

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE NEUROBLASTOMU

MOLECULAR BIOLOGY OF NEUROBLASTOMA

VÍCHA A., ECKSCHLAGER T.

KLINIKA DĚTSKÉ HEMATOLOGIE A ONKOLOGIE, UK 2.LF A FN MOTOL, PRAHA

Souhrn: Neuroblastom je maligní embryonální nádor dětského věku odvozený z nezralých a nediferencovaných buněk neurální lišty osídlujících paravertebrální sympatická ganglia, dřev nadledviny a paraganglií. Je pro něj charakteristická značná biologická variabilita. Nádory nízkého rizika často samovolně regredují, případně spontánně či při léčbě diferencují. Vysoce maligní forma se vyznačuje mimořádně agresivním průběhem s neovlivnitelnou progresí, nádor rychle roste a časně metastazuje. Existují prognostické znaky, které umožňují zařazení pacientů do rizikových skupin: věk v době stanovení diagnózy, histologická klasifikace, exprese receptorů *trk*, DNA ploidie, amplifikace genu *N-myc*, delecce 1p36 a řada dalších delecí a zmnožení (delecce 2q, 3p, 9p, 11q, 13q a 14q a zmnožení 17q).

Na modelu neuroblastomu lze demonstrovat význam predikce průběhu a použití individualizované terapie. Na druhé straně lze ukázat i provázanost a korelaci řady prognostických faktorů z nichž pouze některé přináší skutečně nezávislou informaci. K posouzení skutečného prognostického významu komplexu faktorů je proto vždy nezbytná multifaktoriální analýza údajů získaných v rámci rozsáhlé multicentrické studie.

Klíčová slova: neuroblastom, DNA ploidie, amplifikace genu *N-myc*, delecce 1p36, CGH.

Neuroblastoma is a malignant embryonal childhood tumor originating from immature and undifferentiated neural crest-derived cells which colonize paravertebral sympathetic ganglia, adrenal medulla and paraganglia. The clinical hallmark of neuroblastoma is heterogeneity. Low-risk tumors undergo spontaneous regression or spontaneous- or therapy-induced differentiation. There is characteristic aggressive progression with fast growth and early metastases in high-risk tumors. Several parameters have been proposed to predict biological behavior: age at the time of diagnosis, histological classification, expression of *trk* receptors, DNA ploidy, *N-myc* amplification, 1p36 deletion and many other deletions and gains (2q, 3p, 9p, 11q, 13q, and 14q deletion and 17q gain).

We can demonstrate the importance of disease course prediction and risk adapted therapy using the neuroblastoma model. On the other hand, it is also possible to show correlations of many prognostic factors from which only some bring independent information. Multifactorial analyses of data from a large multicentric study are necessary for evaluation of prognostic significance of a complex of factors.

Key words: neuroblastoma, DNA ploidy, *N-myc* amplification, 1p36 deletion, CGH

Neuroblastom je maligní embryonální nádor dětského věku odvozený z nezralých a nediferencovaných buněk neurální lišty osídlujících paravertebrální sympatická ganglia, dřev nadledviny a paraganglií. Příčina jeho vzniku není známa. Je to nejčastější extrakraniální solidní nádor dětského věku s incidencí, která se udává v rozmezí 7 - 10%. V Evropě a severní Americe je nádor ročně diagnostikován u 8 - 9 dětí na 1 milion dětí mladších patnácti let. Průměrný věk v době stanovení diagnózy se pohybuje kolem dvou let (36% pacientů je mladších 1 roku, 79% mladších 4 let a 97% pacientů onemocní do 10. roku života), velmi vzácně se neuroblastom vyskytne i u dospělých. Některé studie prokazují bifázickou distribuci v závislosti na věku s prvním vrcholem do 1 roku a druhým mezi 2.- 4. rokem života. [1] Věk vzniku onemocnění je i významným prognostickým faktorem. [2] Asi 70 % primárních nádorů vzniká v dutině břišní, z nich polovina vychází z dřev nadledviny a polovina z paraganglií a sympatických ganglií v břiše, 5 % je lokalizováno do pánevní oblasti a zbývajících 25% vyrůstá z ganglií krční a hrudní oblasti. [1]

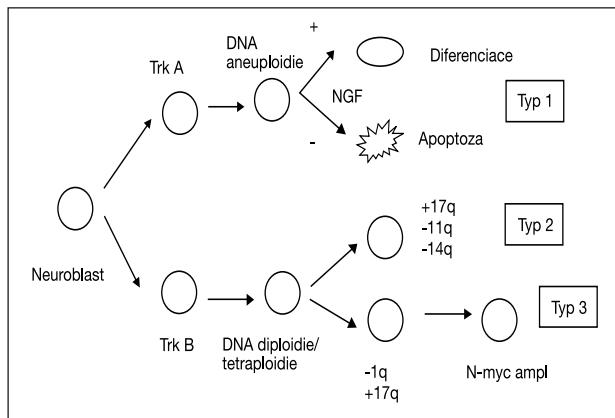
Pro neuroblastom je charakteristická značná biologická variabilita. Nádory nízkého rizika často samovolně regredují, případně se spontánně či při léčbě diferencují v ganglioneuroblastom a dokonce i v benigní ganglioneurom. Vysoce maligní forma se vyznačuje mimořádně agresivním průběhem s neovlivnitelnou progresí, nádor rychle roste a časně metastazuje - především do kostí, kostní dřev, mízních uzlin a u nejmenších dětí do kůže a jater. V době stanovení diagnózy mají dvě třetiny pacientů metastázy, které jsou mnohdy prvním příznakem. [3] Zvláštností stágingu tohoto nádoru je klinické stadium IVS charakterizované nevelkým primárním nádorem, metastázami pouze v kostní dřev, játrech a/nebo kůži a manifestací se do jednoho roku. Pro stadium IVS je charakteristická dobrá prognóza (přežívá více než 90 - 95 % dětí) a častá regrese nebo vyzrávání. [1, 4]

Vzhledem k rozdílnému biologickému chování nádoru je zřejmé, že existují prognostické znaky, které umožňují zařazení pacientů do rizikových skupin. Prognostický význam věku pacienta v okamžiku stanovení diagnózy (u kojenců je přízni-

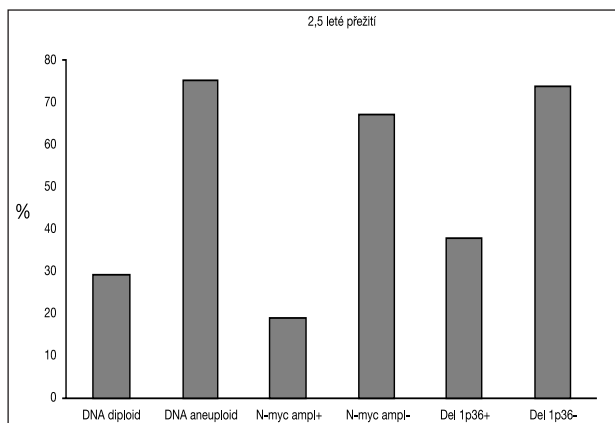
vější průběh), klinického stadia a tradiční histopatologické klasifikace (ganglioneurom, ganglioneuroblastom a neuroblastom) byl znám již v sedmdesátých letech minulého století. V osmdesátých a devadesátých letech byly identifikovány další prognostické znaky: 1/ markery detekovatelné v periferní krvi, kostní dřeni nebo v moči: poměr hladiny kyseliny vanilmandlové k homovanilové v moči (poměr pod 1 je známkou horší prognózy), sérová hladina ferritinu, laktátdehydrogenázy a neuronspecifické enolázy - vysoké hodnoty korespondují s nepříznivou prognózou [5], přítomnost CD10+ buněčné populace v kostní dřeni je příznivým prognostickým faktorem [6], snížený počet lymfocytů v periferní krvi je známkou méně příznivé prognózy [7], 2/ histopatologická klasifikace (stupeň diferenciace, přítomnost nebo absence stromatu a kalcifikací, počet mitóz, karyorektický a vaskulární index, exprese CD44 aj.) nejužší jsou hodnocení podle Shimady nebo Joshioho, které rozlišují neuroblastom vysokého a nízkého rizika [8, 9, 10], 3/ genetické faktory nádoru: DNA index, počet kopií onkogenu *N-myc*, delece krátkého raménka 1. chromozómu, index proliferčního nukleárního antigenu (PCNA), exprese P-glykoproteinu (produkt genu multidrug resistance, vysoká exprese snižuje účinnost chemoterapie), exprese některých neurotrofních faktorů (NGF, Nerve Growth Factor) a receptorů pro NGF (*trkA*, *trkB*, *trkC*). [11, 12]

Expresce receptorů

Nedávno byl rozpoznán význam několika receptorů pro NGF-*trkA*, *trkB*, *trkC* (geny receptorů tyrozin kinázy). Nejvíce prozkoumaný je *trkA*. Vysoká exprese se nachází u neuroblastomu klinického stadia I, II a IVS bez amplifikace *N-myc*. Extrémně nízká exprese tohoto receptoru bývá u nádorů s amplifikací *N-myc*. S expresí *trkA* pozitivně koreluje exprese onkogenu *H-ras*. [13]



Obr. 1. Hypotetický vývoj neuroblastomu.



Obr. 2. 2,5 leté přežití podle jednotlivých prognostických znaků. Data KDHO UK 2.LF a FN Motol, Praha.

Stupeň exprese *trkA* pozitivně koreluje s prognózou přežití. Pětileté přežívání pacientů s vysokou expresí *trkA* je 86% ve srovnání se 14% u pacientů s nízkou expresí. [14] Stupeň exprese *trkA* a amplifikace *N-myc* určuje naději na vyléčení. Vysoká exprese *trkA* je spojena s výbornou prognózou, nízká exprese *trkA* bez *N-myc* amplifikace signifikantně snižuje šanci na vyléčení. *TrkA* při nepřítomnosti NGF, jehož zdrojem jsou Schwannovy buňky přítomné ve stromatu nádoru, indukuje apoptózu a při chybění tohoto neurotrofního faktoru vyvolává diferenciaci. [15, 16] Předpokládá se i antiangiogenní účinek *trkA*. Funkce *trkB* a *trkC* jsou u neuroblastomu méně prostudované. Plně exprimovaná forma *trkB* koreluje s amplifikací *N-myc* a nezralými formami neuroblastomu. Naproti tomu vysoká exprese *trkC* se nachází u nádorů nízkého klinického stadia a obdobně jako *trkA* nebývá u nádorů s amplifikací *N-myc*. [14] Další markery neuronální diferenciace jsou chromogranin A a neuropeptid Y, které mohou sloužit jako ukazatel diferenciace a jako senzitivní nádorový marker. [17, 18] Diskutovanou problematikou zůstává význam exprese receptorů *trk* jako nezávislých prognostických faktorů. Zdá se, že při znalosti dosud užívaných prognostických faktorů informace o expresi těchto receptorů nemění prognózu pacientů. [19]

Amplifikace N-myc

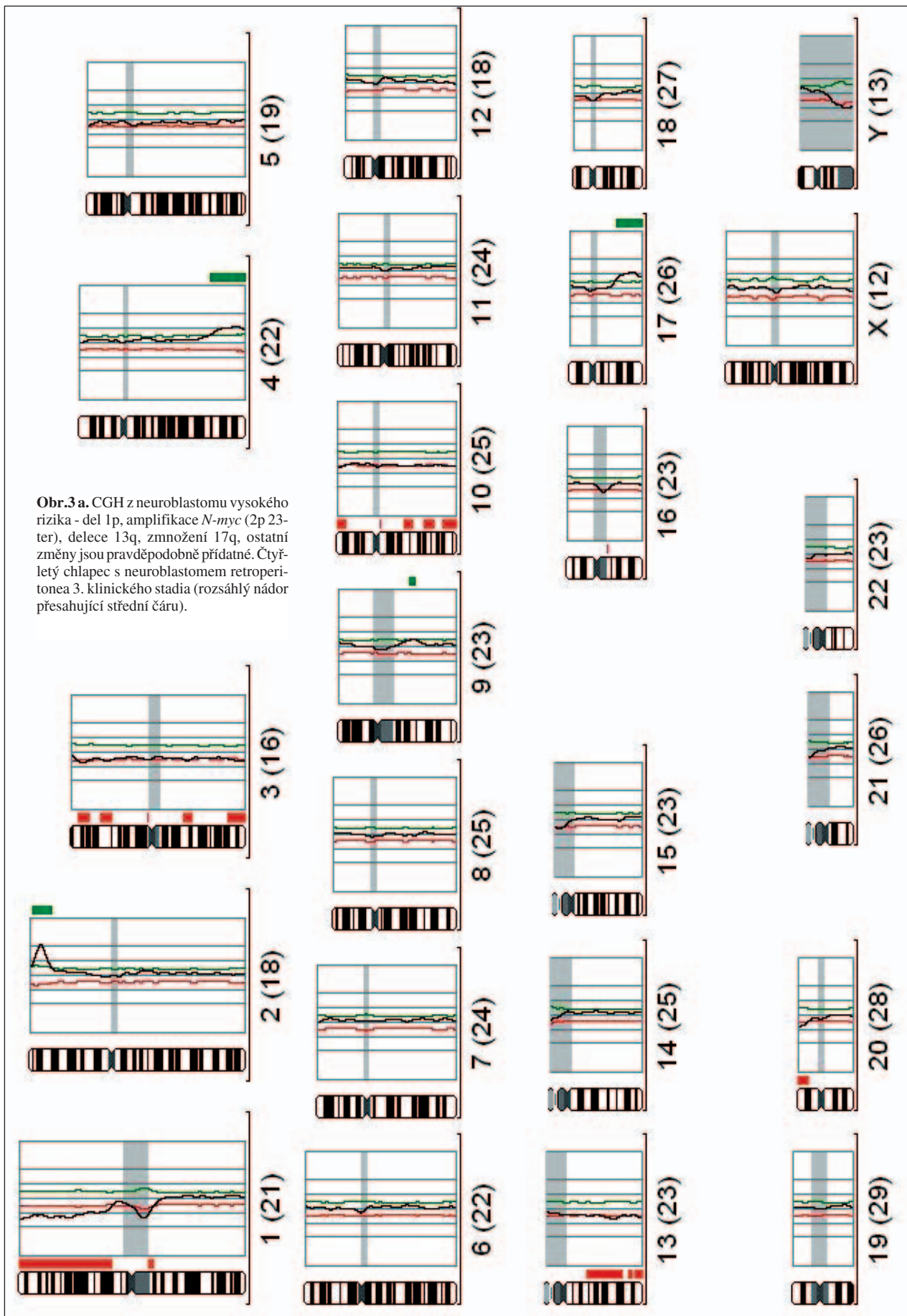
Onkogen *N-myc* leží na 2. chromozómu (2p23-2p24) a obsahuje tři exony. Jeho produktem je, stejně jako ostatních genů rodiny *myc*, jaderný fosfoprotein s vazebnou afinitou k DNA ovlivňující transkripci a replikaci DNA. [20] Gen *N-myc* hraje důležitou roli během vývoje a diferenciace neuroektodermu. Jeho nadměrná exprese výrazně přispívá k malignímu potenciálu buňky. *N-myc* amplifikuje v časném stadiu vývoje nádoru a v dalším průběhu onemocnění se nemění. Prakticky vždy je tato amplifikace provázána delecí 1p nebo zmožením 17q. [21] Vyskytuje se ve dvou formách: 1/ extrachromozomální acentrické fragmenty (dmin, Double Minute Chromatin Bodies); 2/ intrachromozomální, homogeně se barvící oblasti (HSRs, Homogenously Staining Regions). Mnoho studií potvrdilo, že amplifikace *N-myc* genu u neuroblastomu koreluje s agresivním růstem a velmi nepříznivou prognózou bez ohledu na klinické stadium. [22] Amplifikaci prokazujeme u I., II. a IVS klinického stadia pouze výjimečně (5 - 10%) a naopak často je zastížena u pokročilých forem neuroblastomu (III. a IV. klinické stadium).

Amplifikovaný onkogen *N-myc* je v neuroblastomových buňkách přítomen zpravidla ve 3 - 300 kopiích. Přesný počet není z klinického hlediska důležitý, neboť je jednoznačně ověřeno, že nádorové buňky, obsahující více než 8 kopií, jsou vždy agresivní. Změnu počtu kopií genu *N-myc* rozdělujeme na dvě skupiny - gain, zmožení nejvýše o trojnásobek a amplifikaci pokud je počet kopií zmožen nejméně o čtyřnásobek. Gain se vyskytuje zřídka a jeho význam pro prognózu není zatím zcela jasný. Předběžné výsledky napovídají, že i nízké amplifikující nádory mají horší prognózu. Rovněž se v poslední době velmi intenzivně sleduje fokální amplifikace *N-myc*. Průkaz tohoto typu amplifikace, kde pouze malé množství nádorových buněk obsahuje amplifikovaný gen *N-myc*, je v posledních letech sledován biologickou skupinou ESIO Neuroblastoma, na jejíž činnosti aktivně participuje i naše klinika.

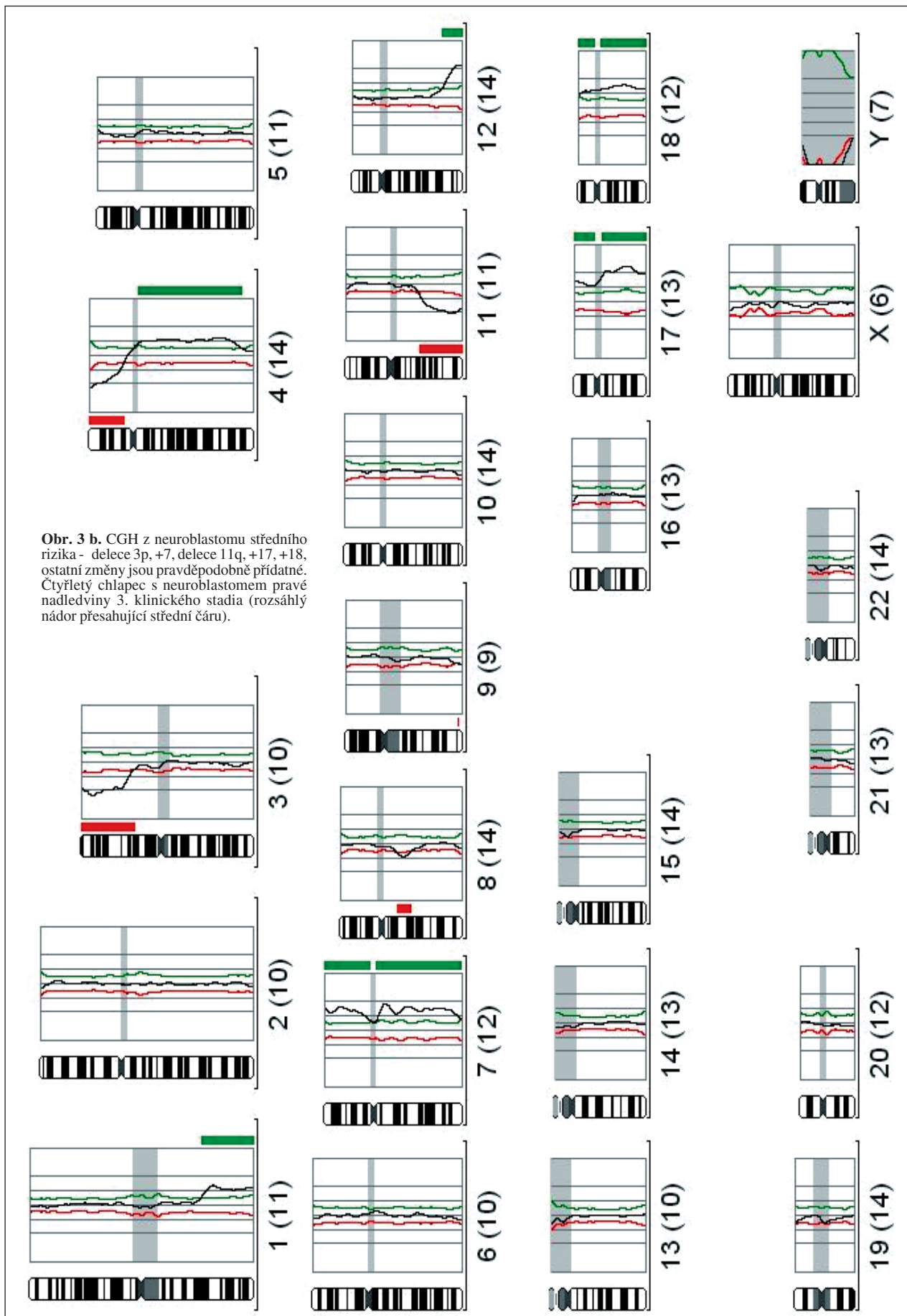
U 40 - 60 % neuroblastomů s amplifikací *N-myc* je koamplifikován onkogen *DDX1* a ještě častěji gen *NAG*. Předpokládá se, že koamplifikaci těchto genů by mohla přispívat k vysoce maligní povaze neuroblastomu s amplifikací *N-myc*. [23]

Ztráta alely

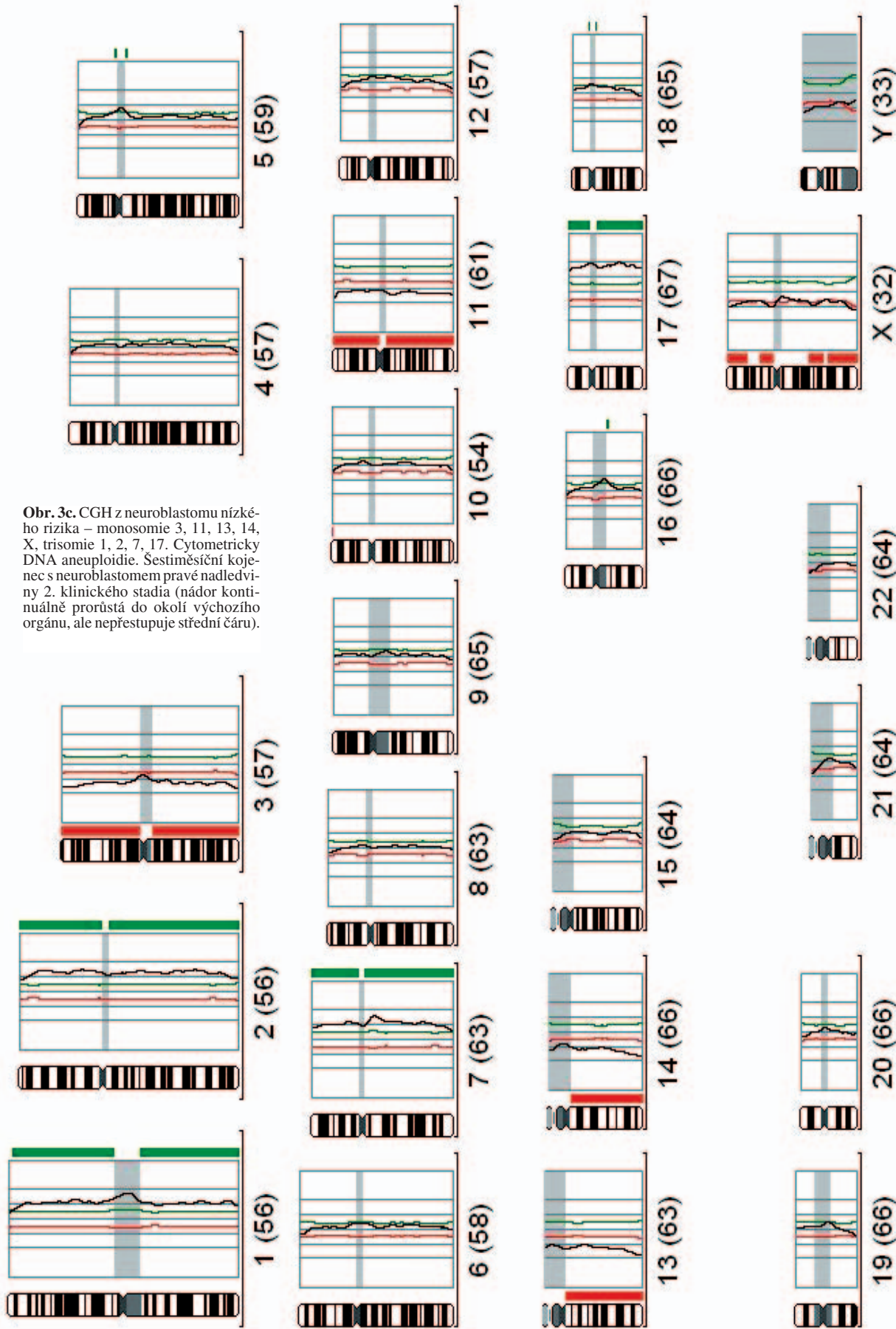
Všeobecně se uznává, že 70 - 80% diploidních neuroblastomů má deleci krátkého raménka 1. chromozómu. Tento nález je spojen s pokročilým onemocněním nepříznivé prognózy. [24] I když jsou deleční změny ve svém proximálním úseku variabilní, podařilo se technikou polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP, Restriction Fragment Length



Obr.3 a. CGH z neuroblastomu vysokého rizika - del 1p, amplifikace *N-myc* (2p 23-ter), delece 13q, zmoženie 17q, ostatní změny jsou pravděpodobně přídatné. Čtyřletý chlapec s neuroblastomem retroperitonea 3. klinického stadia (rozsáhlý nádor přesahující střední čáru).



Obr. 3 b. CGH z neuroblastomu středního rizika - delece 3p, +7, delece 11q, +17, +18, ostatní změny jsou pravděpodobně přídavné. Čtyřletý chlapec s neuroblastomem pravé nadledviny 3. klinického stadia (rozsáhlý nádor přesahující střední čáru).



Obr. 3c. CGH z neuroblastomu nízkého rizika – monosomie 3, 11, 13, 14, X, trisomie 1, 2, 7, 17. Cytometricky DNA aneuploidie. Šestiměsíční kojeneček s neuroblastomem pravé nadledviny 2. klinického stadia (nádor kontinuálně prorůstá do okolí výchozího orgánu, ale nepřestupuje střední čáru).

Polymorphism) nalézt podoblast konzistentní delece 1p36 se ztrátou heterozygoty (LOH, Loss Of Heterozygosity). Tento region zahrnuje jeden či více supresorových genů důležitých pro maligní transformaci a progresi. O řadě genů se uvažuje jako o kandidátních nádorových supresech na 1p36, které se uplatňují u neuroblastomu s delecí této oblasti. Jsou to *p73*, který je homologem *p53*, *CDC2L1*, transkripční faktory *HKR3*, *DNA*, *PAX7*, *ID3* a *E2F*, transkripční elongační faktor *TCEB3* a dva geny z rodiny receptorů *TNF-TNFR2* a *DR3*. [25]

Je možné, že na patogenezi neuroblastomu a jeho malignizaci se podílí více supresorových genů, protože jsou popsány ztráty alely i na 2q, 3p, 9p, 11q, 13q a 14q. [25] Ztráty na 2q jsou lokalizovány na 2q33 a provází je ztráta exprese genu pro kaspázu 8. [26] Delece 3p25.3- p14.3 postihuje gen *RASSF1A* (Ras-associated domain family 1). Tento gen inhibuje funkci onkogenní H-ras GTPázy a kromě delece je též často inaktivován hypermetilací u neuroblastomu i řady jiných nádorů. [27] Ztráty na 9p jsou zřídka nacházeny u klinicky zjevných nádorů, ale poměrně často u nádorů nalezených při hromadném screeningu. [28]

Změny na 11q zahrnují balancované translokace postihující 11q21 a 11q22, delece 11q23, inverze 11q21- q23 a nejčastěji ztrátu alely. Ztráta alely je

v 15- 40 % nádorů a je nepřímou vázána s amplifikací *N-myc*, ale je přesto známkou horší prognózy. [29] Delece na 3p je asociována s delecí 11q a s nepřítomností amplifikace *N-myc*. [29]

Podle většiny autorů je zmožen 17q, často vyvolané nebalancovanou translokací s 1p nebo 11q, provázeno horší prognózou. [30] Toto zmožení je nacházeno až u 80 % neuroblastomů. [30] Podle některých autorů je nezávislý prognostický význam zmožení 17q průkazný u nádorů bez amplifikace *N-myc* a bez delece 1p nebo 11q. [30] Němečtí autoři neprokazují vztah prognózy a zmožení 17q. [31] Pravděpodobnými geny, které se uplatňují na nepříznivém průběhu u zmožení 17q, jsou nm23-H1, nm23-H2 a/nebo survivin. [32]

DNA analýza

Již od roku 1984 je známé, že neuroblastomy s triploidním nebo hyperdiploidním obsahem DNA dobře reagují na chemoterapii a mají příznivou prognózu. Neuroblastomy s diploidním nebo skoro diploidním obsahem DNA (většina) mají prognózu nepříznivou a zařazují se do skupiny s vysokým stupněm rizika. [1, 11, 33] Zajímavé je srovnání amplifikace genu *N-myc* a DNA ploidie. Z 298 pacientů zařazených do studie severoamerické skupiny dětské onkologie POG mělo 101 pacientů (34%) diploidní nádorové buňky, 194 (65%) hyperdiploidní klonální abnormality a 3 pacientů (1%) hypodiploidní obsah DNA. Kojenci s hyperdiploidním nádorem měli velmi dobrou prognózu oproti špatné prognóze s neuroblastomy diploidními a obdobný výsledek byl i ve skupině pacientů ve věku 1 - 2 let. U pacientů starších dvou let, zařazených do IV. klinického stadia, nebyl prokázán vztah mezi ploidí a prognózou. [34] Tyto poznatky svědčí o existenci tří genetických podtypů neuroblastomu, které mají značný prediktivní význam a určují klinické chování nádoru. Tyto podtypy se liší počtem kopií *N-myc*, karyotypem, DNA ploidí, abnormalitami 1p, věkem pacienta a klinickým stadiem onemocnění. V roce 1997 Brodeur a spol. navrhli klinicko- genetickou klasifikaci neuroblastomu na základě rozsáhlé retrospektivní analýzy dat zejména ze severoamerické skupiny dětské onkologie CCG. Tuto Brodeurovu klasifikaci ukazuje tabulka č. 1. Z ní vychází dělení do tří rizikových skupin zařazených do léčebných protokolů všech světových pracovišť což umožňuje optimalizovat léčebná schémata. [11] Pacienti

Vlastnosti	Typ 1	Typ 2	Typ 3
N-myc gen	Normální		amplifikovaný
karyotyp nebo DNA ploidie	hyperdiploidní nebo triploidní	diploidní nebo tetraploidní	
1p LOH	< 5%	20-50%	80 - 90%
14q LOH			< 5%
trkA exprese	vysoká	nízká	nízká nebo chybí
trkB exprese	nízká nebo chybí		vysoká
trkC exprese	vysoká	nízká nebo chybí	
věk	obvykle 1 rok	obvykle > 1 rok	obvykle 1 - 5 let.
klinické stadium	obvykle 1, 2, 4S		obvykle 3, 4
3 leté přežití	95%	25 - 50%	< 5%

Tabulka č. 1: Klinicko-genetická klasifikace neuroblastomů. Upraveno podle Brodeura [11]

	Amplifikace více než 10 kopií	Amplifikace méně než 10 kopií
% DNA aneuploidie	15	58

Tabulka č. 2: Vztah mezi DNA aneuploidií a amplifikací *N-myc* onkogenu. Vazba mezi amplifikací *N-myc* a DNA ploidií byla statisticky významná na 5 % hladině (počítáno testem 2 s Yatesovou korekcí).

enti s nejpříznivější formou neuroblastomu jsou léčeni pouze chirurgicky bez adjuvantní chemoterapie a přesto mají nejlepší léčebné výsledky. U pacientů s neuroblastomem nejvyššího rizika je indikována nejintenzivnější chemoterapie, chirurgická léčba, megachemoterapie s autologní transplantací hematopoetických progenitorových buněk, radioterapie a bioterapie.

Předpokládaný vztah jednotlivých genetických změn s vývojem jednotlivých forem neuroblastomu podle Marise a Mathaye zobrazuje obrázek 2. [25]

Výsledky vyšetření 56 pacientů s histologicky verifikovaným neuroblastomem nebo ganglioneuroblastomem léčených na našem pracovišti jsou ve shodě s literárními údaji o prognostickém významu DNA ploidie, amplifikace *N-myc* a delece 1p36. Přežití 2,5 roku znázorňuje obrázek č. 1. Rovněž jsme potvrdili vazbu mezi jednotlivými molekulárně biologickými i klinickými prognostickými znaky (viz tabulka č. 2).

V současné době lze většinu prognostických znaků u neuroblastomu detekovat metodou srovnávací genomové hybridizace (CGH z anglického comparative genomic hybridization), které se stává i doporučeným vyšetřením evropského protokolu ESIOP Neuroblastoma. Normální = kontrolní a vyšetřovaná DNA jsou každá označena jiným fluorochromem (kontrolní červeně a nádorová zeleně) a jsou současně hybridizovány na normální lidské chromozomy v metafázi. Fluorescence se snímá kamerou a vyhodnocuje počítačem. Poměr intenzit fluorescencí podél jednotlivých chromozomů určí místa s chyběním nebo nadbytkem vyšetřované DNA. Tato metoda je ideální ke zjišťování ztráty nebo zmožení chromozomů či jejich částí, nelze jí však využít k detekci balancovaných translokací. [35] Výhodou je, že k vyšetření se používá izolovaná DNA a není nutné získat dělicí se buňky. DNA lze izolovat i z materiálu fixovaného parafinem. *Obrázky 3a, b a c* ukazují výsledky vyšetření CGH u pacientů s neuroblastomy jednotlivých prognostických skupin.

Závěrem lze shrnout, že neuroblastom je patrně nejvariabilnějším nádorem a různé chromozomální změny, nejčastěji delece či amplifikace, provází jednotlivé formy průběhu. Detekce těchto změn má velký význam pro klinickou praxi. Na modelu neuroblastomu lze asi nejlépe demonstrovat význam predikce průběhu a použití tak zvané „terapie šité na

míru“ (risk adapted therapy). Na druhé straně lze ukázat i provázanost a korelaci řady prognostických faktorů z nichž pouze některé přináší skutečně nezávislou informaci. K posouzení skutečného prognostického významu komplexu faktorů

je proto vždy nezbytná multifaktoriální analýza údajů získaných v rámci rozsáhlé multicentrické studie.

Práce vznikla za finanční podpory IGA grant č. NC/7441-3.

Literatura:

1. Brodeur GM, Maris JM.: Neuroblastoma. in:Pizzo PA, Poplack DG (eds.) Principles and practice of pediatric oncology. Lippincot, Williams and Wilkins, Philadelphia, 2002
2. Breslow N, McCann B. Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma. *Cancer Res*, 1971; 31: 2098-2103
3. Weinstein JL, Katzenstein HM, Cohn SL. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist*. 2003;8:278-92
4. Pritchard J, Hickman JA: Why does stage 4S neuroblastoma regress spontaneously. *Lancet*, 1994; 344: 869- 870
5. Riley RD, Heney D, Jones DR et al.: A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 2004;10: 4-12
6. Mandel M, Rechavi G, Neumann Y et al.: CD10+ cell population in the bone marrow of patients with advanced neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*, 1994; 22:115- 118
7. Eckschlager T.: Lymphocyte count as a prognostic factor in childhood cancer. *Pediatr Hematol Oncol*, 1992; 9: 99- 105,
8. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP et al.: The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*, 1999; 86:364-372
9. Shimada H: The International Neuroblastoma Pathology Classification. *Pathologica*, 2003; 95:240-241
10. Joshi VV: Peripheral neuroblastic tumors: pathologic classification based on recommendations of international neuroblastoma pathology committee (Modification of Shimada classification). *Pediatr Dev Pathol*, 2000; 3:184- 199
11. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ et al.: Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol*, 1997;19: 93-101
12. Goto S, Umehara S, Gerbing RB et al.: Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*, 2001; 92:2699- 2708
13. Tanaka T, Sugimoto T, Sawada T. Prognostic discrimination among neuroblastomas according to Ha-ras/trk A gene expression: a comparison of the profiles of neuroblastomas detected clinically and those detected through mass screening. *Cancer*, 1998; 83:1626- 1633
14. Brodeur GM, Nakagawara A, Yamashiro DJ et al.: Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas. *J Neurooncol*, 1997; 31:49-55
15. Watson, F.L., Heerssen, H.M., Bhattacharyya et al.: Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat. Neurosci*, 2001; 4: 981- 988.
16. Ambros, I.M., Attarbaschi, A., Rumpler et al.: Neuroblastoma cells provoke Schwann cell proliferation in vitro. *Med Pediatr Oncol*, 2001; 36: 163-168
17. Ferrari L, Seregni E, Bajetta E et al.: The biological characteristics of chromogranin A and its role as a circulating marker in neuroendocrine tumours. *Anticancer Res*, 1999; 19: 3415- 3427
18. Labdenne P, Heikinheimo M: Clinical use of tumor markers in childhood malignancies. *Ann Med*. 2002;34: 316-323
19. Shimada H, Nakagawa A, Peters J et al.: *TrkA* Expression in Peripheral neuroblastic Tumors. Prognostic Significance and Biological Relevance. *Cancer*, 2004; 101: 1873- 1881
20. Lu X, Pearson A, Lunec J: The MYCN oncoprotein as a drug development target. *Cancer Lett*. 2003;197:125-130
21. Cohn SL, Tweedle DA: MYCN amplification remains prognostically strong 20 years after its „clinical debut“. *Eur J Cancer*, 2004; 40: 2639-2642
22. Schwab M. MYCN in neuronal tumours. *Cancer Lett*. 2004; 204:179- 187
23. Westermann F, Schwab M: Genetic parameters of neuroblastoma. *Cancer Letters*. 2002; 184: 127- 147
24. Maris JM, White PS, Beltinger CP et al.: Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma. *Cancer Res*, 1995; 55: 4664- 4669
25. Maris M, Matthay KK: Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 1999; 17: 2264- 2279
26. Teitz T, Wei T, Valentine MB et al.: Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas amplification of MYCN. *Nat Med*, 2000; 6: 529-535
27. Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N et al.: Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res*, 2002; 62: 5897- 5901
28. Takita J, Hayashi Y, Kohno T.: Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene*, 1995; 11: 1829- 1834
29. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F: Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 2003; 9: 52- 58
30. Lastowska M, Nacheva E, McGuckin A et al.: Comparative genomic hybridization study of primary neuroblastoma tumors. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997; 18: 162- 169
31. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F.: Gain of distal chromosome arm 17q is not associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Clin Cancor Res*, 2003; 9: 4835-4840,
32. van Noesel MM, Versteeg R: Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic „Danse Macabre“. *Gene*, 2004; 325: 1-15
33. Eckschlager T, Pilát D, Kodet R et al.: DNA ploidy in neuroblastoma. *Neoplasma*, 1996; 41: 23-26
34. Marshall T, Rutledge JC: Flow cytometry DNA applications in pediatric tumor pathology. *Pediatr Dev Pathol*, 2000; 3: 314-334
35. Gebhart E: Comparative genomic hybridization (CGH): ten years of substantial progress in human solid tumor molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res*, 2004; 104: 352- 358