neuroblastów. W okresie okołoporodowym następuje gwałtowny spadek stężenia NGF, co powoduje masową śmierć komórek, które do tego czasu nie wykształciły wystarczającej liczby połączeń zarówno aksonalnych, jak i dendrytycznych [39]. Zgodnie z teorią tropową zburzenie kruchej równowagi pomiędzy stężeniem neurotrofin a ilością receptorów prezentowanych na błonie komórkowej neuronów prowadzi do niepohamowanego rozrostu komórek będąc zaczątkiem procesu nowotworowego. Jednak dalsze etapy różnicowania się tkanki nerwowej obserwowane w okresie poporodowym mogą prowadzić do przywrócenia równowagi i stanowić podstawę obserwowanej klinicznie spontanicznej regresji zmian.

Przyłączenie się NGF do homodimeru TrkA powoduje autofosforylację receptora oraz aktywację kaskady białek przekazujących sygnał do jądra komórki i regulujących transkrypcję specyficznych genów. Eggert wykazała, iż najważniejszym szlakiem indukowanym przez NGF w komórkach nerwiaka zarodkowego jest układ **Ras/MAPK** [14]. Szlak ten jest odpowiedzialny nie tylko za indukcję procesów różnicowania w kierunku dojrzałych komórek nerwowych, ale również za indukcję wspomnianej powyżej zaprogramowanej śmierci komórki o mechanizmie niezależnym od kaspaz, klinicznie prowadzącej do regresji zmian

[28]. Dlatego też wysoka ekspresja białka Ras jest bardzo dobrym czynnikiem rokowniczym, a zwłaszcza jej współwystępowanie z TrkA [53].

Autokrynny układ TrkB/BDNF, którego aktywację obserwuje się w nerwiaku zarodkowym o bardzo agresywnym przebiegu klinicznym, jest czynnikiem odpowiedzialnym za oporność tych guzów na stosowaną chemioterapię [24] oraz odgrywa rolę w promocji angiogenezy [13]. Równocześnie, na zasadzie sprzężenia zwrotnego, jest sam dla siebie czynnikiem wzrostu napędzającym rozrost tkanki guza.

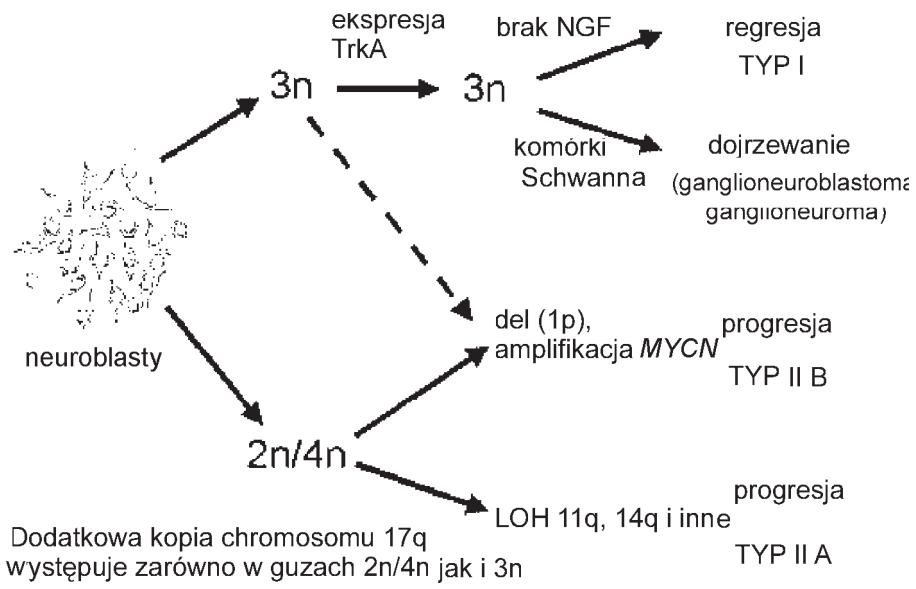
Rodzina receptorów dla neurotrofin sprawuje nadzór nad procesem różnicowania się neuroblastów w kierunku dojrzałych komórek zwojowych oraz decyduje o indukcji zjawiska spontanicznej regresji. W procesach tych kluczową rolę odgrywa stężenie swoistych ligandów, zwłaszcza NGF i BDNF w mikrośrodowisku utkania guza. W Japonii wprowadzono oznaczenie ekspresji białek z rodziny Trk w komórkach nerwiaka zarodkowego do praktyki klinicznej.

GENETYCZNY MODEL ROZWOJU NERWIAKA ZARODKOWEGO

Genetyczna heterogeniczność nerwiaka zarodkowego obserwowana zarówno na poziomie genu, chromosomu, jak i całej komórki świadczy, iż zamiast jednolitej choroby mamy do czynienia ze zbiorem podtypów nowotworu, różniących się przebiegiem klinicznym: agresywnością wzrostu, opornością na stosowane leczenie czy też zdolnością do regresji. Dotychczas nie udało się jednoznacznie ustalić, czy kolejność, w jakiej akumulują się obserwowane nieprawidłowości profilu genetycznego, ma znaczenie rokownicze. Ponadto, jak dotąd nie znaleziono wystarczająco silnych dowodów, które potwierdzałyby zdolność guzów do konwersji w postaci o bardziej agresywnym przebiegu [6,7].

W roku 2000 opublikowano model onkogenezy nerwiaka zarodkowego oparty na analizie profilu genetycznego tkanki guza [7]. Nie wykluczając istnienia potencjalnej jednej wspólnej mutacji, która inicjowałaby proces nowotworzenia i odpowiadała za nieliczne przypadki rodzinnie występującego nerwiaka zarodkowego, zaproponowano podział guzów na dwa typy, który dokonywałby się na wczesnym etapie rozwoju nowotworu (ryc. 2).

Typ pierwszy, o łagodnym przebiegu klinicznym, w toku którego często może dochodzić do spontanicznej regresji zmian i/lub dojrzewania, charakteryzuje się zaburzeniem procesu mitozy. Prowadzi to do powstania komórek o kariotypie okołotriploidalnym (~3n), przy czym dodatkowe kopie chromosomów mają zachowaną prawidłową strukturę. W tkance guza obserwuje się wysoką ekspresję receptora błonowego TrkA. Brak jego swoistego ligandu NGF prowadzi do uruchomienia mechanizmów odpowiedzialnych za spontaniczną regresję (w tym procesu apoptozy), natomiast obecność komórek Schwanna w podścielisku utkania guza stymuluje proces różnicowania się neuroblastów w kierunku dojrzałego zwojakonerwiaka [2]. Klinicznie, typ ten występuje najczęściej u niemowląt do 1 roku życia, w przypadkach o niskim



RYCINA 2. Genetyczny model onkogenezy nerwiaka zarodkowego. Reprodukcja za zgodą autorów [3]: NGF – nerwowy czynnik wzrostu, LOH – utrata heterozygotyczności, 2n,3n,4n – stopień ploidii, TrkA – receptor dla neurotrofin, ganglioneuroblastoma – nerwiak zwojowokomórkowy zarodkowy, ganglioneuroma – zwojakonerwiak

stopniu zaawansowania (1,2 wg klasyfikacji INSS) oraz w 4-S. Wskaźnik 3-letniej przeżywalności sięga 90%.

W odróżnieniu od niego, **typ drugi** o bardzo agresywnym przebiegu klinicznym charakteryzuje się występowaniem licznych aberracji strukturalnych chromosomów. Kariotyp komórek guza jest okołodiploidalny (~2n) lub tetraploidalny (~4n). Klinicznie typ ten dotyczy dzieci starszych, powyżej pierwszego roku życia, o znacznie zaawansowanym procesie chorobowym (stopień 3,4 wg INSS). W przebiegu klinicznym nie dochodzi do samoistnej regresji zmian ani do różnicowania się tkanki guza. W tkance guza ekspresja białka TrkA jest śladowa, natomiast stwierdzana jest obecność autokrynnego układu TrkB-BDNF stymulującego niepohamowany rozrost guza. Ponadto w ramach typu drugiego wyróżnia się dwa podtypy. W **podtypie II A,** o mniej agresywnym przebiegu, charakteryzującym się 3-letnim przeżyciem rzędu 30–50%, często stwierdza się utratę heterozygotyczności (LOH) długich ramion chromosomów 11 i 14. Podtyp o najbardziej agresywnym (**II B**) przebiegu często wykazuje natomiast LOH chromosomu 1p oraz amplifikację genu *MYCN* przy wskaźniku 3-letniego przeżycia poniżej 25%.

WNIOSKI KOŃCOWE

Przedstawiony powyżej model zmian genetycznych leżących u podstaw transformacji nowotworowej ilustruje złożony charakter procesów przebiegających zarówno na poziomie genów, jak i chromosomów, które poprzez zaburzenie dojrzewania obwodowej tkanki nerwowej ostatecznie prowadzą do rozrostu nerwiaka zarodkowego.

Znajomość profilu genetycznego guza może być wykorzystana na każdym etapie postępowania diagnostycznego i terapeutycznego, zwłaszcza przy ustalaniu strategii leczenia. Już dzisiaj w praktyce klinicznej dzięki ocenie ploidii komórek guza, jak i poszukiwaniu ewentualnej amplifikacji *MYCN* udaje się dokładniej przewidzieć przebieg choroby, a więc zaszeregować pacjenta do odpowiedniej grupy ryzyka i dostosować intensywność leczenia, pokonując w ten sposób niedoskonałość klasycznych czynników prognostycznych, takich jak wiek pacjenta i stopień zaawansowania choroby. W

TABELA 1. Grupy ryzyka w nerwiaku zarodkowym, zmodyfikowane wg [42]

Parametry	Ryzyko		
	niskie	pośrednie	wysokie
KLINICZNE			
Wiek Stopień zaawansowania 5-letnie przeżycie	< 1 r.ż 1, 2 4S 95%	> 1 r.ż 3, 4 50%	> 1 r.ż. 3, 4 25%
HISTOPATOLOGICZNE			
Liczebność komórek podścieliska (k. Schwanna) MKI (indeks mitozy / karyorrhexis) Indeks mitotyczny Ogniska zwapnień	>50% <2% niski obecne	<50% 2–4%	brak lub minimalna >4% wysoki brak
CYTOGENETYCZNE			
Ploidia LOH 1p LOH 11q, 14q Dodatkowa kopia chromosomu 17q Status *MYCN*	3n rzadko rzadko rzadko norma	2n /4n rzadko często często norma	2n/4n często rzadko często amplifikacja
MOLEKULARNE			
Ekspresja TrkA Ekspresja TrkB Izoforma p73	wysoka niska p73	niska niska ?	niska wysoka ΔNp73

najbliższej przyszłości do wstępnej oceny powinna zostać włączona również analiza markerów molekularnych, zwłaszcza ocena ekspresji białek z rodziny Trk. Kompleksowa analiza danych klinicznych, histopatologicznych, jak i profilu genetycznego umożliwi stratyfikację pacjentów (tab. 1), tak aby dzieciom z grupy najwyższego ryzyka można było wdrożyć agresywne leczenie, natomiast w grupie o najniższym ryzyku jak najbardziej zminimalizować efekty uboczne terapii. Zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw transformacji nowotworowej, jak również poznanie mechanizmów spontanicznej regresji to wyzwanie przyszłości badań nad nerwiakiem zarodkowym. Stanowią one drogę dla stworzenia indywidualnych schematów terapii, ukierunkowanej na bezpośrednią ingerencję w procesy transmisji sygnałów wewnątrzkomórkowych tak, aby przywrócić równowagę między zjawiskami apoptozy i proliferacji w tkance dojrzewającego układu nerwowego.

PIŚMIENNICTWO

[1] ADAMKIEWICZ-DROŻYŃSKA E. Czynniki prognostyczne i nowe możliwości leczenia neuroblastoma. *Współcz. Onkol*. 2000; **4**: 72–75.

[2] AMBROS IM, AMBROS PF. The role of Schwann cells in neuroblastoma [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 355–369.

[3] AMBROS PF, AMBROS IM. Neuroblastom *Med. Genetik* 2002; **2**: 119–124.

[4] BOWN N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects.*J Clin Pathol*. 2001; **54**: 897–910.

[5] BOWN N, ŁASTOWSKA M, COTTERILL S, O`NEILL S, ELLERSHAW C, ROBERTS P, LEWIS I, PEARSON AD. 17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. UK Cancer Cytogenetics Group and the UK Children`s Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol*. 2001; **36**: 14–19.

[6] BRODEUR GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Rev Cancer* 2003; **3**: 203–216.

[7] BRODEUR GM, AMBROS PF. Genetic and biological markers of prognosis in neuroblastoma. [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 355–369.

[8] CARON H, SPIEKER N, GODFRIED M, VEENSTRA M, van SLUIS P, de KRAKER J, VOUTE P, VERSTEEG R. Chromosome bands 1p35-36 contain two distinct neuroblastoma tumor supressor loci, on of which is imprinted. *Genes Chromosom Cancer* 2001; **31**: 228–239.

[9] CASCIANO I, MAZZOCCO K, BONI L, PAGAN G, BANELLI B, ALLEMANNI G, PONZONI M, TONINI GP, ROMANI M. Expression of DNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 246–251.

[10] COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T. Cancer suppressor genes [w] Cotran RS Kumar V Collins T [red.] Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto. W.B. Saunders Company 1999. 286–294.

[11] CHO KR, VOGELSTEIN B. Genetic alternations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992; **70**: 1727–1731.

[12] DOLE M, NUNEZ G, MERCHANT AK, MAYBAUM J, RODE CK, BLOCH CA, CASTLE. Bcl-2 inhibits chemioteraphy-induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res* 1994; **51**: 6529–6538.

[13] EGGERT A, GROTZER MA, IKEGAKI N, LIU XG, EVANS AE, BRODEUR GM. Expression of neurotrophin receptor TrkA inhibits angiogenesis in human neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2000; **35**: 569–572

[14] EGGERT A, IKEGAKI N, LIU XG, CHOU TT, LEE VM, TROJANOWSKI JQ, BRODEUR GM. Molecular dissection of Trk-A signal transduction pathways mediating differentiation in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000; **19**: 2043–2051.

[15] FULDA S, DEBATIN K.M Apoptosis pathways in neuroblastoma therapy. *Cancer Lett* 2003; **197**: 131–135.
[16] FULDA S, SIEVERTS H, FRIESEN C, HERR I, DEBATIN KM. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1997; **57**: 3823–3829.
[17] GUO C, WHITE PS, WEISS MJ, HOGARTY MD, THOMPSON PM,STRAM DO, GERBING R, MATTHAY KK, SEEGER RC, BRODEUR GM, MARIS JM. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastoma. *Oncogene* 1999; **18**: 4948–4957.
[18] HABER M, BORDOW SB, GILBERT J, MADAFIGLIO J, KAVALLARIS M, MARSHALL GM, MECHETNER EB, FRUEHAUF JP, TEE L, COHN SL, SALWEN H, SCHMIDT ML, NORRIS MD. Altered expression of the MYCN oncogene modulates MRP gene expression and response to cytotoxic drugs in neuroblastoma cells. *Oncogene* 1999; **18**: 2777–2782.
[19] HABER M, BORDOW SB, HABER PS, MARSHALL GM, STEWART BW, NORRIS MD. The prognostic value of MDR1 gene expression in primary untreated neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997; **12**: 2031–2036.
[20] HABER M, KAVALLARIS M. Multidrug resistance genes in neuroblastoma. [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 207–215.
[21] HIYAMA E, HIYAMA K, OHTSU K, YAMAOKA H, ICHIKAWA T, SHAY JW, YOKOYAMA T. Telomerase activity in primary neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behavior? *Eur J Cancer* 1997; **33**: 1932–1936.
[22] HIYAMA E, HIYAMA K, YOKOYAMA T, MATASUURA Y, PIATYSZEK MA, SHAY JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995; **1**: 249–255.
[23] HIYAMA E, REYNOLDS CP. Telomerase as a biological and prognostic marker in neuroblastoma. [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 159–174.
[24] HO R, EGGERT A, HISHIKI T, MINTURN JE, IKEGAKI N, FOSTER P, CAMORATTO AM, EVANS AE, BRODEUR GM. Resistance to chemiotherapy mediated by TrkB in neuroblastoma. *Cancer Res* 2002; **62**: 6462–6476.
[25] HOSOI G, HARA J, OKAMURA T, OSUGI Y, ISHIHARA S, FUKUZAWA M, OKADA A, OKADA S TAWA A. Low frequency of the p53 gene mutations in neuroblastoma. *Cancer* 1994; **73**: 3087–3093.
[26] ISLAM A, KAGEYAMA H, TAKADA N, KAWAMOTO T, TAKAYASU H, ISOGAI E, OHIRA M, HASHIZUME K, KOBAYASHI H, KANEKO Y, NAKAGAWARA A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000; **19**: 617–623.
[27] KANEKO Y, KNUDSON A. Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes Chromosom Cancer* 2000; **29**: 89–95.
[28] KITANAKA C, KATO K, IJIRI R, SAKURADA K, TOMIYAMA A, NOGUCHI K, NAGASHIMA Y, NAKAGAWARA A, MOMOI T, TOYODA Y, KIGASAWA H, NISHI T, SHIROUZU M, YOKOYAMA S, TANAKA Y, KUCHINO Y. Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**; 358–368.
[29] KITANAKA C, KUCHINIO Y. Caspase independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 508–515.
[30] KNUDSON A, STRONG L. Mutation and cancer. Neuroblastoma and pheochromocytoma *Am J Hum Genet* 1972; **24**: 514–522.
[31] LOOK AT, HAYES FA, SHUSTER JJ, DOUGLASS EC, CASTLEBERRY RP, BOWMAN LC, SMITH EI, BRODEUR GM. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc amplification in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1991; **9**: 581–591.
[32] ŁASTOWSKA M. Analiza materiału genetycznego w zwojaku zarodkowym przy pomocy metod cytogenetyki molekularnej – znaczenie kliniczne wykrytych zmian genetycznych. Praca habilitacyjna, AM Poznań 1999.
[33] MARIS JM, KYEMBA SM, REBBECK TR, WHITE PS, SULMAN EP, JENSEN SJ, ALLEN C, BIEGEL JA, YANOFSKY RA, FELDMAN GL, BRODEUR GM. Familial predisposition to neuroblastoma does not map to chromosome band 1p36 *Cancer Res* 1996; **56**: 3421–3425.
[34] MARIS JM, TONINI GP. Genetics of familiar neuroblastoma [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 125–135.

[35] MARIS JM, WEISS MJ, GUO C, GERBING RB, STRAM DO, WHITE PS, HOGARTY MD, SULMAN EP, THOMPSON PM, LUKENS JN, MATTHAY KK, SEEGER RC, BRODEUR GM. Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients. A Children's Cancer Group study. *J. Clin Oncol* 2000; **18**: 1888–1899

[36] MARIS JM, WEISS MJ, MOSSE Y, HII G, GUO C, WHITE PS, HOGARTY MD, MIRENSKY T, BRODEUR GM, REBBECK TR, URBANEK M, SHUSTERMAN S. Evidence for a hereditary predisposition locus at chromosome 16p12-13 *Cancer Res* 2002; **62**: 6651–6658.

[37] MARTINSSON T, SJOBERG RM, HEDBORG F, KOGNER P. Deletion of chromosome 1p loci and microsatelite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms. *Cancer Res* 1995; **55**: 5681–5686.

[38] MELINO G, DeLAURENZI V, VOUSDEN K. p73: friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 605–614.

[39] NAKAGAWARA A. The NGF story and neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1998; **31**: 113–115.

[40] NAKAGAWARA A, AZAR CG, SCAVARDA NJ, BRODEUR GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 759–767.

[41] NALEPA G, ŻUKOWSKA-SZCZECHOWSKA E. Kaspazy i apoptoza: umrzyj i pozwól żyć. *Wiad Lek* 2002; **55**: 100–106.

[42] Van NOESEL MM, VERSTEEG R. Pediatric neuroblastomas. Genetic and epigenetic ‚Danse Macabre' *Gene* 2004; **325:** 1–15.

[43] NORRIS MD, BORDOW SB, MARSHALL GM, HABER PS, COHN SL, HABER M. Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. *New Engl J Med* 1996; **334**: 231–238.

[44] POREMBA C, HERO B, HEINE B, SCHEEL C, SCHAEFER KL, CHRISTIANSEN H, BERTHOLD F, KNEIF S, STEIN H, JUERGENS H, BOECKER W, DOCKHORN-DWORNICZAK B. Telomerase is a strong indicator for assessing the proneness to progression in neuroblastomas *Med Pediatr Oncol*. 2000; **35**: 651–655.

[45] REITER J, BRODEUR GM. MYCN is the only highly expressed gene from the core amplified domain in human neuroblastomas *Genes Chromosom Cancer* 1998; **23**: 134–140.

[46] ROMANI M, TONINI GP, BANELLI B, ALLEMANI G, MAZZOCCO K, SCARUFFI P, BONI L PONZONI M, PAGNAN G, RAFFAGHELLO L, FERRINI S, CROCE M, CASCIANO I. Biological and clinical role of p73 in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; **197**:111–117.

[47]. SCHIMADA H, AMBROS IM. DEHNER LP. HATA J. JOSHI V. BROGHILD R. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 1999; **86(2)**: 349–362.

[48] SCHMIDT ML, LUKENS JN, SEEGER RC, BRODEUR GM, SHIMADA H, GERBING RB, STRAM DO, PEREZ C, HASSE GM, MATTHAY KK. Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: a prospective Children's Cancer Group study. *J. Clin. Oncol.* 2000; **18**: 1260–1268.

[49] SCHWAB M. MYCN amplification in neuroblastoma. [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 75–83.

[50] SCHWAB M, ALITALO K, KLEMPNAUER KH, VARMUS HE, BISHOP JM, GILBERT F, BRODEUR GM, GOLDSTEIN M, TRENT J. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983; **305**: 245–248.

[51] SHOHET J, HICKS MJ, PLON SE, BURLINGAME SM, STUART S, CHEN SY, BRENNER MK, NUCHTERN JG. Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma. *Cancer Res* 2002; **62**: 1123–1128.

[52] TANAKA T, BERNARD J. Expression of Ha-ras, TP53 and TP73 in neuroblastoma. [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 175–182.

[53] TANAKA T, SUGIMOTO T, SAWADA T. Prognostic discrimination among neuroblastomas according to Ha-ras/ Trk A gene expression. *Cancer* 1998; **83**: 1626–1633.

[54] TEITZ T, LAHTI JM, KIDD VJ. Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J Mol Med* 2001; **79**: 428–436.

[55] THE I, MURTHY AE, HANNIGAN GE, JACOBY LB, MENON AG, GUSELLA JF, BERNARDS A. Neurofibromatosis type 1 gene mutations in neuroblastoma. *Nature Genet* 1993; **3**: 62–66.

[56] THOMPSON PM, SEIFRIED BA, KYEMBA SK, JENSEN SJ, GUO C, MARIS JM, BRODEUR GM, STRAM DO, SEEGER RC, GERBING R, MATTHAY KK, MATISE TC, WHITE PS. Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Cancer Res* 2001; **61**: 6185–6193
[57] TWEDDLE DA, PEARSON ADJ, HABER M, NORRIS MD, XUE X, FLEMMING C, LUNEC J. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; **197**: 93–98.
[58] VOGAN K, BERNSTEIN M, LECLERC JM, BRISSON L, BROSSARD J, BRODEUR GM, PELLETIER J, GROS P. Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas *Cancer Res* 1993; **53**: 5269–5273.
[59] YANG A, WALKER N, BRONSON R, KAGHAD M, OOSTERWEGEL M, BONNIN J, VAGNER C, BONNET H, DIKKES P, SHARPE A, McKEON F, CAPUT D. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 2000; **404:** 99–103.
[60] Neuroblastoma [w] *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM*. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {256700}: {aktualizacja z dnia: 03.06.2004}: World Wide Web URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/

Redaktor prowadzący – Jan Żeromski

Otrzymano: 25.10.2004 r.
Przyjęto: 17.11.2004 r.
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
e-mail:katgen@amg.gda.pl