

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Gordana Lj. Samardžija

**KORELACIJA EKSPRESIJE MYC I
MYCN PROTEINA I AUTOFAGIJE U
NEUROBLASTNIM TUMORIMA
DEČJEG DOBA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Gordana Lj. Samardžija

**CORRELATION OF MYC AND MYCN
PROTEIN EXPRESSION AND
AUTOPHAGY IN NEUROBLASTIC
TUMORS OF CHILDHOOD**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2016

- Mentor: Prof. dr Dragana Vujić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Medicinski fakultet, Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije
„Dr Vukan Čupić“
- Komentor: Prim. dr sc. med. Slaviša Đuričić, viši naučni saradnik, Institut za
zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“
- Komisija: Doc. dr Tamara Kravić-Stevović, docent, Univerzitet u Beogradu,
Medicinski fakultet, Institut za histologiju i embriologiju
Doc. dr Tatjana Terzić, docent, Univerzitet u Beogradu, Medicinski
fakultet, Institut za patologiju
Dr Mileva Mičić, Naučni savetnik, Institut za medicinska istraživanja u
Beogradu

Datum odbrane: 19.09.2016.

Posvećeno Petri i Matiji koji svemu daju smisao.

KORELACIJA EKSPRESIJE MYC I MYCN PROTEINA I AUTOFAGIJE U NEUROBLASTNIM TUMORIMA DEČJEG DOBA

Uvod: Neuroblastni tumori (NT) obuhvataju neuroblastom (NB), ganglioneuroblastom (GNB) i ganglioneurom (GN) i predstavljaju najčešće ekstrakranijalne, solidne tumore dečjeg doba. Autofagija je evolucijski konzerviran subcelularni proces lizozomski zavisne degradacije citoplazmatskog sadržaja pomoću autofagnih vakuola (AV). Autofagija se aktivira u tumorskim ćelijama kao odgovor na različite vrste stresa. Cilj disertacije je da ispita prisustvo autofagije i ekspresiju MYC i MYCN proteina u različitim tipovima neuroblastnih tumora i njihov odnos sa do sada poznatim prognostičkim faktorima.

Materijal i metode: Studija je obuhvatila 60 bolesnika sa NT, koji su dijagnostikovani između 1996. i 2015. godine u Odeljenju za kliničku patologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“. Uzorci tumorskog tkiva su analizirani imunohistohemijski antitelima za MYC, MYCN i LC3B. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) je korišćena za određivanje *MYCN* i *Ip* statusa. Uzorci smrznutog tumorskog tkiva 20 bolesnika su ispitivani transmisionim elektronskim mikroskopom.

Rezultati: U studiju je uključeno 36 dečaka i 24 devojčice. Prosečan uzrast bolesnika je bio 36 meseci. Stariji su bili bolesnici sa prognostički povoljnijim tipovima NT (GN i iGNB). Statistički značajno veći broj AV, kao i veća ekspresija LC3B nađeni su u uzorcima NB u poređenju sa GN i iGNB. LC3B ekspresija nije bila u korelaciji ni sa jednim kliničkopatološkim faktorom, niti sa preživljavanjem. Imunohistohemijski viši nivo ekspresije MYCN proteina nađen je u uzorcima NB. Postojala je statistički značajna razlika u preživljavanju između grupe sa visokim i niskim nivoom MYCN proteina. Nije bilo korelacije MYCN ekspresije sa prognostičkim faktorima značajnim za NB. MYC ekspresija je uočena samo u ćelijama krvnih sudova.

Zaključak: Dobijeni rezultati ukazuju da agresivni dečji neuroblastom pokazuje značajni porast broja autofagnih vakuola, visok nivo LC3B i MYCN ekspresije i mogli bi predstavljati faktore značajne za razvoj kancera.

Ključne reči: Neuroblastni tumori, Ultrastrukturalna analiza, Elektronska mikroskopija, Autofagija, Imunohistohemija, LC3B, MYC/MYCN ekspresija, Prognostički faktori

CORRELATION OF MYC AND MYCN PROTEIN EXPRESSION AND AUTOPHAGY IN NEUROBLASTIC TUMORS OF CHILDHOOD

Background: Neuroblastic tumors (NT) including neuroblastoma (NB), ganglioneuroblastoma (GNB) and ganglioneuroma (GN) are the most common extracranial solid tumors of childhood. Autophagy is an evolutionarily conserved lysosome-dependent subcellular process for degradation of cytoplasmic contents by autophagic vacuoles (AV). Autophagy is activated in cancer cells in response to multiple stresses. The aim of this dissertation was to analyze presents of autophagy and expression of MYC and MYCN protein in different types of neuroblastic tumors, and there relations with known prognostic parameters.

Materials and methods: These study included 60 patients with NT who were diagnosed between 1996 and 2015. in the Department of Pathology of Mother and Child Health Care Institute of Serbia „Dr Vukan Čupić“. Tumor tissue samples were analysed immunohistochemically with MYC, MYCN and LC3B antibody. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) had been used to establish *MYCN* and *Ip* status. Frozen tumor tissue samples of 20 patients were examined by Transmission Electron Microscopy.

Results: Study included 36 males and 24 females, with average age of 36 month. Patients with good prognostic NT types (GN, iGNB) were older. Significantly higher number of AV and higher LC3B expression were found in tissue samples of NB comparing to GN and iGNB. LC3B expression did not correlate with various clinicopathological factors, including overall survival. Immunohistochemically, higher MYCN expression was found in NB samples and was statistically significant for survival comparing groups with high and low level of MYCN expression. No correlation with neuroblastoma prognostic factors was found. MYC expression was exclusively found in the blood vessels cells.

Conclusions: Our results indicate that aggressive childhood neuroblastomas show massive increase in the number of autophagic vacuoles, high expression of LC3B and MYCN protein and suggest that these factors are advantageous to cancer development.

Keywords: Neuroblastic tumors, Ultrastructural analysis, Electron microscopy, Autophagy, Immunohistochemistry, LC3B, MYC/MYCN expression, Prognostic factors

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. NEUROBLASTNI TUMORI	1
1.1.1. Epidemiološke karakteristike neuroblastnih tumora	1
1.1.2. Klinička slika neuroblastnih tumora	1
1.1.3. Dijagnoza neuroblastnih tumora	2
1.1.4. Tumorski markeri	3
1.1.5. Klinički stadijumi bolesti	4
1.1.6. Lokalizacija primarnog tumora i metastaza	6
1.1.7. Patohistološke osobine neuroblastnih tumora	6
1.1.7.1. <i>Makroskopski izgled</i>	6
1.1.7.2. <i>Mikroskopski izgled</i>	7
1.1.7.3. <i>Internacionalna patološka klasifikacija</i>	8
1.1.8. Genetičke karakteristike neuroblastnih tumora	12
1.1.8.1. <i>Hereditarni neuroblastni tumori</i>	12
1.1.8.2. <i>Molekularno-genetičke osobine neuroblastoma</i>	13
1.1.9. Prognostički parametri neuroblastnih tumora	18
1.2. AUTOFAGIJA	20
1.2.1. Tipovi autofagije	20
1.2.2. Proces autofagije	21
1.2.2.1. <i>Faza inicijacije</i>	22
1.2.2.2. <i>Faza elongacije</i>	23
1.2.2.3. <i>Faza maturacije</i>	24
1.2.2.4. <i>Restitucija lizozoma</i>	25
1.2.3. Mehanizmi regulacije autofagije	25
1.2.4. Alternativna makroautofagija	26
1.2.5. Autofagija u malignim tumorima	27
1.2.5.1. <i>Selektivna autofagija u malignim tumorima</i>	28
1.2.5.2. <i>Ispitivanje autofagije u malignim tumorima</i>	30
1.2.5.3. <i>Karakteristike autofagije u malignim tumorima</i>	31
1.2.5.4. <i>MYC i autofagija</i>	32
2. CILJ RADA	34

3. MATERIJAL I METODE	35
3.1. Bolesnici	35
3.2. Histopatološka analiza	35
3.3. Formiranje tkivnog niza	38
3.4. Imunohistohemijska analiza	39
3.5. Određivanje molekularno-genetičkih parametara	44
3.6. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)	50
3.7. Statistička analiza	50
4. REZULTATI	51
4.1. Osnovne karakteristike bolesnika sa neuroblastnim tumorima	51
4.2. Histopatološka analiza neuroblastnih tumora	53
4.3. Analiza molekularno-genetičkih parametara	63
4.4. Elektronskomikroskopska analiza	67
4.4.1. Ultrastrukturne karakteristike NT	67
4.4.2. Autofagija u NT	71
4.4.3. Mitohondrije, endoplazmatski retikulum i druge organele u NT	74
4.4.4. Odnos broja AV sa <i>MYCN</i> amplifikacijom i proliferacionim indeksom	80
4.5. Imunohistohemijska analiza	82
4.5.1. Imunohistohemijska analiza autofagije LC3B antitelom	82
4.5.2. Imunohistohemijska analiza ekspresije MYC i MYCN proteina	86
5. DISKUSIJA	91
6. ZAKLJUČCI	103
7. LITERATURA	105

1. UVOD

Neuroblastni tumori su najčešći, ekstrakranijalni, solidni tumori dečjeg doba, koji svojom enigmatskom prirodom, preko 150 godina, nesmanjenim intenzitetom zaokupljaju pažnju lekara. Prvi opis datira iz 1864. godine (Virchow), a termin neuroblastom uvodi Wright 1910. godine, kada otkriva da tumor potiče od embrionalnih neuroblastnih ćelija perifernog, simpatičkog nervnog sistema. Neuroblastom (NB) sa ganglioneuroblastomom (GNB) i ganglioneuromom (GN) čini grupu perifernih neuroblastnih tumora (NT). Enigmatska priroda ovih tumora je posledica njihovog raznolikog kliničkog ponašanja koje se kreće od spontane regresije i sazrevanja do vrlo agresivne progresije (1).

1.1. NEUROBLASTNI TUMORI

1.1.1. Epidemiološke karakteristike neuroblastnih tumora

Neuroblastni tumori su najčešći, ekstrakranijalni, solidni tumori dečjeg doba (2). Incidencija neuroblastoma, varira od zemlje do zemlje, ali generalno je 9.9 na milion dece do 14 godina (3). Incidencija je različita po uzrasnim grupama, 19.2 na milion za uzrast 1-4 godina, 2.9 za 5-9 godina i 1.8 za 10-14 godina (3). Najčešće se javlja kod mlađih od 1 godine (52.3 na milion) i u tom uzrastu predstavlja najčešći maligni tumor uopšte. Petogodišnje preživljavanje kod mlađih od 1 godine, u periodu 1975.-2006. godine, kretalo se od 78% do 95%, dok je kod dece uzrasta preko godinu dana sa 40%, u periodu pre 1985. godine, poraslo na 65% u periodu 1999-2002. godine (4).

1.1.2. Klinička slika neuroblastnih tumora

Neuroblastom se odlikuje velikim brojem kliničkih znakova i simptoma zavisno od primarne lokalizacije, raširenosti i bioloških karakteristika tumora. Kod 2/3 bolesnika primarna lokalizacija je u truhu (Slika 1). Tada obično postoji distenzija trbuha, palpabilna, bolna tumorska masa, hipertenzija zbog kompresije renalne arterije, disfunkcija kolona i mokraćne bešike. Tumori lokalizovani u vratu mogu prouzrokovati stridor i disfagiju. Hornerov sindrom nastaje zbog lezije lanca simpatičkih ganglija na

vratu usled tumorske infiltracije. Zbog oštećenja simpatičkih ganglija može se javiti bledilo jedne polovine lica, tzv. Harlekinov znak. Tumorska masa u grudnom košu najčešće je praćena dispneom. Poremećaji vida su posledica metastaza u orbiti i infiltracije optičkog nerva, a protruzija bulbusa sa periorbitalnim edemima nastaje zbog infiltracije kostiju i mekog tkiva orbite. Manje od 2% bolesnika ima paraneoplastične sindrome: sindrom opsoklonus-mioklonus-ataksija ili sindrom vodene dijareje (5 - 7). Pacijenti sa lokalizovanom bolešću su često bez simptoma i dijagnoza se postavlja radiografskim ili ultrazvučnim pregledom iz nekog drugog razloga. Stopa ovakvih, incidentalnih, dijagnoza varira od zemlje do zemlje i u Velikoj Britaniji iznosi 7,7%, dok je u Austriji 27,1%, a Nemačkoj 33,9% (8).



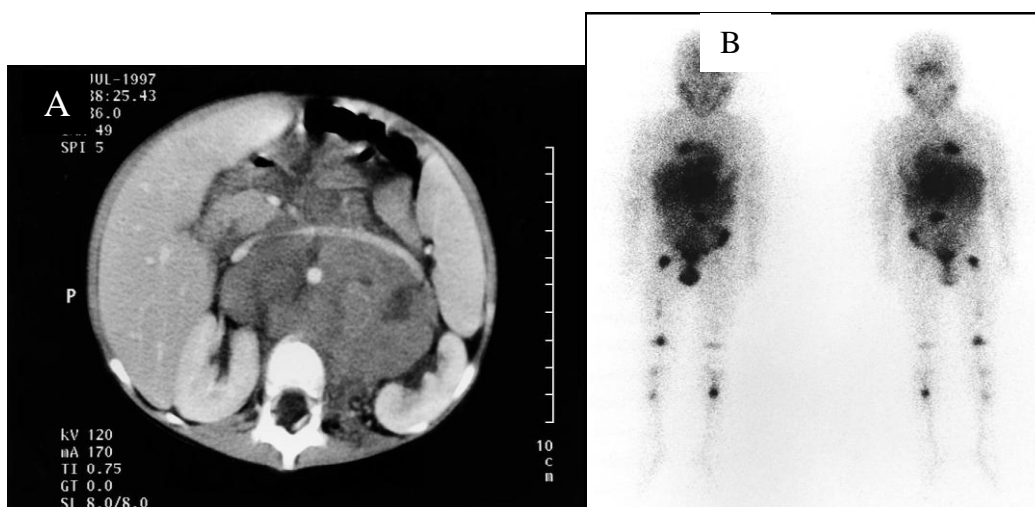
Slika 1 Odojče sa infiltrisanom jetrom – klinički stadijum IVs

1.1.3. Dijagnoza neuroblastnih tumora

Zlatni standard u postavljanju dijagnoze neuroblastoma je histopatološko ispitivanje tkiva primarnog tumora ili metastaze svetlosnim mikroskopom sa ili bez dodatne imunohistohemijske analize i elektronske mikroskopije. Kod bolesnika sa diseminovanim bolešću, kada inicijalno nije moguća hirurška intervencija, prema internacionalnim dijagnostičkim kriterijumima za neuroblastom (International

Neuroblastoma Diagnostic Criteria, INDC) za postavljanje dijagnoze NB dovoljno je prisustvo ćelija neuroblastoma u koštanoj srži, u vidu rozeta, uz nalaz povišenih koncentracija metabolita kateholamina u urinu (9, 10). Za planiranje terapije, posebno kod dece mlađe od 2 godine, neophodno je biopsijom obezbediti adekvatnu količinu tkiva za histopatološku dijagnostiku i određivanje genetičkih markera. Uzorak koštane srži sa jasnom tumorskom infiltracijom često je dovoljan za postavljanje dijagnoze i izvođenje potrebnih genetskih analiza, pa kod dece starije od 2 godine sa metastatskom bolesti ponekad nije neophodna biopsija primarnog tumora (11, 12).

Za procenu stadijuma bolesti i određivanje grupe rizika, neophodno je uraditi ultrazvučni pregled primarne lokalizacije tumora, kompjuterizovanu tomografiju ili magnetnu rezonancu primarne lokalizacije i scintigrafiju meta-jod-benzil-gvanidinom (MIBG, I-131 ili I-123) (Slika 2). Ako je MIBG negativan ili je prethodno uklonjen primarni tumor potrebno je uraditi scintigrafiju skeleta. Aspiraciju koštane srži treba uraditi sa dva do četiri mesta, a biopsiju koštane srži sa dva mesta kod svih bolesnika (5, 7).



Slika 2 A) Kompjuterizovana tomografija abdomena: u levom retroperitoneumu se uočava velika tumorska masa koja prelazi medijalnu liniju i obuhvata aortu; B) Meta-jod-benzil-gvanidin: vezivanje radiofarmaka u levoj nadbubrežnoj žlezdi i u brojnim metastazama u kostima

1.1.4. Tumorski markeri

Neuroblastom je jedan od tumora dečjeg doba kod kojih tumorski markeri imaju značajnu ulogu u dijagnostici, prognozi i praćenju toka bolesti. Referentne vrednosti za

tumorske markere zavise od uzrasta, sa najvišim nivoom kod novorođenčadi i odojčadi. Najznačajniji markeri su:

- **Metaboliti kateholamina**, vanilmandelična kiselina (VMA) i homovanilinska kiselina (HVA), predstavljaju najsenzitivnije i najspecifičnije markere. Korisnost ovih markera u dijagnostici tumora je nesumnjiva, ali je ograničena kod ranog otkrivanja recidiva, s obzirom da samo 54% bolesnika ima povišene vrednosti ovih markera u trenutku ponovnog javljanja bolesti (13).

- **Neuron-specifična enolaza** (NSE) je marker koga sintetišu ćelije neuroblastoma ali i drugih neuroektodermalnih tumora. NSE je za NB manje specifičan marker od metabolita kateholamina, ali je u odnosu na njih bolji prognostički pokazatelj (13).

- **Feritin** nije specifičan marker za neuroblastom ali povišene vrednosti posle postizanja remisije ukazuju na mogući recidiv bolesti.

- **Laktat dehidrogenaza** (LDH) se u više studija pokazala kao značajan marker nezavisan od stadijuma, uzrasta i drugih faktora (14, 15, 16), a čije povišene vrednosti posle postizanja remisije pobuđuju sumnju na recidiv bolesti.

- **Drugi** markeri koji se koriste su hromogranin A čiji je serumski nivo povezan sa stadijumom bolesti i prognozom kod dece mlađe od godinu dana (17) i neuropeptid Y sa još uvek nedovoljno jasnim značajem.

1.1.5. Klinički stadijumi bolesti

U poslednjih dvadeset godina predloženo je nekoliko sistema za određivanje stadijuma neuroblastomske bolesti. Evansov sistem je zasnovan na kliničkim kriterijumima, a sistem Pedijatrijske onkološke grupe (Pediatric Oncology Group, POG) i TNM (tumor-node-metastasis) klasifikacija zasnovane su na hirurškim i patološkim karakteristikama tumora. Kako bi se prevazišao problem nejedinstvenih kriterijuma u određivanju stadijuma bolesti, grupe rizika i procene odgovora na terapiju, 1988. godine usvojen je Međunarodni sistem za određivanje stadijuma neuroblastoma (International Neuroblastoma Staging System, INSS), koji je dopunjen 1993. godine (18). Sistem je definisan kliničkim, hirurškim i patohistološkim karakteristikama tumora. INSS sistemom prihvaćeno je da su raširenost bolesti, utvrđena radiološkim i scintigrafskim

ispitivanjima, hirurška procena operabilnosti tumora i zahvaćenost limfnih čvorova i koštane srži dovoljni kao prognostički parametri (5, 7, 19, 20) (Tabela 1).

Tabela 1 Međunarodni sistem za određivanje stadijuma neuroblastoma, INSS

Stadijum	Opis
1	Lokalizovani tumor, kompletno odstranjen, negativni regionalni limfni čvorovi
2A	Lokalizovani tumor, nekompletno odstranjen, negativni limfni čvorovi sa iste i suprotne strane
2B	Lokalizovani tumor, kompletno ili nekompletno odstranjen, pozitivni limfni čvorovi sa iste i negativni na suprotnoj strani
3	Neresektibilni tumor koji prelazi središnju liniju sa ili bez zahvatanja regionalnih limfnih čvorova ili medijalni tumor koji infiltriše bilateralne strukture ili zahvata limfne čvorove
4	Primarni tumor sa metastatskom diseminacijom u udaljene limfne čvorove, kosti, kožu, koštanu srž, jetru i ostale organe
4S	Lokalizovani primarni tumor koji se širi u jetru, kožu ili koštanu srž (manje od 10% ćelija) kod mlađih od 1 godine

Međunarodna grupa za procenu rizika od neuroblastoma (International Neuroblastoma Risk Group, INRG), imajući za cilj da olakša poređenje rezultata lečenja različitim terapijskim protokolima, septembra 2005. godine, sačinila je novi sistem za procenu stadijuma bolesti (International Neuroblastoma Risk Group Staging System, INRGSS) zasnovan na radiološki definisanim faktorima rizika (Image-Defined Risk Factors – IDRF) i lokalizaciji tumora (20) (Tabela 2).

Tabela 2 Sistem za određivanje stadijuma neuroblastoma, INRGSS

Stadijum	Opis
L1	Lokalizovani tumor koji ne zahvata vitalne strukture i ograničen je na jedan region
L2	Lokalizovani tumor sa prisutnim jednim ili više IDRF
M	Tumor sa udaljenim metastazama
MS	Primarni tumor (L1 ili L2) kod dece mlađe od 18 meseci sa metastatskim depozitima u jetri, koži i/ili koštanoj srži.

IDRF- radiološki definisani faktori rizika

1.1.6. Lokalizacija primarnog tumora i metastaza

Primarni neuroblastom se može javiti na svim mestima gde su anatomski prisutne simpatičke ganglije i paraganglije, praktično duž celog paravertebralnog simpatičkog lanca, u meduli nadbubrega, Zuckerkandl-ovom organu i stelatnom ganglionu na produžecima sedmog vratnog pršljena. Najčešća primarna lokalizacija je nadbubrežna žlezda. Iako nije jasno da li je mesto pojavljivanja primarnog tumora povezano sa njegovim biološkim ponašanjem, uočava se da je lokalizacija u vratu retko povezana sa metastazama i da se češće javlja u stadijumima 1-3 i 4S. Nasuprot tome u skoro 90% metastatskih tumora primarno mesto je trbuh (1, 2, 7).

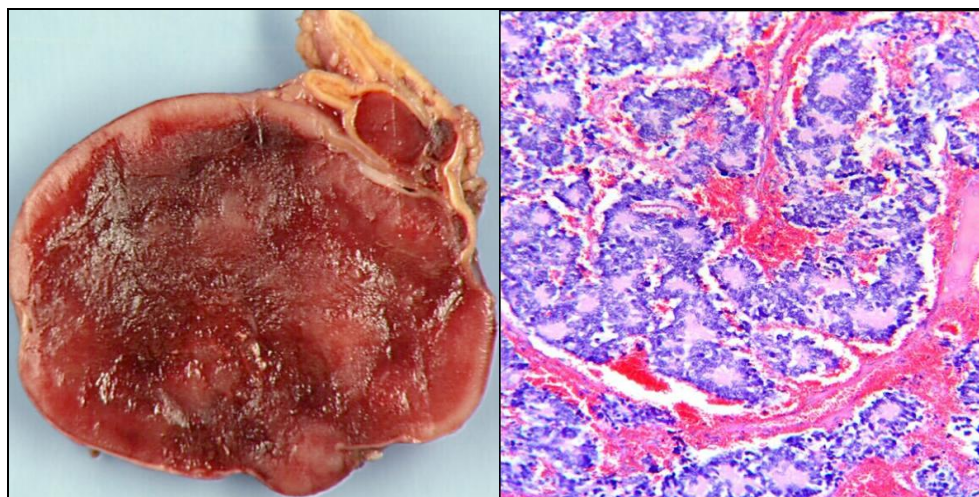
Metastaze neuroblastoma se mogu javiti bilo gde u organizmu i njihov raspored ne pokazuje pravilnost. Ipak, kod tumora u 4. kliničkom stadijumu metastaze su prisutne u kostima, koštanoj srži i limfnim čvorovima, dok su u 4S stadijumu zahvaćeni jetra, koža i koštana srž (dozvoljeno je <10% tumorskih ćelija) (1, 2, 7). Po definiciji odojčad u stadijumu 4S nemaju zahvaćene kosti.

1.1.7. Patohistološke osobine neuroblastnih tumora

1.1.7.1. Makroskopski izgled

Neuroblastni tumori se najčešće prezentuje kao solidna, ovalna ili multinodularna masa sa značajnim varijacijama shodno lokalizaciji, patološkom tipu i sekundarnim promenama. Multifokalni i bilateralni tumori su neuobičajeni. Tamnocrvena hemoragična masa sa ili bez fokusa sivo-belog tkiva je najčešći makroskopski izgled (Slika 3) ali se može javiti i kao sivkastobelo tkivo, svetle mukoidne površine. Najveći broj tumora je između 6 i 8 cm najvećeg promera (21). Predominantno hemoragični tumori su najčešće građeni od slabodiferentovanih neuroblasta sa malo ili u potpunosti bez strome. Značajna količina strome ili fibrilarne komponente je prisutna kod tumora sa uniformnim sivkastim izgledom. Tačkaste ili krupnozrnaste kalcifikacije kao i žućkasta polja koagulacione nekroze su sledeće relativno česte makroskopske osobine. Sitni fokusi kalcifikacija, neprimetni kod makroskopskog pregleda, se mogu naći u određenom procentu pri mikroskopskoj

analizi. Gusta fibroza, sa ili bez kalcifikacija, se najčešće nalazi kod retroperitonealnih tumora, obično posle preoperativne terapije. Cistična degeneracija, sa ili bez krvarenja, može zahtevati uzimanje većeg broja isečaka da bi se identifikovali rezidualni fokusi tumorskog tkiva. Značajnu pažnju treba obratiti kod istovremenog prisustva sivkasto-belih polja koja najčešće odgovaraju stromom bogatim delovima i hemoragičnih nodusa koji su češće građeni od neuroblasta pa zajedno predstavljaju nodularni oblik GNB.



Slika 3 Makroskopski i mikroskopski izgled u celini reseciranog NB nadbubrežne žlezde

1.1.7.2. Mikroskopski izgled

Neuroblastni tumori su građeni od jedne, dve ili više komponenti u koje spadaju nediferentovani neuroblasti, neuropil, diferencirajući neuroblasti, ganglijske ćelije, zreli neuritski produžeci, Schwann-ove ćelije i vezivno tkivo (22). Tumorske ćelije formiraju tipične Homer-Wright-ove pseudorozete (Slika 3) oko centralnog fibrilarnog materijala, neuropila. Neuropil je acelularan i pozitivan na imunohistohemijsko bojenje S-100 antitelom. Zajedno sa neuropilom stromu tumora čine Schwann-ove ćelije, takođe S-100 pozitivne, koje u vidu gustih traka okružuju grupe tumorskih ćelija. Opšte je prihvaćeno da su Schwann-ove ćelije sastavni deo tumora, ali ne produkt neuroblastne diferencijacije (23). Mitotska aktivnost je povezana sa diferencijacijom i niža je u tumorima bogatijim stromom i tumorima čije ćelije pokazuju sinhronu diferencijaciju citoplazme i jedra (24).

Ultrastrukturne osobine neuroblastnih tumora uključuju prisustvo gustih neurosekretornih granula, neuralnih tubula i neurofilamenata, a neuroblastne ćelije mogu imati međućelijske veze koje podsećaju na sinapse i razlikuju se od dezmozoma (25).

Imunohistohemijska bojenja su od pomoći kada se radi o maloj biopsiji nediferentovanog ili slabo diferentovanog sitnoćelijskog tumora. Neuroblasti su uglavnom nereaktivni na bojenje vimentinom za razliku od rabdomiosarkoma i Ewing sarkoma. Neuropil se pozitivno boji vimentinom i S-100 proteinom, a NB84, Chromogranin, Synaptophysin i NSE su pozitivni u tumorskim ćelijama (26).

Vremenom su se razvijali različiti sistemi patohistološke klasifikacije NT-a, međusobno dopunjavali i popravljali sa osnovnim ciljem da pruže što bolju prognostičku informaciju koja će omogućiti najefikasniji pristup u terapiji. Danas u upotrebi je internacionalna patološka klasifikacija (International Neuroblastoma Pathology Classification, INPC) iz 1999. godine (22, 27), dopunjena 2003. godine (28).

1.1.7.3. Internacionalna patološka klasifikacija

Međunarodna inicijativa za određivanje jedinstvenih dijagnostičkih i prognostičkih patohistoloških kriterijuma za neuroblastne tumore pokrenuta je 1988. godine, a 1994. godine formiran je Internacionalni komitet za patologiju neuroblastoma koji je 1999. godine objavio Internacionalnu patološku klasifikaciju. INPC je klasifikacija koja je usvojila, sa nekim modifikacijama, klasifikacionu šemu koju je predložio Shimada sa saradnicima 1984. godine (29). Ova šema je zasnovana na morfološkim promenama koje su udružene sa sazrevanjem, s obzirom da do sada nisu otkriveni pouzdani indikatori koji su povezani sa involucijom i spontanom regresijom neuroblastoma. Takođe, u razmatranje je uzeta i Joshi-jeva klasifikaciona šema (30) iz koje je, uz male izmene, prihvaćena terminologija.

Na osnovu ove klasifikacije neuroblastni tumori se dele na četiri bazične morfološke kategorije:

I Neuroblastom (NB) (ranije Schwann-ovom stromom siromašan) se definiše kao neuroblastomski, Schwann-ovom stromom siromašni tumor. Schwann-ove ćelije (ili njihovi prekursori) mogu biti detektovane kao S-100 pozitivne ćelije u delikatnim

fibrovaskularnim septama koje okružuju lobuluse neuroblastnih ćelija. Tumori koji pokazuju određeni stepen razvoja strome, posebno oni u kojima postoji neuroblastna diferencijacija, predstavljaju prelaz između stromom siromašnih i stromom bogatih tumora. Po definiciji procenat tumorskog tkiva stromom bogatog izgleda ne sme da prelazi 50% tumora.

- *Neuroblastom, nediferentovani podtip (UD)* je tumor kod koga je u dijagnostici potrebno upotrebiti dodatne tehnike kao imunohistohemiju, elektronsku mikroskopiju i/ili citogenetiku. Tumorske ćelije su u ovom podtipu nediferentovane i uglavnom male do srednje velike, sa nevidljivom ili u tankom sloju prisutnom citoplazmom i nejasno definisanom ćelijskom granicom. Jedra mogu varirati u obliku i veličini i karakteristično imaju izgled hromatina koji se opisuje kao so i biber i mogu sadržati jedarce. Neuropil (tanki nervni produžeci) je odsutan iako koagulaciona nekroza, fibrinska i kolagena vlakna mogu biti pogrešno proglašeni neuropilom.

- *Neuroblastom, slabo diferentovani podtip (PD)* se definiše kao tumor sa neuropilskom osnovom koja se lako uočava u tehnički zadovoljavajućim mikroskopskim uzorcima. Količina neuropila varira između mikroskopskih polja istog tumora, kao i između različitih tumora. Većina tumorskih ćelija u ovom podtipu izgleda nediferentovano, dok samo manje od 5% ćelija poseduje citomorfološke osobine diferenciranja ka ganglijskim ćelijama.

Ponekad je nediferentovani i slabo diferentovani podtip fokalno ili difuzno sastavljen od nediferentovanih ćelija sa krupnoćelijskim, vretenastoćelijskim ili pleomorfno-anaplastičnim izgledom. Ćelije su velike, pleomorfne, često bizarne i mogu imati veliko jedro sa jednim ili više jedaraca (30). Ove nediferentovane ćelije treba razlikovati od sazrevajućih i zrelih ganglijskih ćelija. Vrlo retko nediferentovane neuroblastne ćelije imaju rabdoidni izgled i imunohistohemijski ekspimiraju vimentin (31).

-*Neuroblastom, diferencirajući podtip (D)* je neuroblastni tumor koji najčešće ima dosta neuropila sa više od 5% tumorskih ćelija koje su u različitim fazama diferencijacije ka ganglijskim ćelijama (diferencirajući neuroblasti). Da bi neka tumorska ćelija mogla da bude proglašena diferencirajućom mora da ima sinhronu diferencijaciju jedra (uvećano, ekscentrično, sa vezikularnim hromatinom i uglavnom jednim, jasno uočljivim jedarčetom) i eozinofilne ili amfofilne citoplazme. Kao opšte pravilo je usvojeno da najveća dimenzija ćelije treba da bude više od dva puta veća od najvećeg dijametra

jedra. Količina neuropila, iako obično obilna u diferencirajućem podtipu, nije presudna za razlikovanje slabo diferencirano od diferencirajućeg podtipa, već je osnovni kriterijum procenat (manje ili više od 5%) sinhrono diferencirajućih tumorskih ćelija.

II Ganglioneuroblastom, intermiksni (iGNB), ranije Schwann-ovom stromom bogat, je neuroblastni tumor u kome procenat ganglioneuromske komponente prelazi 50% ukupnog volumena na mikroskopskim poljima reprezentativnih isečaka tumora. Dobro definisana mikroskopska ostrvca neuroblastnih ćelija su izmešana i bez pravila raspoređena u ganglioneuromskom tkivu i sastavljena od neuroblastnih ćelija u različitim fazama diferencijacije. Uglavnom dominiraju diferencirajući neuroblasti i zrele ganglijske ćelije, a pozadina je bogata neuropilom. Iako postoji variranje u veličini i broju ovih ostrvaca neophodno je da ona budu raspoznatljiva samo pri mikroskopskom, a ne i makroskopskom ispitivanju.

III Ganglioneurom (GN), ranije Schwann-ovom stromom dominantan čine:

- *Ganglioneurom, sazrevajući podtip* koji se sastoji predominantno od ganglioneuromske strome sa malom komponentom pravilno i nepravilno raspoređenih kolekcija diferencirajućih neuroblasta i/ili zrelih ganglijskih ćelija. Osnovna osobina ovog tipa tumora je da neuroblastomski fokusi ne smeju da formiraju mikroskopski jasna ostrvca, već samo pojedinačne neuroblastne ćelije izmešane sa ganglioneuromskom stromom.

- *Ganglioneurom, zreli podtip* gradi zrela Schwann-ova stroma i ganglijske ćelije. Fascikulusi neuritskih produžetaka sa Schwann-ovim i perineuralnim ćelijama su karakteristika ovog tumora. Kompletna zrelost podrazumeva potpuno odsustvo neuroblastomske komponente.

IV Ganglioneuroblastom, nodularni (nGNB), ranije mešovite zastupljenosti Schwann-ove strome, bogat/dominantan/siromašan, je tip čija je osnovna osobina prisustvo makroskopski raspoznatljivog, jednog ili više neuroblastomskih nodusa zajedno sa ganglioneuroblastomom intermiksno podtipa ili ganglioneuromom. Mikroskopski se uočava jasna granica ili čak fibrozna pseudokapsula između neuroblastomskog nodusa i drugih komponenti što je posledica ekspanzivnog rasta ove maligne komponente. One tumore kod kojih postoji ganglioneurom ili ganglioneuroblastom intermiksno podtipa u primarnom tumoru i neuroblastom u metastatskom tumoru treba klasifikovati kao nGNB. U dijagnostici ovog tipa NT

uzimanje limfnih nodusa sa iste i suprotne strane za histopatološku analizu ima presudan značaj.

Na osnovu histoloških osobina NT se svrstavaju u dve prognostičke grupe histološki dobre (favorable histology, FH) i loše (unfavorable histology, UH) prognoze (Tabela 3).

Tabela 3 Histološke prognostičke grupe po kriterijumima INPC klasifikacije

Uzrast (godine)	Tip tumora	Stepen diferencijacije	MKI	Prognostička grupa (FH/UH)
<1.5	NB	UD	Bilo koji	UH
<1.5	NB	PD ili D	Nizak/srednji	FH
<1.5	NB	UD, PD ili D	Visok	UH
1.5-5	NB	UD ili PD	Nizak	UH
1.5-5	NB	D	Nizak	FH
1.5-5	NB	D	Srednji/visok	UH
>5	NB	UD, PD ili D	Bilo koji	UH
Bilo koji	iGNB	/	/	FH
Bilo koji	GN	/	/	FH

MKI mitotsko-karioretski indeks, FH dobra prognoza, UH loša prognoza, NB neuroblastom, iGNB intermikсни ganglioneuroblastom, GN ganglioneurom, UD nediferentovan, PD slabo diferentovan, D diferencirajući

Nodularni GNB je bio tema dopune INPC klasifikacije (28), s obzirom da je primećeno da postoje značajne razlike u preživljavanju unutar ove grupe tumora (32). Prihvaćeni su kriterijumi koji se koriste u dijagnostici NB i primenjuju se na sve noduse NB tkiva prisutne i nGNB. Koriste se parametri diferencijacije, mitotsko-karioretskog indeksa (MKI) i uzrasta, na osnovu kojih se svaki pojedinačni nodus svrstava u grupu sa povoljnom (favorable nodus, FN) ili nepovoljnom (unfavorable nodus, UN) prognozom. Kada postoji više nodusa oni mogu biti u sledećim kombinacijama FN/FN, FN/UN, UN/UN. Prisustvo jednog ili više nodusa sa nepovoljnom prognozom svrstava nGNB u prognostički nepovoljnu grupu.

1.1.8. Genetičke karakteristike neuroblastnih tumora

1.1.8.1. Hereditarni neuroblastni tumori

Mala podgrupa neuroblastoma ima jasnu naslednu genetsku osnovu i predstavlja familijarne neuroblastome. Familijarni neuroblastom je prvi put opisan 1945. godine (33), a potom je opisano više porodica (34-36). Registrovano je pojavljivanje neuroblastoma kod pacijenata sa globalnim oštećenjem ćelija porekla neuralnog grebena (neurocristopathiae), kao što su Hirschprung-ova bolest i/ili kongenitalni centralni hipoventilacioni sindrom (37). Ti podaci sugerišu da geni uključeni u genuz Hirschprung-ove bolesti (*RET*, *EDNRB*, *EDN3*, *GDNF*, *ECE1* i *YFHX1B*) i centralnog hipoventilacionog sindroma (*RET*, *GDNF*, *EDN3*, *BDNF* i *PHOX2B*) mogu biti uključeni i u nastanak i razvoj neuroblastoma. *PHOX2B* je posebno interesantan jer su neke studije utvrdile postojanje germinativne mutacije ovog gena kod pacijenata sa NB (38-42). Takođe je utvrđen značaj *PHOX2B* gena kao specifičnog markera za određivanje minimalne rezidualne bolesti (43). Postoje i opisi istovremenog javljanja neuroblastoma i neurofibromatoze tip I (44, 45), kao i homozigotske inaktivacije *NF1* gena u primarnom neuroblastomu (46, 47). Sve to ukazuje da i *NF1* gen može biti uključen u nastanak NB.

Neuroblastom kao retinoblastom i Wilms tumor predstavlja embrionalnu neoplaziju koja može da se javi kao sporadična i kao hereditarna forma bolesti. Knudson i Strong su postavili prvu hipotezu o kancerogenezi neuroblastoma 1972. godine (34). Analizom strukture nasleđivanja dobijeno je poklapanje sa autozomno dominantnim tipom nasleđivanja sa nekompletnom penetrantnošću od 0.63. Shojaei-Brosseau sa saradnicima je, koristeći epidemiološki pristup, došao do podatka da svega 5 od 426 uzastopnih slučajeva neuroblastoma ima prvostepenog ili drugostepenog srodnika sa neuroblastomom (48). Svi ovi podaci ukazuju na to da je nasledni neuroblastom redak fenomen i da pedijatri mogu roditeljima pacijenata sa novootkrivenim neuroblastomom, posebno kada nema visokorizične multifokalnosti primarnog tumora, da saopšte da je rizik za razvoj neuroblastoma kod njihove druge dece vrlo mali.

1.1.8.2. Molekularno-genetičke osobine neuroblastoma

Do sada su se kao najznačajnije molekularno-genetičke osobine neuroblastoma izdvojile:

- *DNK ploidijska*

Brojni neuroblastomi imaju veću količinu DNK od normalne. Poremećaj DNK ploidnosti kod neuroblastoma može biti posledica bipolarne, tripolarne ili tetrapolarne deobe (49, 50). Zapaženi su prekobrojni centrozomi koji vode ka multipolarnoj deobi u različitim tipovima tumora, uključujući neuroblastom. Protočnom citometrijom može se lako odrediti količina DNK što kod neuroblastoma ima prognostički značaj, posebno kod bolesnika mlađih od 1 godine. Samostalan prognostički značaj količine DNK na ishod bolesti ostaje kontroverzan, ali se ona koristi kao parametar u stratifikaciji terapije za stadijume 3, 4 i 4S. U grupi neuroblastoma sa klinički dobrom prognozom je prisutna triploidija ili pentaploidija, dok su prognostički nepovoljni neuroblastomi najčešće diploidni ili tetraploidni i često su udruženi sa amplifikacijom *MYCN* gena, 1p delecijom i drugim aberacijama.

- *MYCN amplifikacija*

Minutna hromatinska telašca u neuroblastomskim ćelijama su prvi put otkrivena 1965. godine (danas se koristi termin dvostruki minutni hromozomi, double minutes, DMs) (51). Potom su otkriveni homogeno obojeni hromozomski regioni (homogeneously staining regions, HSR) (52). Otkriće retroviralnih onkogenih (v-onc) i njihovih ćelijskih homologa (c-onc), ranih osamdesetih, je dovelo do identifikacije mutiranih c-onc gena u ljudskim kancer ćelijama. U NB ćelijskim linijama je 1983. godine pokazana snažna ekspresija *MYC* gena. Porodicu *MYC* gena čine *MYC* (*c-MYC*), *MYCL* i *MYCN*, a daljim analizama NB je povezan sa promenama na *MYCN* genu (53, 54). *MYCN* je lociran na distalnom delu kratkog kraka hromozoma 2 (2p24). U ćelijama sa amplifikacijom *MYCN* se nalazi u formi DMs i HSR. Povećana ekspresija ovog gena doprinosi tumorskom ćelijskom rastu i snažno je povezana sa lošim ishodom (53, 55). Zbog toga identifikacija *MYCN* statusa kod neuroblastnih tumora, pre započinjanja terapije, predstavlja internacionalni klinički standard (55, 56). Amplifikacija *MYCN* gena je najznačajniji prognostički parametar nezavisan od stadijuma, uzrasta i drugih bioloških parametara (57-61). *MYCN* je protoonkogen koji je normalno eksprimovan tokom

razvoja nervnog sistema i njegov produkt je MYCN protein koji aktivira transkripciju tako što dimerizuje sa Max proteinom i dovodi do transkripcione aktivnosti. *MYCN* učestvuje u regulaciji genske transkripcije, ćelijskog ciklusa, metaboličkog reprogramiranja i mnogih drugih značajnih ćelijskih procesa (62). Amplifikacija *MYCN* gena dovodi do povećanja količine MYCN proteina koji formira heterodimer sa Max proteinom i deluje na promotor region preko CACGTG motiva aktivacijom transkripcije. U odsustvu MYCN-a, proteinski kompleksi Max/Max, Max/Mad i Max/Mxi1 deluju represivno na transkripciju. Prisustvo amplifikacije nađeno je u 16-30% neuroblastoma (63).

Iako je jasno da *MYCN* amplifikacija identifikuje grupu neuroblastoma visokog rizika, precizna uloga MYCN proteina ostaje kontroverzna. Neki neuroblastomi ekspimiraju visok nivo MYCN proteina bez amplifikacije gena (64, 65) što je pre posledica poremećaja normalnog procesa degradacije (64), nego gubitka *MYCN* transkripcione autoregulacije (66). Uz to, grupa tumora bez *MYCN* amplifikacije nije istovremeno i grupa sa obavezno povoljnom prognozom te su potrebni dodatni prognostički faktori koji bi pomogli dalju stratifikaciju bolesnika (59, 67). U istraživanju neuroblastoma nediferentovanog podtipa iz 2013. godine, Wang i saradnici su našli značajno bolje trogodišnje preživljavanje bez neželjenog događaja (event-free survival, EFS) u grupi *MYCN*-amplifikovanih (53.4%) nego u grupi *MYCN*-neamplifikovanih tumora (31.7%) (68). Primećeno je i da ekspresija MYCN proteina nije uvek u skladu sa *MYCN* amplifikacijom. Ređe su nađeni *MYCN*-amplifikovani tumori bez proteinske ekspresije (6%), a češće *MYCN*-neamplifikovani tumori sa MYCN proteinskom ekspresijom (21%). U tim tumorima prisustvo proteinske ekspresije je ukazivalo na lošiju prognozu (69). U prvim istraživanjima (68, 69) ekspresije MYC (c-myc) proteina u neuroblastnim tumorima utvrđeno je da je on parametar loše prognoze, a u studiji Wanga i saradnika dobijen je nezavisni prognostički značaj u grupi nediferentovanih i slabo diferentovanih neuroblastoma (70).

- 17q umnožavanje

Gilbert sa saradnicima je prvi identifikovao česte abnormalnosti dugog kraka hromozoma 17 (71), a kasnije je pokazano da umnožavanje genetskog materijala 17q predstavlja najčešću promenu kod primarnih neuroblastoma. Nebalansirana translokacija 1;17 je česta i najčešće dovodi do gubitka distalnog dela 1p sa posledičnim

povećanjem distalnog 17q materijala. Mesto prekida na 17q može biti različito, a komparativnom genomskom hibridizacijom je pokazano da 17q21-qter umnožavanje postoji u 50-75% primarnih neuroblastoma, pa ovaj region predstavlja najverovatniju lokaciju gena koji učestvuju u kancerogenezi neuroblastoma (72).

- 1p delecija

Koncept tumor supresorskih gena (TSG) je nastao tokom proučavanja retinoblastoma, zahvaljujući identifikaciji molekularnog puta nastanka retinoblastoma sukcesivnom inaktivacijom oba alela RB1 gena. Statistička analiza je ukazivala da bi genetski put od dva uzastopna događaja sličan onom kod retinoblastoma mogao da bude način nastanka i neuroblastoma (73). Napredak i razvoj identifikacionih tehnika doneo je brojne, nove informacije. Prvo sistemsko istraživanje hromozomskih alteracija povezanih sa neuroblastomom bilo je 1977. godine (74) kada je otkriveno, i u kasnijim studijama potvrđeno (75, 76), prisustvo hromozomske 1p delecije u značajnom broju neuroblastomskih ćelijskih linija kod primarnih tumora. Autori su tada pretpostavljali da bi 1p delecija kod neuroblastoma mogla biti prvi događaj u kancerogenezi, a drugi događaj tačkasta mutacija ili neka druga alteracija drugog alela. Urađen je veliki broj molekularnih analiza primarnih neuroblastoma koje potvrđuju gubitak heterozigotnosti (LOH) kod 19%-36% primarnih neuroblastoma (77-80). Brojni podaci postoje o tome da je više od jednog 1p lokusa zahvaćeno kod neuroblastoma, s tim da su prognostički lošiji oni tumori kod kojih je prisutna veća 1p delecija u odnosu na one sa kraćim segmentom delecije (81). Skoro svi neuroblastomi sa 1p delecijom imaju zahvaćen region koji uključuje distalni kraj 1p36.2 i ceo 1p36.3. Tumori sa većim 1p delecijama su udruženi i sa drugim, lošim, prognostičkim faktorima kao što su diploidija ili tetraploidija i *MYCN* amplifikacija, dok su tumori sa kraćim segmentom delecije povezani sa DNK triploidijom. Genomska kompleksnost 1p regiona i veliki broj njegovih delecija onemogućava identifikaciju neuroblastomskog TSG iako postoji veći broj kandidata tako da strukturne alteracije hromozoma 1 treba posmatrati zajedno sa genetskim promenama na drugim genomskim lokusima kao što su *MYCN*, 17q i diploidija/triploidija status. Nezavisni prognostički značaj 1p delecije ostaje kontroverzan, ali su retrospektivne studije dečje kancer grupe (Children's Cancer Group, CCG) pokazale da 1p36 LOH ukazuje na smanjenje EFS dok ne utiče na ukupno preživljavanje (overall survival, OS) (82, 83). Zaključak je da se 1p LOH analizom

mogu identifikovati pacijenti kod kojih postoji veća verovatnoća za pojavu relapsa bolesti.

- 11q delecija

Citogenetskim analizama je pokazano da se u 15% neuroblastoma detektuje 11q delecija (84, 85). U LOH studijama, 11q gubitak se uočava u 5-32% tumora (86, 87). Gubitak celog hromozoma 11 izgleda da je snažno povezan sa tumorima bolje prognoze, dok je nebalansirana delecija 11q uglavnom detektovana kod tumora višeg stadijuma (84, 88, 89). Konstitucionalni rearanžman 11q je primećen u nekim neuroblastomima uključujući deleciju 11q23-qter, balansiranu translokaciju 11q21 i 11q22 i inverziju 11q21-23. Uloga ovih promena nije jasna, ali postoje spekulacije da oštećenje jednog ili više 11q gena može da predisponira razvoj neuroblastoma. Interesantno je da promene 11q skoro nikada nisu viđene u tumoru sa *MYCN* amplifikacijom iako su snažno povezane sa drugim visokorizičnim osobinama kao uznapredovali stadijum, stariji uzrast i prognostički loša histopatologija, te je 11q23 status svrstan u nove INRG faktore rizika (59, 90).

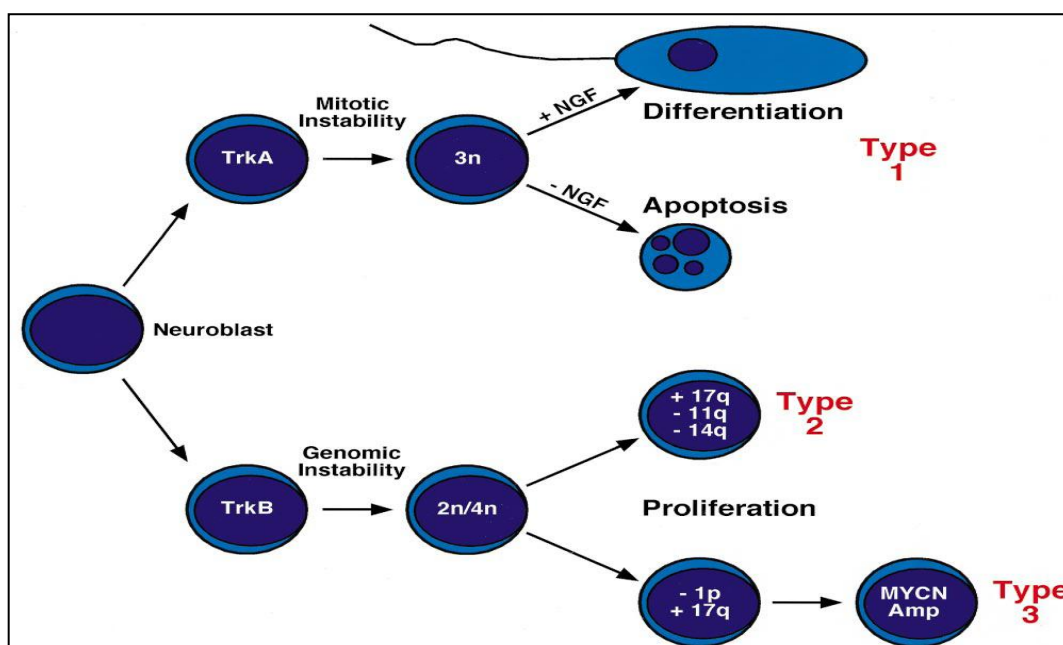
- Druge promene

Komparativna genomska hibridizacija (CGH) obuhvata uporednu analizu različito obeležene tumorske i normalne DNK. Ovom metodom se kvantitativno detektuju hromozomske promene, kao što su delecije, duplikacije ili amplifikacije. Prednost ove metode je da se u jednom eksperimentu mogu u potpunosti detektovati sve kvantitativne genomske promene. U cilju unapređivanja ove tehnike formiran je "array CGH" (91, 92). Obe metode (CGH i array CGH) su potvrdile prethodne citogenetske i LOH studije konstatujući visoku učestalost 1p, 11q i 14q delecije, nešto manju frekventnost 3p, 4p, 5q, 9p i 18q delecije, kao i visoku učestalost 2p i 17q umnožavanja (gain) (87, 93-96) i ukazuju na prognostički značaj velikog broja genskih promena.

- Neurotrofinski signalni put

Imajući u vidu značajnu ulogu neurotrofinskog signalnog puta u normalnom razvoju nervnog sistema razumljivo je značajno interesovanje za postojanje alteracija ovog puta u neuroblastomskoj malignoj transformaciji. Neurotrofini obuhvataju nervni faktor rasta (nerve growth factor, NGF), neurotrofni faktor moždanog porekla (brain-derived neurotrophin factor, BDNF), neurotrofin-3 i neurotrofin-4. Neurotrofinski signalni put se uglavnom odvija uz pomoć porodice tirozin kinaza (Trk) i do sada su identifikovana

tri receptor gena u neuroblastomu (*TRKA*, *TRKB* i *TRKC*). TrkA ima visoki afinitet za NGF, TrkB vezuje BDNF i neurotrofin-4, a TrkC je receptor za neurotrofin-3. Aktivacija TrkA vodi ka preživljavanju i diferencijaciji, dok inhibicija TrkA može dovesti do programirane ćelijske smrti. Uz to prisustvo i odsustvo NGF ima snažan uticaj na ekspresiju TrkA. Visok nivo ekspresije TrkA korelira sa mlađim uzrastom u trenutku postavljanja dijagnoze, nižim stadijumima i odsustvom *MYCN* amplifikacije i predstavlja prognostički dobar parametar (97-99). Ovakvi podaci sugerišu da TrkA/NGF put može imati značajni uticaj na sposobnost nekih neuroblastoma da se diferenciraju ili regrediraju. NGF aktivacija TrkA receptora utiče na preživljavanje neuroblasta i njihovu diferencijaciju u ganglijske ćelije (Slika 4). Stimulisani neuroblasti pokreću proliferaciju Schwann ćelija (stromalnih ćelija), koje potom proizvode neurotrofne faktore koji izazivaju neuroblastnu diferencijaciju. S druge strane neurotrofna deprivacija vodi u programiranu ćelijsku smrt. Normalni simpatički neuroni isto kao i neuroblastomske ćelije u kulturi umiru brzo u odsustvu NGF. Nasuprot ovome TrkB je snažno povezan sa agresivnim tumorskim ponašanjem i *MYCN* amplifikacijom (Slika 4).



Slika 4 Hipotetički model genetskih događaja u nastanku neuroblastoma

(preuzeto iz Maris and Matthay, 1999)

Aktivacija TrkB/BDNF puta utiče i na povećanu otpornost na hemioterapijske lekove, tako da bi ciljana inhibicija ovog signalnog puta mogla doneti bolje terapijske rezultate. TrkC ekspresija postoji u delu tumora koji istovremeno ekspimiraju TrkA i ova dva signalna puta zajednički vode ka diferencijaciji ili programiranoj ćelijskoj smrti.

Još jedan transmembranski neurotrofni receptor p75 poseduje mali afinitet za vezivanje svih neurotrofina i njegova ekspresija u neuroblastomu je generalno povezana sa povoljnim ishodom, ali njegov biološki i prognostički značaj još nije jasan (100).

1.1.9. Prognostički parametri neuroblastnih tumora

Zbog različitog biološkog ponašanja neuroblastnih tumora, a u cilju adekvatnog lečenja, neophodna je procena rizika od lošeg ishoda kod ovih bolesnika. Tokom proteklih decenija koristili su se različiti prognostički sistemi i vremenom se ukazala potreba za uniformisanjem grupa rizika i terapija kako bi se poboljšali protokoli i povećala uspešnost lečenja. Godine 2004., sastali su se predstavnici Grupe za dečju onkologiju (Children Oncology Group, COG) iz Severne Amerike i Australije, Nemačke pedijatrijske grupe za onkologiju i hematologiju (German Pediatric Oncology and Hematology Group, GPOH), Japanske studijske grupe za uznapredovali neuroblastom (Japanese Advanced Neuroblastoma Study Group, JANB), Japanske kooperativne studijske grupe za neuroblastome odojčadi (The Japanese Infantile Neuroblastoma Co-operative Study Group, JINCS), Evropskog međunarodnog udruženja za pedijatrijsku onkologiju neuroblastoma (SIOPEN) i eksperti za NB iz Kine i postigli dogovor o formiranju Međunarodne grupe za procenu rizika od neuroblastoma (International Neuroblastoma Risk Group, INRG). Zajednički kriterijumi su usvojeni 2009. godine i prema INRG proceni rizika, zasnovanoj na uzrastu bolesnika, stadijumu bolesti i biološkim karakteristikama tumora, bolesnici oboleli od NB mogu se svrstati u četiri grupe: grupa vrlo niskog, niskog, srednjeg i visokog rizika (Tabela 4).

Pored prognostičkih parametara uključenih u INRG klasifikaciju, klinički prognostički parametar je i stadijum bolesti. Loš ishod bolesti je povezan sa prisustvom *MYCN* amplifikacije i 11q aberacija, ali i sa gubitkom heterozigotnosti u 1p36 lokusu (oko 35% bolesnika). Hiperdiploidija kod odojčadi je dobar prognostički parametar, dok kod dece uzrasta preko dve godine nema prognostički značaj (101, 102). Visoka ekspresija TrkA i

TrkC viđa se kod NB sa povoljnim ishodom, dok je ekspresija TrkB povezana sa lošijom prognozom.

Tabela 4 INRG klasifikaciona šema za određivanje rizične grupe NT

INRG stadijum	Uzrast (meseci)	Histolški tip	Tumorska diferencijacija	<i>MYCN</i>	11q aberacija	Ploidija	Stepen rizika
L1/L2		GN, iGNB					A Vrlo niskog
L1		Bilo koji izuzev GN, iGNB		NA			B Vrlo niskog
				Amp			K Visokog
L2	<18	Bilo koji izuzev GN, iGNB		NA	Ne		D Niskog
					Da		G Srednjeg
	≥18	nGNB, NB	Diferencirajući Slabo diferentovan/ nediferentovan	NA	Ne		E Niskog
					Da		H Srednjeg
				Amp		N Visokog	
M	<18			NA		Hiperdiploidni	F Niskog
	<12			NA		Diploidni	I Srednjeg
	12 do 18			NA		Diploidni	J Srednjeg
	<18			Amp			O Visokog
	≥18						P Visokog
MS	<18			NA	Ne		C Vrlo niskog
					Da		Q Visokog
					Amp		R Visokog

GN-ganglioneurom, iGNB-intermiksni ganglioneuroblastom, NB-neuroblastom, NA-*MYCN* neamplifikovan, Amp-*MYCN* amplifikovan

Kod NB visokog rizika prisutna je visoka ekspresija telomeraze i veoma niska ekspresija ćelijskog površinskog CD44 (9, 102). Analizom bioloških prognostičkih parametara omogućena je podela NB na biološko-kliničke tipove i grupe rizika, što je posebno značajno pri donošenju odluke o primeni terapije (1, 59). Danas u zvaničnoj upotrebi je INRG klasifikacioni sistem (Tabela 4) (59).

1.2. AUTOFAGIJA

Autofagija je katabolički proces koji učestvuje u održavanju intracelularne homeostaze i pomaže ćelijsko preživljavanje u uslovima stresa i čini je lizozomska degradacija citoplazmatskih sastojaka sa recikliranjem aminokiselina i energije (103, 104). Autofagija je uključena u mnoge aspekte ljudskog organizma kako zdravog tako i bolesnog (104-106). Posebno je značajna uloga koju autofagija igra u nastanku tumora i rezistenciji tumorskih ćelija na različite oblike antitumorske terapije (105, 107). U ranoj tumorogenezi autofagija ima tumor supresorsku ulogu tako što promoviše genomsku stabilnost i inhibira inflamaciju (107). Potom, kako tumor raste, kancerske ćelije autofagiju koriste da prežive nedostatak nutrijenata i kiseonika, posebno u centralnim delovima tumora koji su obično lošije vaskularizovani, tako da ona tada učestvuje u podsticanju tumorske progresije (104, 107, 108).

Autofagija je otkrivena 1954. godine, kada je Johannes Rhodin, posmatrajući tubularne epitelne ćelije mišjih bubrega transmisionim elektronskim mikroskopom (TEM), opisao membranom oivičena citoplazmatska tela unutar kojih su se nalazile mitohondrije (109). Christian de Duve, dobitnik Nobelove nagrade za medicinu i fiziologiju za rad na otkriću lizozoma i peroksizoma (110, 111), je prvi upotrebio termin "autofagija" 1963. godine (112,113). Reč autofagija potiče od grčkih reči "auto" (sebe) i "phagy" (jesti) (104). Pomoću hidrolitičkih enzima u lizozomima dolazi do razgradnje, kako egzogenih substanci, unetih fagocitozom (heterofagija), tako i endogenih substanci (autofagija) (114 - 116).

1.2.1. Tipovi autofagije

Autofagija je katabolički proces koji razgrađuje sastavne delove ćelije kao što su citosol, agregati proteina, ćelijske organele (104), ali i patogene dospеле iz spoljašnje sredine kao što su virusi (117, 118) i neke bakterije (119, 120). Razgradnja ovih makromolekula, molekularnih kompleksa, organela i mikroorganizama, u okviru autofagije, odvija se uz pomoć lizozomnih enzima. U zavisnosti od toga na koji način se ovaj proces odvija, razlikujemo tri tipa autofagije: autofagija posredovana šaperonima (chaperon mediated autophagy, CMA), mikroautofagija (MI) i makroautofagija (104).

Autofagijom posredovanom šaperonima u lumen lizozoma se unose citosolni proteini koji u svom lancu aminokiselina poseduju specifičnu pentapeptidnu, KFERQ ili njoj sličnu, sekvencu. U prepoznavanju ove sekvence učestvuju citosolni šaperoni, nakon čega dolazi do prelaza ovih proteina u lumen lizozoma (121).

U mikroautofagiji, sadržaj se unosi u lumen lizozoma tako što se deformiše lizozomalna membrana i formiraju vezikularne ili tubularne strukture koje prominiraju u lumen lizozoma (122). Ovaj proces je detaljno opisan kod eukariota, a još uvek nedovoljno kod sisara (123, 124).

Makroautofagija, u daljem tekstu autofagija, je tokom evolucije visoko konzerviran proces i javlja se od gljivica do ljudskih bića. Autofagiju karakteriše odvajanje delova citoplazme, uključujući i organele, od ostatka ćelije dvostrukom membranom autofagozoma, posle čega se autofagozom spaja sa lizozomima i sadržaj razlaže lizozomalnim enzimima (125). Autofagija se u ćelijama odvija i u bazalnim uslovima, kada obezbeđuje održavanje ćelijske homeostaze. Posebno je stimulisana pod uticajem faktora ćelijskog stresa kao što su nedostatak hranljivih materija, različita patološka stanja (nakupljanje agregata proteina, oštećenje mitohondrija, invazija ćelije od strane mikrobioloških agenasa) ili tretmani farmakološkim preparatima kao što je rapamicin (104). Prvo se smatralo da je autofagija neselektivan proces, koji nasumice odvaja delove citoplazme od ostatka ćelije (126). Danas se zna da postoji više oblika selektivne autofagije, tako da razlikujemo selektivnu autofagiju proteinskih inkluzija (agrefagija), peroksizoma (peksofagija), mitohondrija (mitofagija), bakterija i virusa (ksenofagija), delova endoplazmatskog retikuluma (ER) (retikulofagija, ER-fagija), ribozoma (ribofagija) (112, 126, 127).

1.2.2. Proces autofagije

Tokom autofagije prvo dolazi do formiranja izolacione membrane (fagofore), izdužene cisterne ograničene membranom, čijim se daljim rastom i zatvaranjem slobodnih krajeva formira autofagozom (128). Nakon toga, novoformirani autofagozom se spaja sa lizozomima i nastaje autolizozom (128). Autofagozom se, ponekad, može prvo spojiti sa endozomom u amfizom, a potom spajanjem sa lizozomima nastaje autolizozom (128). Na konvencionalno pripremljenim preparatima za elektronsku

mikroskopiju (fiksacija u glutaraldehydu, kalupljenje u smolama) fagofora ima izgled cisterne koja je sa obe strane ograničena membranama, između kojih se nalazi prazan, svetao prostor u kome se ne može videti nikakav sadržaj (129). Ove membrane imaju trilamelarnu građu, tipičnu za sve membrane u ćeliji: dva spoljašnja, tamnija sloja između kojih se nalazi svetliji sloj (129). Kada se posmatraju preparati koji su pripremljeni drugačijom tehnikom obrade tkiva, kao što je kriofiksacija, između dve membrane fagofore ne primećuje se prazan prostor, već su one čvrsto priljubljene i fuzionisane u pentalaminarnu strukturu (129). Iz toga se zaključuje da je prazan prostor između dve membrane fagofore najverovatnije artefakt. Fagofore su često lokalizovane između cisterni granulisanog endoplazmatskog retikuluma (129, 130).

Na konvencionalno fiksiranim preparatima za elektronsku mikroskopiju i autofagozomi su ograničeni dvostrukom membranom (131). Tipično se između dve membrane vidi uzak, prazan prostor, sličan prethodno opisanom prostoru kod fagofore, što je jedan od kriterijuma za TEM identifikaciju autofagozoma (131). Drugi kriterijum za identifikaciju autofagozoma je da se u njegovom lumenu moraju nalaziti ostaci citoplazmatskog materijala (131) i njihova dimenzija se kreće od 300-400nm do nekoliko mikrometara (131). Do devedesetih godina dvadesetog veka proučavanje autofagije je bilo ograničeno na morfološke i biohemijske metode (125), a značajan napredak je nastao identifikacijom više od 30 gena uključenih u ovaj proces kod gljivice *Saccharomyces cerevisiae*, a potom i njihovih ortologa kod sisara (125). Od 2003. godine u upotrebi je jedinstvena nomenklatura za ove gene, koji se kod *S. Cerevisiae* označavaju skraćenicom ATG (autophagy-related gene) i odgovarajućim brojem (132-135).

1.2.2.1. Faza inicijacije

Formiranje izolacione membrane (fagofore) predstavlja fazu indukcije ili inicijacije (136). Kod gljivica mesto nastanka fagofore zove se preautofagozomalna struktura (PAS) i tu se nalaze ključne komponente sastavljene od Atg proteina (136, 137). U ćelijama sisara još uvek nije nađena PAS-u analogna struktura, već fagofore mogu nastati u različitim delovima ćelije, a česte su u neposrednoj blizini granulisanog endoplazmatskog retikuluma (112). Nije potpuno jasno šta predstavlja izvor membrane fagofore, niti da li su one stvorene „de novo“ ili se za njihovo formiranje koriste već

postojeće membrane različitih organela (mitohondrija, ER, Goldžijevog aparata, endozoma ili lizozoma) ili ćelijska membrana (112, 136).

Za formiranje autofagozoma neophodna je aktivnost fosfatidil-inozitol-3-kinaze (PI3K) klase III, Vps34 (104). Ova kinaza sa drugim proteinima u ćeliji gradi multimolekularne komplekse (PI3K komplekse) u čiji sastav, pored Vps34, ulaze i proteini Beclin 1/Atg6, Atg14L i p150/Vps15 (104). Od komponenti PI3K kompleksa I posebno je značajan Beclin 1, homolog Atg6 (138). Ovaj protein sadrži odgovarajuće domene koji služe za vezivanje drugih proteina, od kojih neki (ambra-1, UVRAG i bif-1) indukuju, dok drugi (Bcl-2, Bcl-XL) inhibiraju autofagiju (138).

Drugi makromolekularni kompleks uključen u fazu inicijacije je ULK1/2-Atg13-FIP200-ATG101 kompleks (139). ULK1 i ULK2 su homologni genu Atg1 (139). Ovaj kompleks je pod regulatornim uticajem serin/treonin protein kinaze koja predstavlja mesto za vezivanje rapamicina (mammalian target of rapamycin, mTOR) (104). Aktivnost ove kinaze i fosforilacija Atg13 i ULK1 koja se odvija u uslovima kada ćelija ima dovoljno nutrijenata, suprimira autofagiju (104).

Najnoviji podaci ukazuju na ulogu ER i mitohondrija u formiranju fagofora (136). Upotrebom 3D elektronske tomografije, pokazana je direktna povezanost membrane fagofore i membrana ER-a (140 - 142). Postoje i podaci o ulozi mitohondrija u stvaranju autofagozomalne membrane (143) i da ona može poticati od spoljašnje mitohondrijalne membrane, na kojoj su lokalizovani Atg5 i LC3 (143). Nedavno je otkriveno i da mesto kontakta između mitohondrija i ER-a (144) ima ulogu u ovom procesu, kao i da se Atg14L i drugi proteini uključeni u formiranje izolacione membrane, u uslovima gladovanja, lokalizuju isključivo u onim delovima membrane ER-a koji su u fizičkom kontaktu sa spoljašnjom membranom mitohondrija (145).

1.2.2.2. Faza elongacije

Posle faze inicijacije u kojoj dolazi do formiranja izolacione membrane, fagofore, dolazi do elongacije fagofore koja se odvija tako što druge organele doniraju delove svojih membrana (104). Jedan od proteina koji ima važnu ulogu u ovom procesu je Atg9, transmembranski protein koji se ciklično kreće od trans-strane Goldžijevog aparata do endozoma, i nazad, verovatno noseći sa sobom membrane za formiranje fagofore (146).

U proces elongacije fagofore uključene su dve hemijske reakcije slične reakcijama ubikvitinacije (104). Kao rezultat prve ovakve reakcije protein Atg12 se kovalentnom vezom spaja sa proteinom Atg5 (104). U reakciji učestvuju Atg7 (sličan E1 ubikvitin aktivirajućem enzimu), Atg12 i Atg10 (sličan E2 ubikvitin konjugazi) (104). U trećem koraku stvara se kovalentno vezan kompleks Atg12-Atg5 koji formira konjugat sa Atg16L1 (Atg12-Atg5.Atg16L1) (104).

Druga reakcija slična ubikvitinaciji uključuje mikrotubul-asocirani protein 1 laki lanac 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3, MAP1-LC3), poznat i samo kao LC3 (104). On postoji u dva oblika LC3-I i njegov proteolitički derivat LC3-II. LC3-I je lociran u citoplazmi, dok je LC3-II vezan za autofagozome (104). LC3-II ostaje vezan za membrane autofagozoma sve do fuzije sa lizozomima, kada se sa spoljašnje membrane autofagozoma, delipidacijom pomoću Atg4, oslobađa u citosol i reciklira (147), a LC3-II na unutrašnjoj membrani autofagozoma se razlaže u autolizozomu pod dejstvom lizozomalnih enzima (104). LC3-II predstavlja odličan marker za proučavanje autofagije (148).

1.2.2.3. Faza maturacije

Zatvaranjem fagofore oko materijala predviđenog za razgradnju formira se autofagozom (104). Prema nekim autorima, za ovaj proces neophodno je prisustvo STX17 proteina (SNARE protein) (145), dok su drugi zaključili da se STX17 uključuje u proces nešto kasnije, pri fuziji autofagozoma sa lizozomima (149). Autofagozomi se kod viših eukariota mogu formirati na bilo kom mestu u citoplazmi ćelije, u zavisnosti od toga gde se nalazi sadržaj predviđen za razgradnju (104). Autofagozomi se, kao i druge ćelijske organele, kreću po mikrotubulima, uz pomoć molekularnih motora dineina i kinezina i imaju tendenciju da se kreću ka centriolama, tj. mikrotubulskom organizacionom centru (MTOC) u čijoj blizini se nalazi najveći broj lizozoma (104). Autofagozomi se prvo spajaju sa endozomima gradeći amfizome, posle čega se spajaju i sa lizozomima (104). U fuziji autofagozoma i endozoma/lizozoma, kada nastaje struktura koja se označava kao autolizozom, glavnu ulogu imaju proteini kao što su SNARE proteini, ESCRT, Rab7 i Vps proteini klase C (104, 149). Po završetku fuzije, hidrolitički enzimi iz lizozoma razgrađuju autofagocitovani materijal (150). Produkti razgradnje prelaze iz lizozoma u citoplazmu, gde se recikliraju i ponovo ulaze u metaboličke puteve (150).

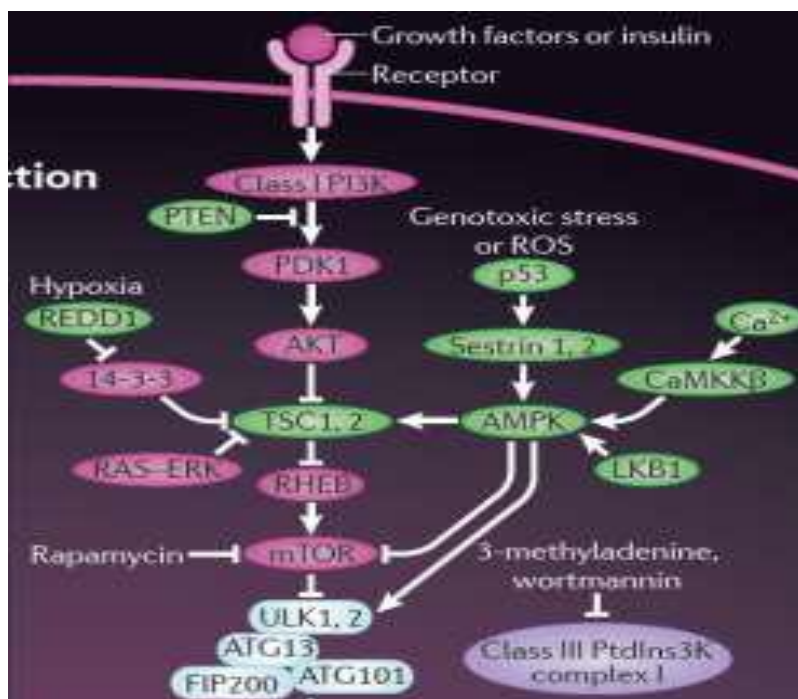
1.2.2.4. Restitucija lizozoma

U ćelijama u kojima je autofagija stimulisana nedostatkom nutrijenata, posle nekog vremena dolazi do ponovnog uspostavljanja homeostaze usled priliva produkata razgradnje ćelijskih makromolekula iz autolizozoma u citoplazmu (151, 152). Ovo je praćeno reaktivacijom mTOR kinaze, enzima koji ima ključnu ulogu u regulaciji autofagije i drugih procesa u ćeliji koji predstavljaju odgovor ćelije na dostupnost nutrijenata, dejstvo faktora rasta i prisustvo različitih faktora ćelijskog stresa (153). Reaktivacija mTOR-a dovodi prvo do stvaranja tubularnih struktura ograničenih membranom (proteolizozomalnih tubula) u kojima se ne detektuju lizozomalni ni autolizozomalni markeri (odsustvo lizozomalnih enzima, negativno bojenje Lysotracker-om) (151). Tek nešto kasnije, ove vezikule dobijaju sve uobičajene karakteristike lizozoma, i njihovom maturacijom obnavljaju se lizozomi u ćeliji, koji onda mogu da obavljaju svoje uobičajene funkcije (151). Ključnu ulogu u stvaranju proteolizozomalnih tubula imaju fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat koji se nalazi u njihovoj membrani i protein klatrin (152, 153).

1.2.3. Mehanizmi regulacije autofagije

Klasičan signalni put koji u ćelijama sisara reguliše autofagiju uključuje mTOR kinazu (104). U prisustvu faktora rasta, koji preko signalnih puteva kao što su PI3K-AKT-TSC1/2-RHEB (154) ili RAS-RAF-MEK-ERK-TSC1/2-RHEB (155) aktiviraju mTOR, dolazi do inhibicije autofagije tako što mTOR fosforiliše i inaktivira ULK1 (104) (Slika 5).

Ovi signalni putevi su takođe uključeni u regulaciju proliferacije ćelija, a njihove komponente su često mutirane u ćelijama humanih kancera (156). Osim faktora rasta, aktivnost autofagije je regulisana i sensorima energetskeg statusa u ćeliji kao što je AMPK, koja pri sniženim nivoima ATP-a u ćeliji inaktivira mTOR, omogućavajući autofagiji da se nesmetano odvija (157) (Slika 5). AMPK takođe direktno fosforiliše ULK1, Beclin1 i Vps34, promovišući autofagiju (158, 159).



Slika 5 Mehanizmi regulacije autofagije (pruzeto iz DJ Klionsky, 2011)

1.2.4. Alternativna makroautofagija

Opisan je i novi tip autofagije u ćelijama sisara, čiji su mehanizmi unekoliko različiti od prethodno opisanih (160). Ovaj tip autofagije je nazvan Atg5/Atg7 nezavisna alternativna makroautofagija (160). U klasičnoj autofagiji glavnu ulogu imaju dva makromolekularna kompleksa (PI3K kompleks I i ULK1/2 kompleks), Atg9, i dve ubikvitinaciji slične, Atg7 posredovane, hemijske reakcije (160). Utvrđeno je da u alternativnoj makroautofagiji ne učestvuju Atg5, Atg7 i konverzija LC3I u LC3II formu, kao ni Atg12, Atg16 ili Atg9 proteini, jer se u ćelijama poreklom od miševa kod kojih su ovi geni nedostajali (Atg5^{-/-} i Atg7^{-/-} miševi) ili je njihova ekspresija bila suprimirana, alternativna makroautofagija odvijala neometano (160). Sa druge strane, alternativna makroautofagija je onemogućena kao rezultat supresije gena za Beclin1, Vps34, ULK1 i FIP200, što ukazuje na ulogu PI3K kompleksa I i ULK1/2 kompleksa i u ovom tipu autofagije (160). Zapaženo je da se skoro sve autofagijske vakuole u alternativnoj autofagiji nalaze u blizini Goldžijevog aparata i da se neke izolacione membrane pružaju od njegovih cisterni (160).

1.2.5. Autofagija u malignim tumorima

Prvi podaci o vezi procesa autofagije i kancera potiču iz 1999. godine (161), kada je otkriveno da bi Beclin1 mogao biti haploinsuficijentni tumor supresorski gen (162). Jedna od dve kopije ovog gena nedostaje u 40-75% sporadičnih slučajeva humanih kancera jajnika, dojke i prostate (161, 162). Rezultati ispitivanja iz 2003. godine, pokazali su da miševi heterozigoti za Beclin 1 (beclin 1+/-) često razvijaju spontane tumore (163,164), kao i da miševi bez funkcionalnog gena za Beclin 1 (beclin 1-/-) umiru rano u toku embriogeneze (164). Tumor supresorska svojstva se pripisuju još nekim genima koji učestvuju u autofagiji, kao što su Atg4C (165), Bif-1 (166) i UVRAG (167). Uz to, produkti nekoliko tumor supresorskih gena ispoljavaju pozitivan uticaj na autofagiju, kao što su PTEN (168), DAPK (169, 170), TSC1, TSC2 i BH3-“only” proteini (171), dok neki onkogeni kao PI3K klase I, Akt, mTOR i Bcl-2 inhibiraju autofagiju (105, 171).

S obzirom da autofagija omogućava ćelijama recikliranje njihovih građivnih molekula i njihovu ponovnu upotrebu u proizvodnji energije i sintezi supstanci (150), ona omogućava preživljavanje ćelija, pa i tumorskih, u nepovoljnim uslovima (172, 173). Jedan od najjačih stimulusa za indukciju autofagije je gladovanje ćelije (150). Autofagija, takođe, ima ulogu u kontroli kvaliteta komponenti ćelije, razgrađujući oštećene ili nefunkcionalne organele, kao i agregate pogrešno savijenih proteina, čime se sprečava njihova akumulacija u ćeliji i aktivacija apoptoze (150). Autofagija se aktivira u malignim ćelijama, bilo zbog prebrzog rasta tumorske mase, koji ne prati odgovarajuća vaskularizacija (172), bilo zbog nepovoljne mikrosredine u kojoj se nalaze ćelije koje su metastazirale u novo, drugačije okruženje (174), bilo zbog stresa kome su ćelije izložene usled primene antitumorske terapije (175).

Dakle, autofagija ima dvostruku ulogu u tumorogenezi. U početku štiti zdravu ćeliju i kroz tumor supresorsku aktivnost čuva integritet genoma i ostalih komponenti ćelije (176, 177), a kasnije, kada je tumor već formiran, autofagija biva aktivirana najčešće pod uticajem hipoksije i gladovanja i tada omogućava preživljavanje malignih ćelija (107, 176).

1.2.5.1. Selektivna autofagija u malignim tumorima

U autolizozomima se uz pomoć elektronske mikroskopije mogu u nekim slučajevima prepoznati ostaci nekih organela, kao što su to mitohondrije i endoplazmin retikulum, kada takvu autofagiju označavamo kao selektivnu autofagiju (mitofagija, ER-fagija) (148).

- *Mitofagija*

Disfunkcionalne mitohondrije gube membranski potencijal na svojim unutrašnjim membranama, što dovodi do stabilizacije kinaze PINK1 (PTEN induced kinase type 1) na spoljašnjoj membrani mitohondrija (99, 100). PINK1 omogućava translokaciju E3 ligaze Parkin iz citosola na mitohondrije dovodeći do ubikvitinacije proteina spoljašnje mitohondrijalne membrane, što predstavlja signal za autofagiju mitohondrije (99, 100). U proteine na koje deluje Parkin spadaju i proteini mitofusin 1 i mitofusin 2, koji imaju ulogu u fuziji mitohondrija, pa bi njihova ubikvitinacija mogla da vodi ka fragmentaciji mitohondrija, te olakšanoj mitofagiji (178, 179). Ovo je u skladu sa zapažanjem da međusobna fuzija štiti mitohondrije od autofagozomalne degradacije u uslovima gladovanja, što im omogućava da u tim uslovima nesmetano obavljaju svoju glavnu funkciju, proizvodnju energije (180). Selektivno uklanjanje oštećenih mitohondrija obezbeđuje kontrolu kvaliteta mitohondrija i na taj način redukciju slobodnih radikala i oksidativnog stresa u ćeliji (178, 179, 181). Toksične posledice insuficijentne mitofagije mogu da doprinesu tumorogenezi (182). HDAC6 je protein koji se, sa jedne strane, vezuje za ubikvitinovane substrate, a sa druge, za dineinske motore i igra ulogu u transportu ubikvitinovanih mitohondrija duž mikrotubula u perinuklearne regione ćelije, gde će biti obuhvaćene dvostrukom membranom autofagozoma (183, 184). Takođe, ispitivanja TEM-om su pokazala da se oštećene mitohondrije grupišu u perinuklearnim regionima u vidu klastera (185, 186).

Gen koji kodira Parkin (PARK2) je tumor supresorski gen (187). Za razliku od gena za Beclin 1, PARK2 ispoljava pravi gubitak heterozigotnosti (loss of heterozygosity, LOH), koji je viđen u tumorima dojke i ovarijuma (187), nesitnoćelijskom karcinomu pluća (188), kao i kod hepatocelularnog karcinoma (189). Pretpostavlja se da i u patogenezi kolorektalnog karcinoma Parkin gen učestvuje kao haploinsuficijentni gen

(190). Parkin je doveden u vezu i sa nastankom hepatocelularnog karcinoma kada je u životinjskim modelima pokazano da Parkin-/- miševi oboljevaju od ovog tumora (191).

-Agregacija

Proteom svake ćelije se nalazi u stanju dinamičke ravnoteže, gde sa jedne strane, postoji stalna sinteza novih, a sa druge, razgradnja već postojećih ćelijskih proteina (192, 193). Većina ćelijskih proteina ima poluživot od samo nekoliko dana (192, 193), ali ima i onih kojima se poluživoti mere mesecima (194), a nedavno je pokazano prisustvo i ekstremno dugoživećih proteina, komponenti kompleksa nuklearne pore kod neurona pacova, koji se, jednom sintetisani, ne zamenjuju do kraja života ovih ćelija, ili se zamenjuju izuzetno sporo novim proteinima (194). Kontinuirani promet („turnover“) ćelijskih proteina, i selektivno uklanjanje oštećenih i pogrešno savijenih proteina, sprečava nakupljanje oštećenja u proteomu ćelije (195). Proteini mogu biti razgrađeni, a njihove aminokiseline reciklirane u proteazomima ćelije ili autofagijom (195). Autofagijom se selektivno razgrađuju kako solubilni proteini, tako i agregati proteina (126). Termin agresom označava bilo koji tip proteinskih agregata koji nastaju HDAC6 zavisnim transportom manjih ubikvitovanih agregata duž mikrotubula u region mikrotubulskog organizacionog centra (126). Veruje se da, nezavisno od autofagije, i ovo predstavlja protektivni mehanizam, jer je veći broj malih, difuzno raspoređenih agregata toksičniji za ćeliju od malog broja agresoma (126). Iako se substrati za autofagiju i za ubikvitin-proteazomalni sistem u određenoj meri poklapaju, smatra se da za degradaciju agresoma suštinski značaj ima autofagija, jer je za degradaciju putem ubikvitin-proteasomalnog sistema neophodno da proteini prethodno budu odvijeni iz svoje tercijarne/kvaternarne strukture (126). Za formiranje proteinskih agregata potreban je i p62 (196). U bazalnim uslovima unutarćelijski nivoi p62 su niski (182). Međutim, transkripcija p62 i nivoi p62 u ćeliji rastu kada je ćelija pod stresom (182). Ćelije se štite od oksidativnog stresa ne samo eliminacijom oštećenih mitohondrija, koje su izvor kiseoničkih slobodnih radikala (reactive oxygen species, ROS), mitofagijom, već i aktivacijom transkripcije gena koji kodiraju proteine važne za antioksidantnu odbranu (182). NRF2 je transkripcioni faktor koji aktivira ove gene (182). Vezivanje p62 za KEAP1 kompetitivno istiskuje NRF2 iz kompleksa, koji tada može da pređe u nukleus gde aktivira gene za antioksidantnu odbranu (182). Iako u normalnim uslovima aktivacija NRF2 može suprimirati nastanak tumora indukcijom gena za borbu protiv

oksidativnog stresa, paradoksalno, kod ćelija koje imaju defekte u autofagiji, NRF2 može promovisati kancerogenezu (182). Kod takvih ćelija dolazi do prekomernog nakupljanja p62, koji se ne razgrađuje, već se vezuje u agregate i promoviše aktivaciju NRF2 (182). Dakle, autofagija je potrebna da spreči nakupljanje p62 koji aktivacijom NRF2, a možda i drugim signalnim putevima, promoviše preživljavanje ćelija i tumorigenezu (182, 197, 198).

- ER- fagija

Za ispravno savijanje proteina u lumenu endoplazmatskog retikuluma (ER) su odgovorni proteini – šaperoni (199). Kada u fiziološkim ili patološkim uslovima mehanizmi koji obezbeđuju ispravno savijanje proteina budu nadvladani, u lumenu ER dolazi do nakupljanja pogrešno savijenih proteina i nastaje stanje koje se zove stres endoplazmatskog retikuluma (ER stres) (199). Ćelija na ER stres odgovara aktivacijom više signalnih puteva, kao što su odgovor na prisustvo pogrešno savijenih proteina (unfolded protein response, UPR), aktivacija autofagije i, kod prolongiranog stresa, apoptotsko umiranje (199). UPR je vođen aktivacijom tri transmembranska receptora na membranama ER: PERK, ATF6 i IRE (200). Prilikom ispitivanja ćelija u kulturi kod kojih je bio prisutan ER stres utvrđeno je da autofagija pomaže njihovo preživljavanje (201). Kako prolongiran ER stres vodi ka aktivaciji apoptoze, njegova indukcija je predložena kao potencijalni terapijski pristup za razvoj novih antitumorskih lekova (202, 203).

1.2.5.2. Ispitivanje autofagije u malignim tumorima

Upotrebom TEM-a moguće je vizualizovati sve glavne korake u procesu autofagije, od formiranja fagofore i njenog položaja u odnosu na druge organele u ćeliji, posebno u odnosu na ER, preko autofagozoma, ograničenih dvostrukom membranom i autolizozoma, nastalih posle fuzije sa endozomima i lizozomima, ograničenih jednostrukom membranom (128). Pre početka molekularne ere u istraživanju autofagije, i otkrića gena uključenih u ovaj proces kod gljivica, glavni metodološki pristup istraživanju autofagije podrazumevao je upotrebu TEM-a (130, 204). Danas se u ispitivanju autofagije pored elektronske mikroskopije koriste i imunološke (upotreba specifičnih antitela za vizualizaciju i kvantifikaciju specifičnih proteina), biohemijske

(ispitivanje autofagijskog fluksa u ćeliji) i genetske („knockout“, „knockdown“ i transfekcija gena) metode (205, 206). Takođe su u upotrebi i novije metode kao što su „Image stream“ (207), FRET i FRAP (208-300), kao i imunoelektronska mikroskopija (iTEM) (204) i 3D elektronska tomografija (140, 141). Nedavno je u upotrebu uvedena nova mikroskopska tehnika sa rezolucijom između svetlosne i elektronske mikroskopije, mikroskopija X-zracima (301). Ova tehnika omogućava vizualizaciju subcelularnih struktura bez upotrebe bojenja i ultratankog sečenja (204). S obzirom da je TEM, koji je još uvek zlatni standard za određivanje autofagije, nedovoljno dostupna tehnika, proučavane su druge, pristupačnije mogućnosti i pokazano je da imunohistohemijsko bojenje antitelom za mikrotubul-asociran protein 1 laki lanac 3 (LC3) može biti pouzdana tehnika za detekciju autofagozoma u tkivu, posebno tumorskim tkivima koja se čuvaju ukalupljena u parafinu u patološkim laboratorijama (302, 303).

1.2.5.3. Karakteristike autofagije u malignim tumorima

Uočeno je da postoji heterogenost u ispoljavanju morfoloških karakteristika autofagije u različitim tumorima, što je u skladu sa heterogenom biološkom prirodom samih tumora, ali i dvostrukom prirodom autofagije (177, 302). Istraživanja su pokazala da zbog defekta u autofagiji u matičnim ćelijama hematopoeze može doći do razvoja mijelodisplastičnog sindroma i akutne mijeloidne leukemije (305), tako što dolazi do nakupljanja oštećenih mitohondrija i umiranja velikog broja progenitorskih ćelija usled oksidativnog stresa i maligne transformacije preživelih ćelija (305). Neki lekovi koji se koriste u terapiji akutne limfocitne leukemije, kao što su kortikosteroidi, pored drugih efekata, aktiviraju i autofagiju koja doprinosi antileukemijskom efektu (306). Smatra se da u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji dolazi do defekta u procesu autofagije, tako što BCR-ABL protein, preko PI3K/AKT signalnog puta, dovodi do aktivacije mTOR-a i inhibicije autofagije (307). Nekoliko studija pokazalo je da inhibicija autofagije ima pozitivan efekat u terapiji hronične limfocitne leukemije (308-311). U Burkitt-ovom limfomu, u kome je deregulisan c-myc, javlja se ER stres koji aktivira autofagiju (312, 313). U difuznom krupnoćelijskom B limfomu inhibitori autofagije (hlorokvin), posebno kad se primene zajedno sa inhibitorima ubikvitin-proteasomalnog sistema, izazivaju smrt na apoptozu rezistentnih tumorskih ćelija (314). Različiti štetni faktori

aktiviraju autofagiju u epitelnim ćelijama pluća (315). Ispitivanja autofagije u maligno izmenjenim ćelijama pluća su do sada bila ograničena na eksperimente sa kulturama ćelija (315). Rezultati ovih ispitivanja su pokazali efikasnost inhibitora autofagije u promovisanju apoptoze (316-321). Indukcijom autofagije postignuta je senzitivnost, inače radiorezistentnih, ćelija humanog adenokarcinoma pluća na dejstvo jonizujućeg zračenja (322). S druge strane, objavljeni su i podaci o ulozi autofagije u promovisanju radiorezistencije malignih ćelija (323). Autofagija ima značajnu ulogu u razvoju i odgovoru na terapiju različitih tumora gastrointestinalnog trakta (324). U ćelijama karcinoma ezofagusa (325-328), želuca (329-334) i debelog creva (335-338) autofagija ima citoprotektivnu ulogu, a njena inhibicija promoviše dejstvo antitumorskih agenasa. Drugi autori su, pak, došli do zaključaka da autofagija kod ovih tumora ima ulogu u promovisanju antitumorskog efekta nekih lekova (339-341). U brojnim istraživanjima publikovano je da autofagija ima citoprotektivni efekat i u malignom melanomu (342-347), a autofagije je opisana i kod karcinoma prostate (348-359), kao i adenokarcinoma pankreasa (360).

1.2.5.4. *MYC* i autofagija

MYC gen predstavlja tokom evolucije konzerviran transkripcioni faktor, koji funkcioniše kao proto-onkogen i uključen je u procese ćelijskog rasta i proliferacije. Istovremeno *MYC* je fiziološki regulator autofagije kod *Drosophila melanogaster* (361). Gubitak *MYC* aktivnosti (null mutant) inhibira autofagiju. Pojačana ekspresija *MYC* aktivnosti kod *Drosophila* dovodi do povećanja ćelijski-nezavisnog rasta, indukcije autofagije i p62 posredovane aktivacije transkripcionog faktora (Nrf2) koji pokreće antioksidativni odgovor (361). Inhibicija autofagije u *MYCN* amplifikovanim ćelijskim linijama dovodi do povećanja apoptotske ćelijske smrti što sugerise ulogu autofagije u procesu preživljavanja tumorskih ćelija. S druge strane, inhibicija apoptoze ne utiče na nivo autofagije već samo na održavanje ćelijske viabilnosti (362). Pokazano je da povećana ekspresija i *MYC* (C-*MYC*) i *MYCN* proteina može dovesti do citoprotektivne autofagije (363). Više studija je došlo do zaključka da tumori sa visokom *MYC* ekspresijom aktiviraju autofagiju pomoću koje utiču na preživljavanje tokom tretmana različitim lekovima (364, 365). S druge strane, neke studije su pokazale

da je, u situacijama kada je nivo MYC-a bio povišen, došlo do smanjenja autofagije (366, 367), što sugerira da inaktivacija MYC-a može dovesti do povećanja autofagije.

Prva istraživanja ekspresije MYC i MYCN proteina na ćelijama neuroblastnih tumora ukazuju da bi oni mogli predstavljati novi biološko-prognostički marker (68-70). Istovremeno urađena su brojna ispitivanja procesa autofagije na neuroblastomskim ćelijskim kulturama ali ne i na biopsijskim uzorcima tumora, a nijedna studija se nije bavila ispitivanjem povezanost autofagije sa različitim tipovima neuroblastnih tumora kao ni njene povezanosti sa *MYCN* amplifikacijom i ekspresijom C-MYC i MYCN proteina.

Potpuno razumevanje veze autofagije i MYC-a je neophodno u procesu dizajniranja novih antitumorskih vidova terapije, posebno u ovom trenutku kada su modulatori i inhibitori autofagije u žiži interesovanja kao obećavajuća hemioterapijska strategija.

2. CILJ RADA

Ciljevi studije:

1. Ispitati da li postoji ekspresija MYCN i MYC proteina u ćelijama neuroblastnih tumora, ako postoji da li ima prognostički značaj i kakva je njena veza sa prognostički značajnim parametrima: uzrast, klinički stadijum bolesti (INSS), histološka prognostička grupa (INPC), *MYCN* amplifikacija, *1p* delecija, kao i mitotsko-karioretskim indeksom;
2. Ispitati i uporediti prisustvo autofagije u različitim tipovima neuroblastnih tumora, analizirati njen prognostički značaj i postojanje veze autofagije sa poznatim prognostičkim parametrima kod neuroblastnih tumora.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Bolesnici

Studijom preseka obuhvaćeno je 60 bolesnika sa neuroblastnim tumorom, kojima je patohistološka dijagnoza postavljena u Odeljenju za kliničku patologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“. Bolesnici su lečeni u Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“, Univerzitetskoj dečjoj klinici u Beogradu, Klinikama za dečje interne bolesti i dečju hirurgiju i ortopediju u Nišu i Institutu za zdravstvenu zaštitu dece i omladine u Novom Sadu.

Studija uključuje bolesnike sa neuroblastnim tumorom koji su dijagnostikovani i lečeni u periodu od 1. avgusta 1996. do 31. decembra 2015.

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u studiju bila je dostupnost kliničkih podataka o pacijentu, pločica i parafinskih kalupa sa uzorcima tkiva za ponovnu mikroskopsku i dodatnu imunohistohemijsku analizu, kao i na -80°C smrznutog, tumorskog tkiva za dodatnu elektronskomikroskopsku analizu.

Kao početna tačka praćenja uziman je datum operacije. Kao glavne konačne tačke u preživljavanju su uzimani datum poslednjeg pregleda ili smrtnog ishoda.

Stadijum bolesti je određivan prema kriterijumima INSS sistema, a na osnovu dostupne medicinske dokumentacije. Analizirani su, iz medicinske dokumentacije preuzeti, klinički podaci o uzrastu u trenutku postavljanja dijagnoze NT, polu, mestu primarne lokalizacije, raširenosti bolesti i preživljavanju bolesnika.

3.2. Histopatološka analiza

Po uzimanju biopsije ili, u celini ili delimično, resećiranog tumorskog tkiva, uzorci su fiksirani 24h u 4% pufersanom formalinu, zatim ispirani vodom i dalje dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije (od 70% do apsolutnog alkohola), da bi zatim bili lipofilizovani u ksilolu i potom kalupljeni u parafinu. Dobijeni parafinski kalupi su sečeni na standardnom mikrotomu na isečke debljine 3-5µm. Preseci su potom bojeni hematoksilin-eozin (HE) metodom (Tabela 5).

Tabela 5 Shematski prikaz recepture za HE bojenje

1	I ksilol	5 minuta
2	II ksilol	5 minuta
3	100% alkohol	3 minuta
4	100% alkohol	3 minuta
5	96% alkohol	3 minuta
6	70% alkohol	3 minuta
7	dobro isprati destilovanom vodom	
8	Mayer hematoksin	5 minuta
9	dobro isprati destilovanom vodom	
10	amonijačna voda	14 minuta
11	dobro isprati destilovanom vodom	uroniti 10 puta
12	Eosin (1% vodenio rastvor)	10-15 minuta
13	isprati dobro tekućom vodom	
14	70% alkohol	2 minuta
15	96% alkohol	2 minuta
16	100% alkohol	3 minuta
17	100 % alkohol	3 minuta
18	I ksilol	5 minuta
19	II ksilol	5 minuta
20	III ksilol	staviti i odmah pokrivati
21	obrisati i montirati pokrovno stakalce DPX-om	

Na HE obojenim preparatima postavljana je patohistološka dijagnoza neuroblastnog tumora, potom određivan tip i podtip tumora, kao i histološka prognostička kategorija. Histološki tip neuroblastnih tumora određivan je prema INPC histološkom sistemu za sve u studiju uključene pacijente na uzorcima primarnog ili metastatskog tumorskog tkiva. Za postavljanje dijagnoze nediferentovanog podtipa neuroblastoma bila je neophodna dodatna imunohistohemijska analiza u cilju diferencijalno dijagnostičkog razlikovanja neuroblastoma od ostalih dečjih tumora kao što su rabdomiosarkom, limfom, Ewing sarkom/PNET itd. U tu svrhu korišćena su različita antitela, a najčešće vimentin, CD99, LCA, desmin, myogenin, chromatogranin, synaptophysin i NB84. Određivanje podtipa i prognostičke kategorije NB bilo je moguće samo na uzorcima tumorskog tkiva pacijenata koji nisu primili preoperativnu hemioterapiju i koji su odgovarajuće veličine za procenu prognostičkih histoloških parametara. S obzirom da GN i iGNB po definiciji spadaju u dobru prognostičku grupu (FH), u nastavku analize određivana je prognostička grupa (FH/UH, povoljna/nepovoljna histološka grupa) za uzorke NB. U radu su procenjivani: prisustvo neuropilskog matriksa, procenat

diferencirajućih neuroblasta, gustina tumorskih ćelija i mitotsko-karioretski indeks (MKI). Registrovani su i podaci o dimenziji i masi dostavljenog uzorka tumorskog tkiva.

Gustina tumorskih ćelija je kategorisana kao oskudna (<300 tumorskih ćelija po jednom polju HPF), srednja (300-600 ćelija /HPF) i velika (>600/HPF).

MKI je klasifikovan kao nizak (< 100), srednji (100-200) i visok (> 200) i izražavan je na 5000 tumorskih ćelija. Metod za određivanje MKI obuhvata mikroskopsku procenu gustine tumorskih ćelija po polju velikog uvećanja (HPF), a potom određivanje prosečnog broja mitotsko-karioretskih ćelija u deset ili više slučajno izabranih polja velikog uvećanja. Pomoću podataka iz Tabele 6, određivan je MKI.

Tabela 6 Broj MKĆ po HPF u odnosu na gustinu tumorskih ćelija i kategorije MKI

Broj tu ćelije/HPF	Gustina ćelija	Broj MKĆ u kategorijama MKI		
		Nizak	Srednji	Visok
100	oskudna	<3	3-4	>4
200	oskudna	<5	5-8	>8
300	oskudna do umerena	<7	7-12	>12
400	umerena	<9	9-16	>16
500	umerena	<11	11-20	>20
600	umerena do gusta	<13	13-24	>24
700	gusta	<15	15-28	>28
800	gusta	<17	17-32	>32
900	gusta	<19	19-36	>36

MKI-mitotsko-karioretski indeks, MKĆ-mitotsko-karioretske ćelije, HPF-veliko mikroskopsko uvećanje (x400)

Na osnovu određenog tipa i podtipa tumora, MKI i uzrasta bolesnika određivana je histološka prognostička grupa (Tabela 3).

Potom su, za svakog bolesnika, određeni reprezentativni preseki na kojima su obeležena najmanje tri polja sa homogenim, viabilnim, tumorskim tkivom, a zatim su oznake prenete na odgovarajući parafinski kalup koji se koristio kao osnovni kalup (donor block) za formiranje tkivnog mikroniza (tissue microarray, TMA).

3.3. Formiranje tkivnog mikroniza

Tkivni mikroniz je tehnika koja je uvedena sa ciljem da se omogući testiranje velikog broja uzoraka smeštenih u jednom parafinskom kalupu, za kratko vreme i sa minimalnim utroškom reagenasa. Postoji više načina za formiranje TMA. U ovoj studiji tkivni mikroniz je konstruisan prema tehnici autora Chen i Zhou (368) (Slika 6). Iz svakog parafinskog kalupa (donor block), iz prethodno obeleženih reprezentativnih polja, uzeta su po tri cilindra tumorskog tkiva upotrebom punkcione igle prečnika 2 mm. Cilindri su u pravilnom nizu ređani na dvostrano lepljivu traku koja je sa donje strane zalepljena za pravougaono isečeni rentgenski film koji odgovara obliku i dimenziji metalne posude za kalupljenje. Po završetku montiranja tkivnih cilindara za lepljivu traku ona se sa snimkom ubacuje u posudu za kalupljenje i naliva parafinom temperature 76°C i na taj način se formiraju novi kalupi. Od, u studiju uključenih uzoraka, formirana su tri nova parafinska kalupa, od kojih je svaki sadržao i tri kontrolna uzorka. Uzimanje tri uzorka tumorskog tkiva po bolesniku je procenjeno kao optimalno (369) jer se ovim brojem uzoraka prevazilazi problem mikroheterogenosti tumorskog tkiva. Od svakog TMA kalupa su napravljeni preseci debljine 3-4 µm, obojeni HE metodom i pomoću svetlosnog mikroskopa analizirani u cilju procene morfološke očuvanosti i reprezentativnosti tkivnih uzoraka. Preseci sa ovih kalupa su dalje korišćeni za imunohistohemijsku analizu.



Slika 6 Formiranje tkivnog mikroniza (preuzeto iz Chen and Zhou, 2005)

3.4. Imunohistohemijska analiza

Imunohistohemijska tehnika u formalinu fiksiranih i parafinu ukalupljenih uzoraka predstavlja višestepenu proceduru koja obuhvata sledeće postupke: deparafinizaciju, demaskiranje antigena, blokiranje endogene peroksidaze i imunohistohemijsko bojenje.

Deparafinizacija

Preseci u parafinu ukalupljenog tumorskog tkiva, debljine 3-4 μm , na Superfrost pločicama, suše se u termostatu 30-60 minuta na 56-58°C, a potom preko noći na sobnoj temperaturi i sutradan još 30-60 minuta na 56-58°C u termostatu. Potom treba uraditi deparafinizaciju po proceduri prikazanoj u Tabeli 7.

Tabela 7 Shematski prikaz procedure deparafinizacije

1	I ksilol	5-7 minuta, ocediti
2	II ksilol	5-7 minuta, ocediti
3	100% alkohol	3 minuta, ocediti
4	100% alkohol	3 minuta, ocediti
5	96% alkohol	3 minuta, ocediti
6	96% alkohol	3 minuta, ocediti
7	destilovana voda	30 sekundi

Demaskiranje antigena (proteolitička digestija)

Deparafinirani preseci se prenose u plastičnu kivetu sa oko 250 ml radnog rastvora citratnog (pH 6.0) ili EDTA tris (pH 9.0) pufera i kuvaju u mikrotalasnoj pećnici 20 minuta, a zatim se hlade u puferu na sobnoj temperaturi 20 minuta. Na kraju ispiraju destilovanom vodom dva puta po 30 sekundi.

Blokiranje endogene peroksidaze

Preparati se potope 5 minuta u 3% vodonik-peroksid, zatim isperu destilovanom vodom i preliju fosfatnim puferom (phosphate-buffered saline, PBS, 0,02 mol/l, pH 7,0) tri puta po 2 minuta.

Imunohistohemijsko bojenje

Korišćen je EnVision Flex (DAKO, Danska) sistem za imunohistohemijsko bojenje u četiri faze:

Aplikacija primarnog antitela

- isprati PBS puferom, odliti višak i obrisati oko isečka
- pokriti isečak minimalnom količinom primarnog antitela
- inkubirati preko noći na sobnoj temperaturi
- pažljivo isprati PBS-om
- preliterati svežim puferom

Aplikacija EnVision Flex/HRP

- odliti višak pufera i obrisati oko isečka
- pokriti isečak minimalnom količinom FLEX peroksidaze
- inkubirati 20 minuta na sobnoj temperaturi
- pažljivo isprati PBS-om
- preliterati svežim puferom

Aplikacija hromogena

- odliti višak pufera i obrisati oko isečka
- pokriti isečak minimalnom količinom Flex radnog rastvora substrata
- inkubirati 10 minuta na sobnoj temperaturi
- pažljivo isprati PBS-om

Kontrastiranje

- pokriti isečak Mayer hematoksilinom, ostaviti 5 minuta
- pažljivo isprati destilovanom vodom
- pažljivo isprati PBS-om
- isprati destilovanom vodom
- dehidrirati
- montirati pokrovno stakalce

Mesta specifičnog vezivanja antitela se boje smeđom bojom, dok se hematoksilin nespecifično vezuje za jedra svih ćelija i boji ih plavo.

Rastvori koji se koriste u imunohistohemijskim metodama:

Citratni pufer (pH 6,0)

Rastvor A: 0,1 mol limunska kiselina $C_6H_8O_7$

limunska kiselina $C_6H_8O_7$ _____ 10,52 g.

destilovana voda _____ 500 ml

Rastvor B: 0,1 mol natrijum citrat $C_6H_5Na_3O_7$

natrijum citrat $C_6H_5Na_3O_7$ _____ 14,705 g

destilovana voda _____ 500 ml

Radni rastvor pufera: 9 ml rastvora A, 41 ml rastvora B dopuniti do 500 ml destilovanom ili dejonizovanom vodom.

Fosfatni pufer (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7,0)

NaCl _____ 8,00 g

KCl _____ 0,20 g

KH_2PO_4 _____ 0,20 g

Na_2HPO_4 _____ 1,43 g

Dopuniti do 1 l destilovanom vodom.

Flex radni rastvor substrata

U 1 ml EnVision FLEX supstrata dodati 1 kapljicu FLEX hromogena diaminobenzidina (DAB).

Celokupna procedura je korišćena za imunohistohemijsko bojenje preseka tumorskih uzoraka, fiksiranih u formalinu i ukalupljenih u parafinu antitelima:

FLEX Anti-humani Ki-67 Antigen, klon MIB-1 (Ready-to-Use, Dako, Danska)

Anti-LC3B antitelo, N-terminal (Abcam, Cambridge, UK), 1/50

Anti-N-MYC antitelo (Abcam, Cambridge, UK), 1/50 i

Anti-C-MYC antitelo, Y69 (Abcam, Cambridge, UK), 1/500.

Ki-67 je korišćen za procenu proliferacije tumorskih ćelija, brojanjem 1000 tumorskih ćelija na velikom mikroskopskom uvećanju (x400). Samo jedarna reakcija je prihvatana

kao pozitivna. Proliferacioni indeks je računat kao procenat pozitivnih tumorskih ćelija od ukupnog broja tumorskih ćelija.

MYC proteinska ekspresija je procenjivana optičkim mikroskopom kao pozitivna ili negativna jedarna ekspresija.

Rezultat bojenja LC3B i N-MYC antitelom je procenjivan optičkom mikroskopijom kao pozitivan ili negativan sa gradiranjem intenziteta i procenta pozitivnih ćelija. Jedarna ekspresija je prihvatana kao pozitivna kod N-MYC bojenja, a citoplazmatska kod LC3B (370).

Skor za LC3B bojenje:

- 0 - slabo vidljiva tačkasta (dot like) pozitivnost u citoplazmi <5% ćelija
- 1 - vidljiva tačkasta pozitivnost u 5-25% ćelija
- 2 - lako vidljiva tačkasta pozitivnost u 25-75% ćelija i
- 3 - tačkasta pozitivnost u 75% ćelija.

Skor za N-MYC antitelo:

Procenat pozitivno obojenih jedara je gradiram kao:

- 0 - 0-39%
- 1 - 40-69%
- 2 - >70%.

Intenzitet bojenja je gradiran kao:

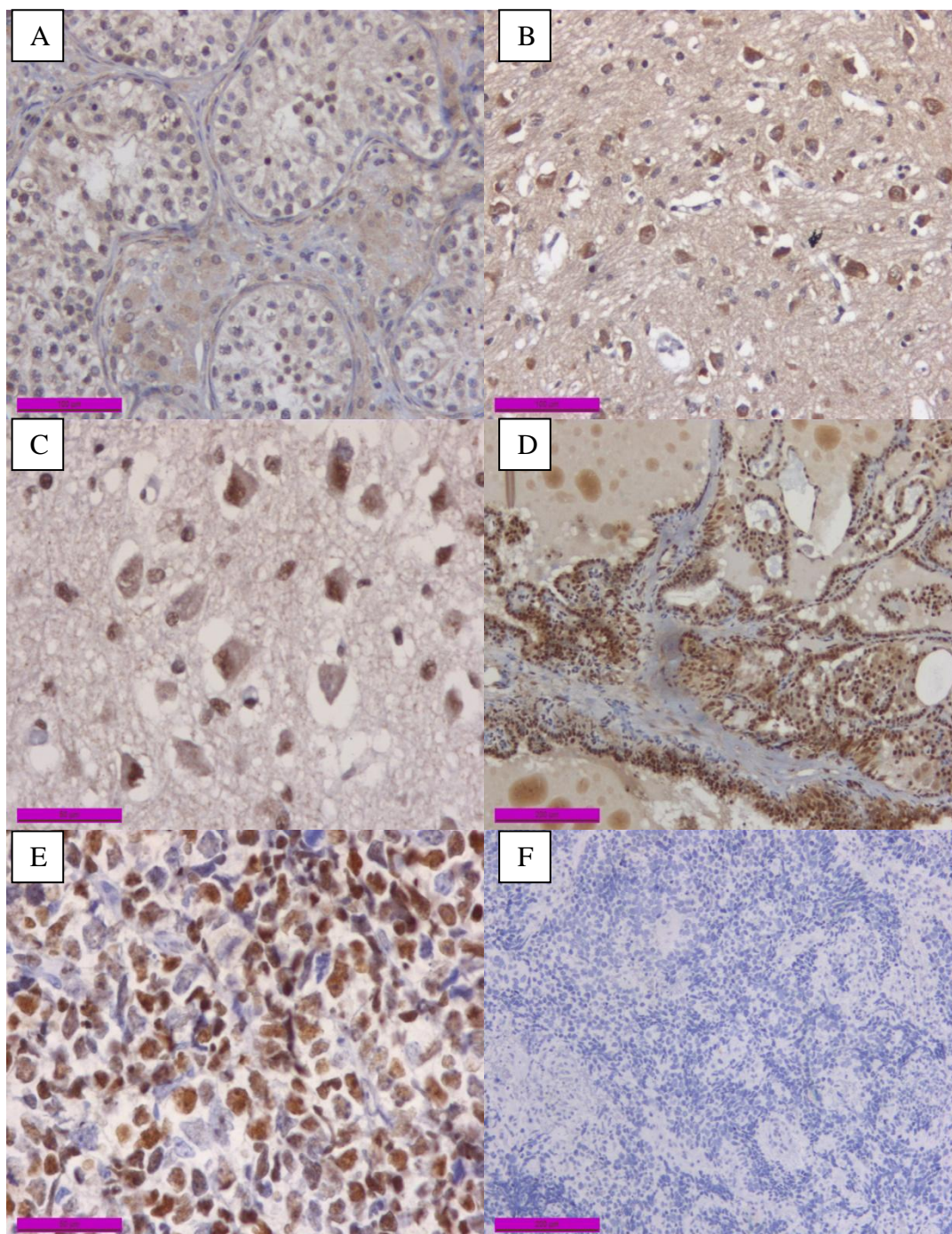
- 0- negativno
- 1- slabo pozitivno i
- 2- jako.

Potom je sračunavan imunoreaktivni skor sabiranjem ovih gradusa. Tumori sa skorom 0-1 su označavani kao niske, 2 srednje i 3-4 visoke imunoekspresije.

Za svako primenjeno antitelo postojala je pozitivna i negativna kontrola. Uzorci različitih tkiva i tumora korišćeni su kao pozitivne kontrole i bili su uključeni u TMA kalupe (Slika 7):

- tkivo humanog testisa i mozga kao pozitivna kontrola za LC3B antitelo,
- moždano tkivo i karcinom tireoidee kao pozitivna kontrola za N-MYC antitelo i
- difuzni krupnoćelijski B limfom kao pozitivna kontrola za C-MYC protein.

Negativna kontrola predstavlja bojenje u kome nije upotrebljeno primarno antitelo (Slika 7).



Slika 7 Pozitivne kontrole A) tkivo testisa (LC3B), B) moždano tkivo (LC3B), C) moždano tkivo (N-MYC), D) karcinom tireoidee (N-MYC), (E) difuzni krupnoćelijski B limfom (C-MYC) i F) negativna kontrola

3.5. Određivanje molekularno-genetičkih parametara

Molekularno-genetičke analize su urađene delomu laboratoriji za medicinsku genetiku Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“, a delom u laboratorijama Childrens Cancer Research Institut, St. Anna Kinderspital, i Labdia Labordiagnostik GmbH, St. Anna Forschungsinstitutu Beču, na otiscima (imprintima) svežeg tumorskog tkiva i, u retkim slučajevima, na fiksiranim, u parafinu ukalupljenim uzorcima, metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH). Tumorski oisci su uzimani neposredno nakon operacije na prethodno posebno tretiranim mikroskopskim pločicama (polyprep, Sigma Aldrich). Analizirani su uzorci NB i iGNB. Status *MYCN* onkogen je određivan prema kriterijumima Biološkog komiteta međunarodne grupe za procenu rizika od neuroblastoma (International Neuroblastoma Risk Group INRG, Biology Committee).

MYCN status se klasifikuje na sledeći način:

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

Status 1p36.3 je klasifikovan u 2 grupe:

- bez del 1p36.3 (normalan status) - definisan balansiranim odnosom signala posmatranog regiona i referentnog signala na suprotnom kraku hromozoma
- sa del 1p36.3 - definisan nebalansiranim odnosom signala posmatranog regiona i referentnog signala na suprotnom kraku hromozoma, s tim što je prisutan samo jedan signal posmatranog regiona

Uzimanje tumorskog otiska i tumorskog tkiva:

- Otisak (imprint) svežeg tumorskog tkiva uzima se na prethodno obeleženim „polyprep-slide“ pločicama sa dva različita mesta

- Istovremeno se uzima po fragment tumorskog tkiva sa istih mesta
 - Pločice se stavljaju u kivetu i nalivaju 70% etanolom, i tako drže 20 min, a epruveta sa fragmentima tumorskog tkiva čuva u zamrzivaču na -20° C.
 - Nakon 20 min u etanolu pločice sušiti na vazduhu i odložiti u kiveti na -20° C.
- Sutradan raditi pretretman preparata.
- Sa donje strane pločice obeležiti dijamantskom iglom polje na kojem je otisak (pre početka pretretmana).

Pretretman preparata:

- Tumorske otiske fiksirati 3 min u metanolu na sobnoj temperature, osušiti na vazduhu
- Inkubirati sa RNazom (100µl RNaze po preparatu), pokriti pokrovnim staklom i držati 1 sat na 37°C u vlažnoj posudi
- Ispirati 3 puta po 5 min sa 2xSSC na mešalici na sobnoj temperaturi
- Inkubirati 10 min u rastvoru sa pepsinom/0,01M HCL na 37°C
- Ispirati 2 puta po 5 min sa 1xPBS na mešalici na sobnoj temperaturi
- Isprati 5 min sa 1xPBS/50mM MgCl₂ na mešalici na sobnoj temperaturi
- Postfiksacija 10 min sa 1xPBS/50mM MgCl₂/1% formaldehidom na sobnoj temperature
- Isprati 5 min sa 1xPBS na sobnoj temperaturi
- Dehidracija u seriji etanola (na -20°C): 70% (3 min), 90% (3 min), 100% (3 min)
- Osušiti na vazduhu i čuvati na sobnoj temperaturi
- Posle pretretmana proveriti na faznom mikroskopu da li ima materijala na preparatima

Rastvori koji su korišćeni u opisanoj proceduri:

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

HCl 0,01M: 166µl 37% HCl u 200ml vode

Pepsin (koncentrovani rastvor, čuva se na -20°C): 100 mg pepsina rastvoriti u 1 ml destilovane vode. Od koncentrovanog rastvora uzeti $50\mu\text{l}$ i rastvoriti u 100ml 0,01M HCL.

1xPBS (za 1000 ml): 0,2 gr KCl + 0,2gr KH_2PO_4 + 8gr NaCl + 1,15gr Na_2HPO_4 - vodu dodati do 800ml, doterati PH=7,2 sa 1N HCl i dopuniti vodom do 1l.

2xSSC (za 1000ml): 175,32gr NaCl + 88,23gr Na-citrata - vodu dodati do 800ml, doterati PH=7,1 sa 1N HCl i dopuniti vodom do 1l.

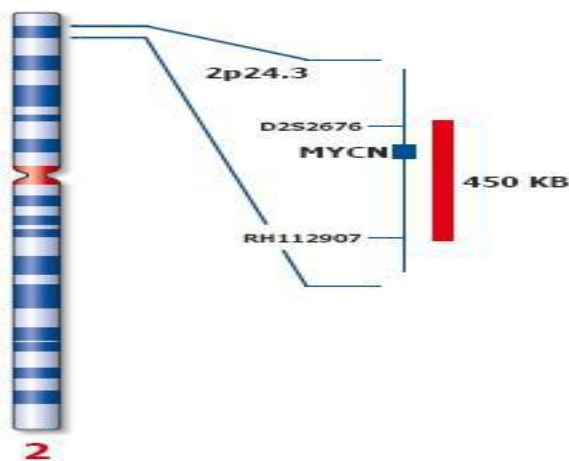
1xPBS/50mM MgCl_2 : 5ml 1M MgCl_2 + 95ml 1xPBS.

1xPBS/ MgCl_2 50mM/ 1% formaldehid: 94ml 1xPBS + 5ml 1M MgCl_2 + 1ml formaldehida

1M MgCl_2 ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 99%, Mw=203,31): za 100ml rastvora odmeriti 20,33gr i rastvoriti u vodi.

Hibridizacija:

Za analizu statusa *MYCN* onkogeni korišćene su je fluorescentno obeležene DNK probe ON MYCN 2p24/LAF 2q11, (proizvođač: Kreatech Diagnostic, Amsterdam, Holandija; Q-Biogene, Heidelberg, Nemačka; Vysis, Downers Grove, IL). *MYCN* fluorescerntna proba je obeležena crvenom bojom. DNK proba za LAF gen na 2q11 omogućava identifikaciju hromozoma 2 i obeležena je zelenom bojom (Slika 8).

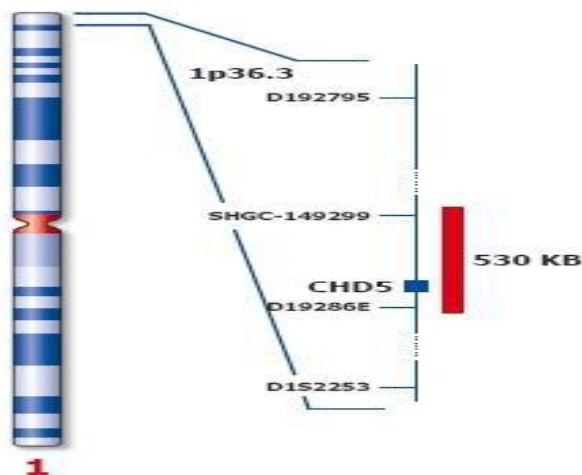


Slika 8 Lokalizacija MYCN i LAF probe na hromozomu 2

(preuzeto sa <http://www.kreatech.com/rest/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/solid-tumors/on-mycn-2p24-laf-2q11.html>)

Za analizu statusa 1p36.3 korišćena je fluorescentno obeležena DNK proba ON SRD (1p36)/SE1(1qh) (Kreatech Diagnostic) iD1Z1, D1Z2/PUC1.77 (Q-Biogene).

Specifična DNK proba za 1p36 je dizajnirana tako da pokriva najmanji region konzistentne delecije (smallest region of consistent deletion, SRD) između markera D1S2795 i D1S253i obeležena je crvenom bojom. DNK proba SE1 (PUC 1.77) omogućava identifikaciju hromozoma 1 i obeležena je zelenom bojom (Slika 9).



Slika 9 Lokalizacija SRD 1p36 i SE1 (1qh) probe na hromozomu 1

(preuzeto sa <http://www.kreatech.com/rest/products/repeat-freetm-posedontm-fish-probes/solid-tumors/srd-1p36.html>)

Kod najmanjeg broja tumora određivan je status 17q, DNA probama D17Z1 i D17S88-2 (Vysis, Downers Grove, IL).

Kohibridizacija je rađena po protokolu proizvođača probe:

- naneti 10 μ l probe ili mešavine proba na preparat na površinu 22x22mm (da bi se pokrila cela površina mikroskopske pločice naneti 2 x 10 μ l probe)
- pokriti pokrovnim staklom koje je prethodno oprano u rastvoru etar:etanol (1:1) i zalepiti fiksogumom. Paziti da se ne naprave mehurići!
- denaturisati ovako pripremljen preparat na toploj ploči (ili u sterilizatoru) na 75°C između 5 i 10 min
- prebaciti preparat u vlažnu komoru i ostaviti na 37°C preko noći

***vlažna komora se pravi tako što se u plastičnu kutiju za preparate stavi papirni ubrus koji se dobro navlaži rastvorom 2x SSC

Posthibridizacija:

Posthibridizacija je rađena po protokolu proizvođača probe (Kreatech Diagnostic):

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

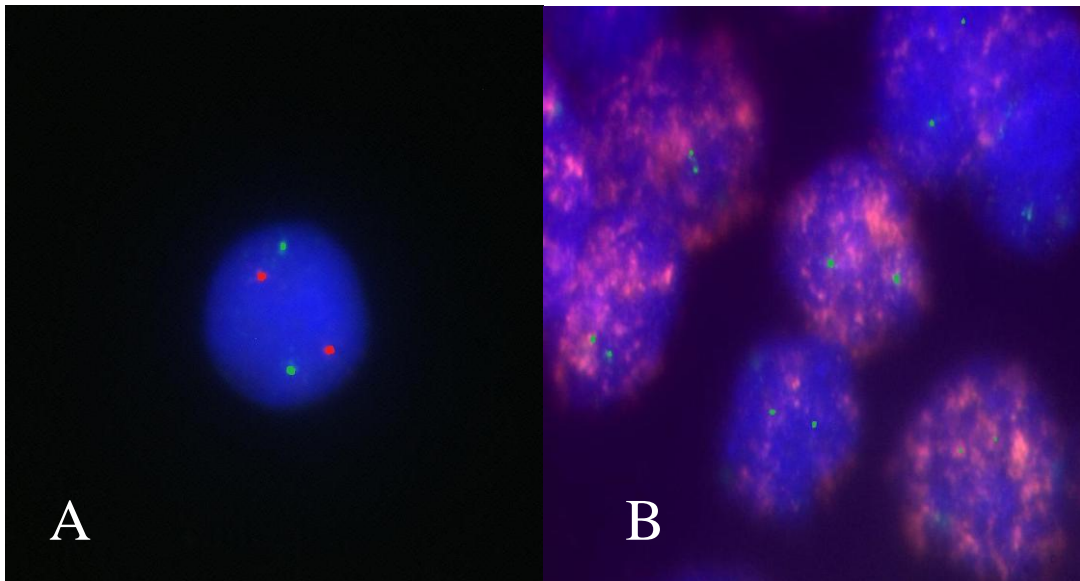
Rastvori koji su korišćeni u opisanoj proceduri su pravljani na sledeći način:

pufer za ispiranje I: 0,4xSSC / 0,3% igepala (standardni protokol je izmenjen i umesto igepala je korišćen TRITON X-100) 2ml 20xSSC + 98ml destilovane vode, zatim oduzeti 300 μl pripremljenog rastvora, a dodati 300 μl TRITON X-100

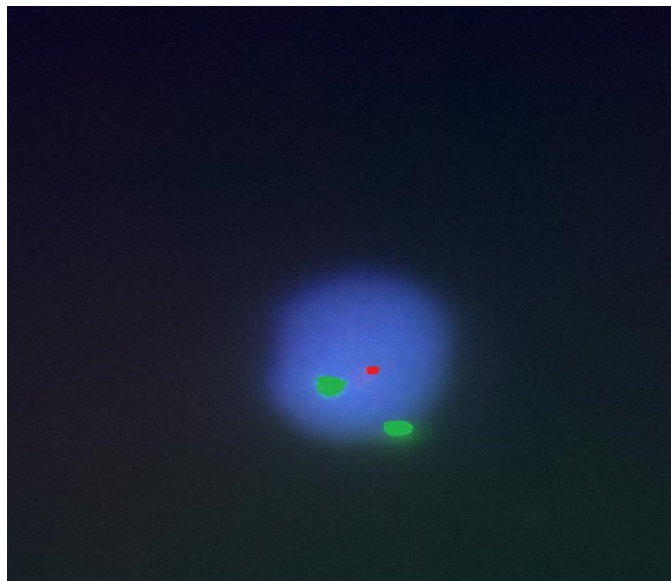
pufer za ispiranje II: 2xSSC / 0,1% igepal tj. TRITON X-100 35 10ml 20xSSC + 90ml destilovane vode, zatim oduzeti 100 μl pripremljenog rastvora, a dodati 100 μl TRITON X-100

Bojenje jedara i hromozoma:

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



Slika 10 *MYCN* onkogen A) Normalan broj kopija: 2 zelena, referentna signala za hromozom 2 (LAF2q11) i 2 crvena signala *MYCN* onkogen B) Amplifikacija *MYCN* onkogen: 2 zelena referentna signala i preko 50 crvenih signala *MYCN* onkogen



Slika 11 Delecija 1p36.3: dva zelena, referentna signala hromozoma (SE1qh), i jedan crveni, telomerni signal za 1p36.3 (SRD1p36)

3.6. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

Smrznuti tumorski uzorci su fiksirani u 3% glutaraldehidu, ispirani u 0,1M kakodilatnom puferu (pH 7,4), a potom dalje fiksirani u 1% osmium tetroksidu. Po završetku fiksacije, uzorci su dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije i propilenoksidu, a zatim ukalupljeni u Epon 812. Ultratanki preseći (60-90 nm) dobijeni su sečenjem na ultramikrotomu, zatim su bojeni uranil acetatom i olovo citratom i na kraju postavljani na bakarne mrežice. Ultrastrukturna analiza sa morfometrijom urađena je na transmisionom elektronskom mikroskopu Morgagni 268D, na 60 ćelija po tumorskom uzorku. Detekcija autofagnih vakuola uključujući autofagozome i autolizosome urađena je prema uputstvu za detekciju autofagije (148). Rezultat je izražavan kao ukupni broj autofagnih vakuola po ćeliji kod različitih neuroblastnih tumora. Sa autofagnim vakuolama brojane su i sledeće strukture: ultrastrukturno oštećene mitohondrije, neoštećene mitohondrije, multivezikularna tela, neurosekretorne granule, lipidne kapi i klatrinske vezikule. Istovremeno je beležen i procenat ćelija u kojima su uočeni dilatirani endoplazmatski retikulum i prominentni neurotubuli.

3.7. Statistička analiza

U statističkoj analizi podataka distribucije uzrasta određivane su medijane za čije je poređenje korišćen Kruskal-Wallisov test, a u nastavku analize Dunnova procedura sa Bonferroni korekcijom. Srednje vrednosti su međusobno upoređivane testom ANOVA, a u nekim situacijama i Studentovim t-testom. Za poređenje učestalosti i proporcija korišćen je Fisherov i χ^2 -test. Preživljavanje je kalkulirano i prikazano Kaplan-Meierovim koeficijentom i krivama, a značajnost razlika u preživljavanju između različitih prognostičkih parametara testirano je Log-rank testom. Korelacija između različitih prognostičkih faktora je ispitivana korišćenjem Pearsonovog korelacionog testa.

4. REZULTATI

4.1. Osnovne karakteristike bolesnika sa neuroblastnim tumorima

U studiju je uključeno 60 bolesnika sa dijagnozom NT postavljenu u Odeljenju za kliničku patologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ na osnovu resekcionih i biopsijskih uzoraka tumora.

Analizirano je po deset uzoraka GN i intermiksno GNB i 40 uzoraka tumorskog tkiva neuroblastoma, 20 sa i 20 bez *MYCN* amplifikacije.

Za sve bolesnike uključene u studiju procenjen je klinički stadijum bolesti i postojali su sačuvani u parafinu ukalupljeni uzorci tumorskog tkiva, a za deo i smrznuti uzorci svežeg tumorskog tkiva.

Grupa od 21-og pacijenta je lečena samo hirurški. Tu grupu čine svi dijagnostikovani GN i iGNB i jedan NB (prvog kliničkog stadijuma) koji su, posle operativnog uklanjanja tumora u celini, samo klinički praćeni.

U periodu od 1996. do 2002. godine pacijenti iz grupe NB su posle biopsije ili resekcije tumora (totalne ili parcijalne) lečeni po protokolu NB 97, dok su posle 2002. godine primenjivani protokoli Evropske kooperativne grupe ESIOP u skladu sa rizičnom grupom.

Kod 19-oro bolesnika sa neuroblastomom u grupi visokog rizika, kao deo terapijskog protokola urađena je i transplantacija matičnih ćelija hematopoeze (TMCH), koja se u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ radi od 1997. godine.

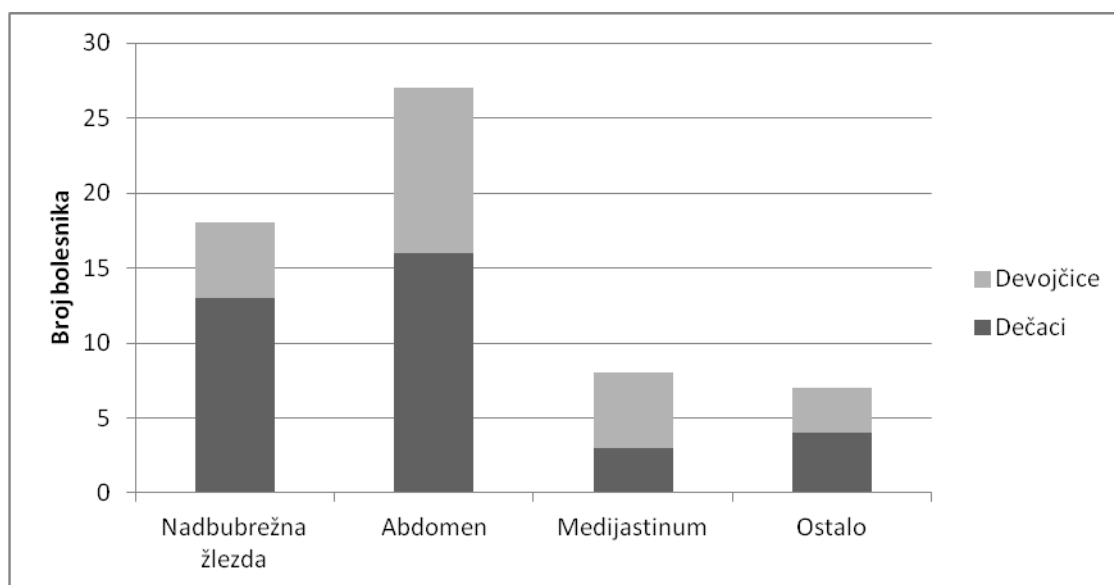
NT su bili češći kod dečaka u odnosu na devojčice (36:24, 60%:40%), što čini proporciju od 1.5:1. U prognostički dobroj grupi GN i iGNB bilo je više devojčica (8:12, 40%:60%), dok je u grupi NB bilo više dečaka (28:12, 70%:30%).

Medijana uzrasta ispitivanih bolesnika je bila 36 meseci (3 godine). Zastupljene su različite lokalizacije, najčešće abdominalna (bez nadbubrežnih žlezda) (Tabela 8, Grafikon 1).

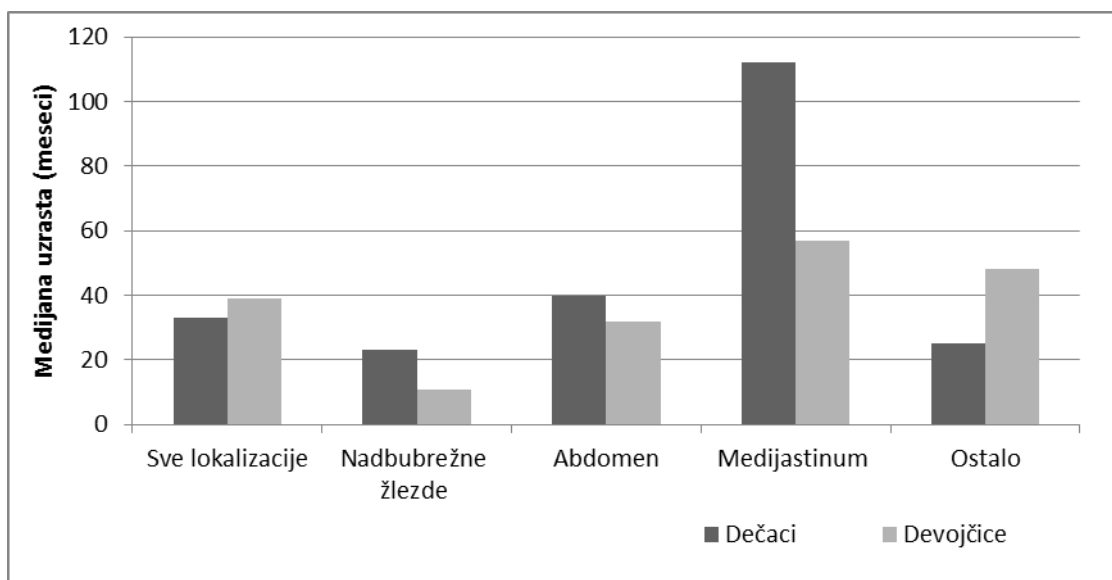
Tabela 8 Distribucija bolesnika prema uzrastu i anatomskoj lokalizaciji NT

Lokalizacija	Pol	Br. pacijenata (%)	Uzrast (meseci)	
			Srednja vrednost	med
Sve	Ukupno	60 (100.0)	46	36
	Dečaci	36 (60.0)	46	33
	Devojčice	24 (40.0)	47	39
Nadbubrežne žlezde	Ukupno	19 (100.0)	28	20
	Dečaci	14 (73.7)	33	23
	Devojčice	5 (26.3)	15	11
Abdomen	Ukupno	26 (100.0)	53	37
	Dečaci	16 (61.5)	55	40
	Devojčice	10 (38.5)	51	32
Medijastinum	Ukupno	8 (100.0)	72	57
	Dečaci	2 (25.0)	112	112
	Devojčice	6 (75.0)	59	57
Ostalo	Ukupno	7 (100.0)	40	42
	Dečaci	4 (57.1)	24	25
	Devojčice	3 (42.9)	62	48

med–medijana, abdomen–sve lokalizacije u abdomenu izuzev nadbubrežnih žlezda

**Grafikon 1** Distribucija broja bolesnika prema lokalizaciji i polu

Najmlađe su bile devojčice sa NT nadbubrežnih žlezda, a najstariji dečaci sa NT u medijastinumu (Tabela 8, Grafikon 2).

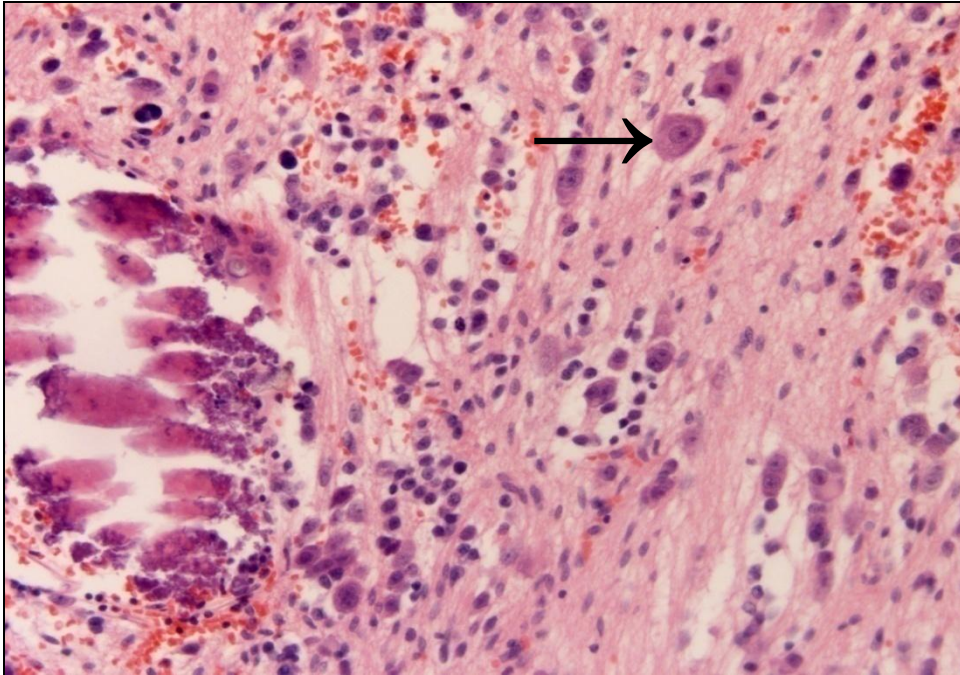


Grafikon 2 Distribucija medijane uzrasta bolesnika prema polu i lokalizaciji

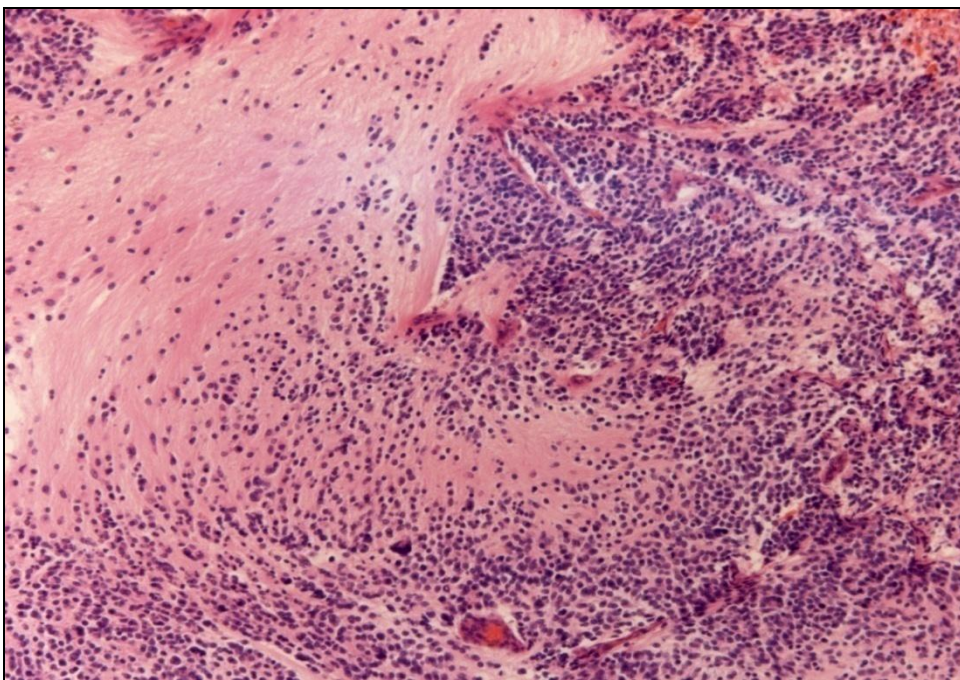
4.2. Histopatološka analiza neuroblastnih tumora

Ponovo su pregledani HE obojeni preseci u parafinu ukalupljenog tumorskog tkiva. Pregledano je od 1 do 40 histoloških pločica po tumoru - prosečno 9, sa SD 7 i medijanom 7. Podatak o masi kompletno ili parcijalno resektiranog tumora postojao je za 30 (50%) bolesnika. Masa uzorka se kretala od 5 do 500 grama, sa prosečnom vrednošću 121 gram. Dimenzija uzorka je bila poznata za 39 (65 %) uzoraka sa prosečnom veličinom od 5.7 cm (SD 3.11 cm) i medijanom 6 cm.

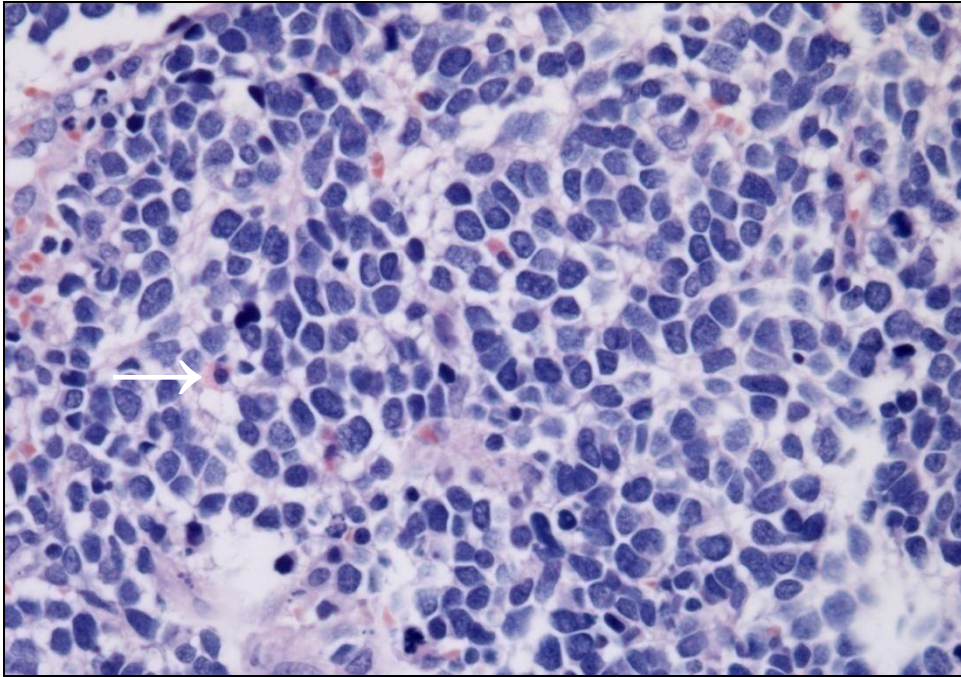
Izvršena je klasifikacija i analiza uzorka prema histološkim tipovima na osnovu kriterijuma INPC klasifikacije. Prikazan je tipičan histološki izgled različitih tipova NT (Slika 12-16).



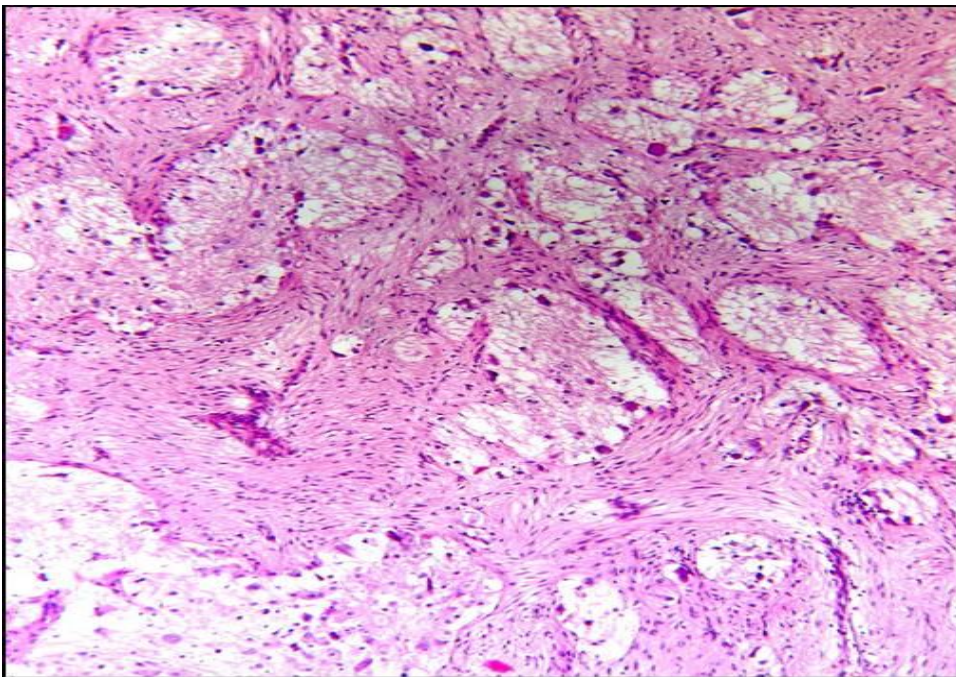
Slika 12 Neuroblastom diferencirajućeg podtipa, uz sitne neuroblastne ćelije prisutne su i krupnije ćelije obilne citoplazme, jasno uočljivih jedara sa krupnim jedarcem, diferencirajući neuroblasti (→) (HE, x400)



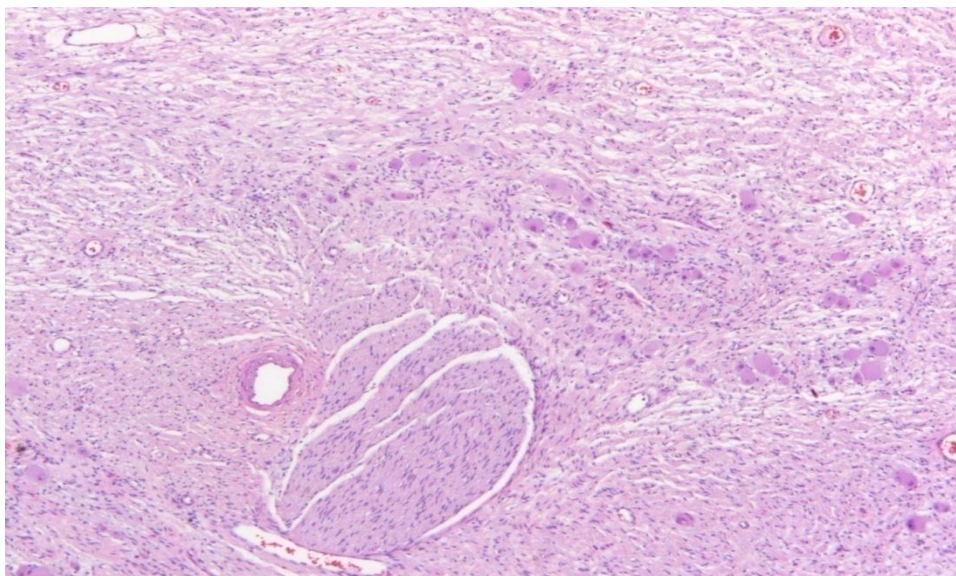
Slika 13 Neuroblastom slabo diferentovanog podtipa, uočava se varijabilnost u gustini neuroblastnih ćelija i količini neuropila (HE, x100)



Slika 14 Neuroblastom nediferentovanog podtipa, gusto zbijeni neuroblasti, oskudne citoplazme i hiperhromatičnih jedara, uočavaju se ćelije u apoptozi (→) (HE, x400)



Slika 15 Ganglioneuroblastom intermiksnoog podtipa, neuroblastomska komponenta prisutna je samo u vidu mikroskopskih ostrvaca u ganglioneuromskoj osnovi (HE, x100)



Slika 16 Ganglioneurom, sastavljen samo od zrelih elemenata uključujući ganglijske ćelije, Schwann-ove ćelije i vezivno tkivo (HE, x50)

Dečaci sa GN su bili najstariji sa medijanom uzrasta 130 meseci (10 godina i 10 meseci), a devojčice sa NB najmlađe sa medijanom 17 meseci (Tabela 9).

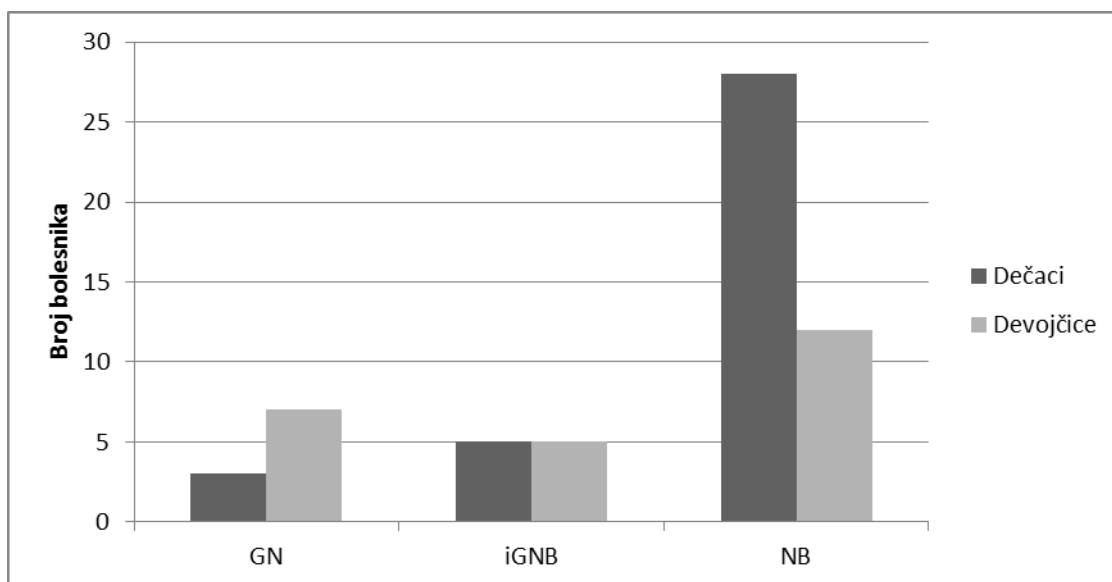
Tabela 9 Distribucija bolesnika sa različitim tipovima NT u odnosu na pol i uzrast

		Br.pacijenata (%)	Uzrast (meseci)	
			Srednja vrednost	med
Svi	Ukupno	60 (100.0)	46	36
	Dečaci	36 (60.0)	46	33
	Devojčice	24 (40.0)	47	39
GN	Ukupno	10 (100.0)	100	92*
	Dečaci	3 (30.0)	130	128#
	Devojčice	7 (70.0)	88	89»
iGNB	Ukupno	10 (100.0)	60	50*
	Dečaci	5 (50.0)	67	66#
	Devojčice	5 (50.0)	53	48»
NB	Ukupno	40 (100.0)	29	22*
	Dečaci	28 (70.0)	33	25#
	Devojčice	12 (30.0)	20	17»

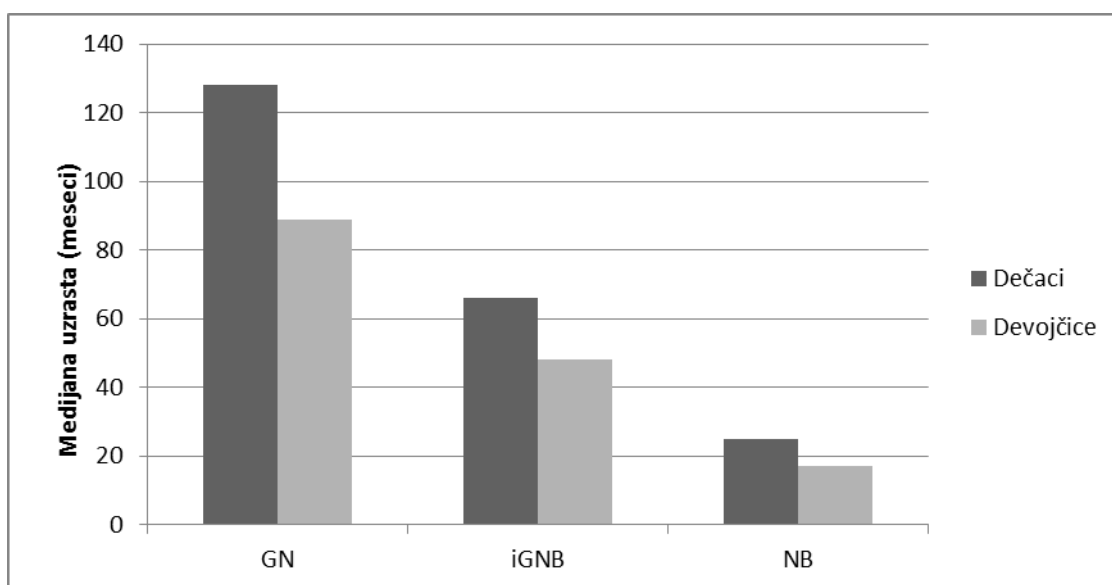
GN-ganglioneurom, iGNB-intermiksni ganglioneuroblastom, NB-neuroblastom

Kruskal-Wallisovim testom nađena je statistički značajna razlika medijana uzrasta u odnosu na histološki tip tumora (* $p < 0.001$, $\chi^2=24.7$, $df=2$). Daljom analizom (Dunn procedura sa Bonferroni korekcijom) utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike

(SZR) medijana uzrasta sledećih parova: GN-NB ($p < 0.001$) i iGNB-NB ($p = 0.042$). Ustanovljena je i SZR medijana uzrasta za svaki pol posebno (#muški: $\chi^2 = 9.13$, $df = 2$, $p = 0.01$; »ženski: $\chi^2 = 17.01$, $df = 2$, $p < 0.001$), kao i SZR medijana uzrasta za par GN-NB sa verovatnoćama $p = 0.047$ za muški pol i $p < 0.001$ za ženski pol.



Grafikon 3 Distribucija histoloških tipova u odnosu na pol



Grafikon 4 Distribucija uzrasta u odnosu na histološki tip i pol

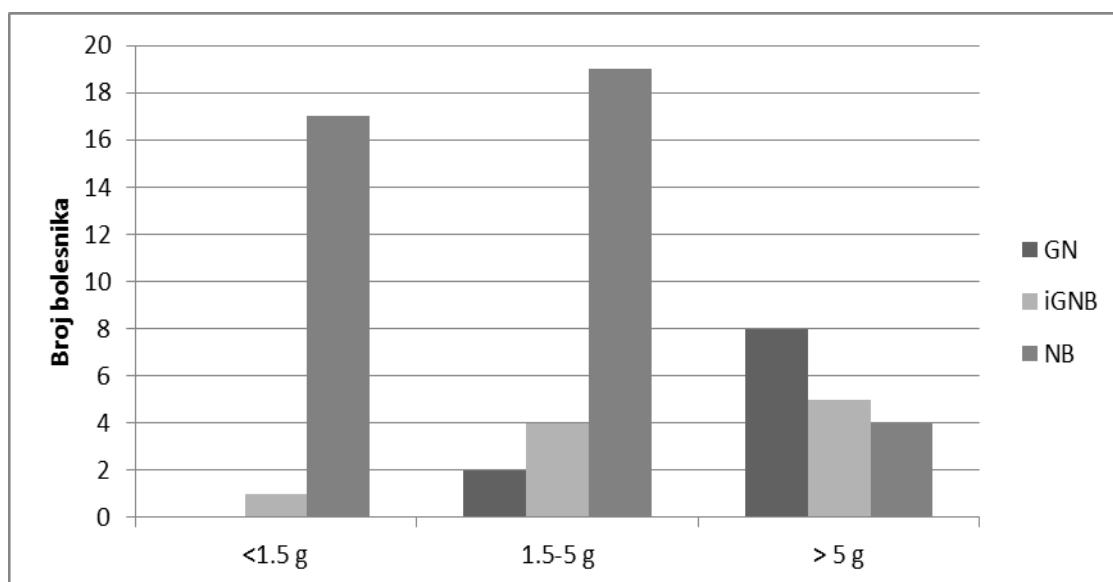
NB je bio češći kod dečaka, a GN kod devojčica (Grafikon 3). Najstariji su bili dečaci sa GN, a najmlađe devojčice sa NB (Grafikon 4).

Tabela 10 Distribucija NT prema uzrastu

Tip tumora	Uzrasne kategorije, broj bolesnika (%)			Ukupno
	<1.5 g	1.5-5 g	> 5 g	
GN, iGNB	1 (5.0)	7 (35.0)	12 (60.0)	20 (100.0)
NB	17 (42.5)	19 (47.5)	4 (10.0)	40 (100.0)
Ukupno	18 (30.0)	26 (43.3)	16 (26.7)	60 (100.0)

GN-ganglioneurom, iGNB-intermiksni ganglioneuroblastom, NB-neuroblastom

χ^2 testom je pokazana visoko statistički značajna veza tipa NT i uzrasnih kategorija, $\chi^2=19.231$, $df=2$, $p=0.000067$, sa visokim stepenom udruženosti, Cramer's $V=0.566$ (Tabela 10).



Grafikon 5 Tipovi NT u odnosu na uzrasne kategorije

Tabela 11 Distribucija bolesnika sa NB prema uzrastu i kliničkom stadijumu

Stadijum (INSS)	Uzrasne kategorije - N (%)			Ukupno
	<1.5 g	1.5-5 g	> 5 g	
IVs, I, II, III	11(64.7)	10 (52.6)	1 (25.0)	22(55.0)
IV	6 (35.3)	9 (47.4)	3 (75.0)	18 (45.0)
Ukupno	17 (100.0)	19 (100.0)	4 (100.0)	40 (100.0)

INSS-Internacionalni sistem za određivanje stadijuma neuroblastoma

Nije nađena statistički značajna razlika između INSS stadijuma i uzrasnih kategorija, (Tabela 11), $\chi^2=2.145$, $df=2$, $p=0.342$.

Tabela 12 Distribucija histoloških tipova NT prema polu i anatomskoj lokalizaciji

		Broj bolesnika N (%)		
Lokalizacija	Pol	Ukupno	GN, iGNB	NB
Svi	Ukupno	60 (100.0)	20 (100.0)	40 (100.0)
	Dečaci	36 (60.0)	8 (40.0)	28 (70.0)
	Devojčice	24 (40.0)	12 (60.0)	12 (30.0)
Adrenalno	Ukupno	19 (100.0)	2 (100.0)*	17 (100.0)*
	Dečaci	14 (73.7)	2 (100.0)#	12 (70.6)#
	Devojčice	5 (26.3)	0	5 (29.4)
Abdomen	Ukupno	26 (100.0)	7 (100.0)*	19 (100.0)*
	Dečaci	16 (61.5)	4 (57.1)#	12 (63.2)#
	Devojčice	10 (38.5)	3 (42.9)	7 (36.8)
Medijastinum	Ukupno	8 (100.0)	7 (100.0)*	1 (100.0)*
	Dečaci	2 (25.0)	1 (14.3)#	1 (100.0)#
	Devojčice	6 (75.0)	6 (85.7)	0
Ostalo	Ukupno	7 (100.0)	4 (100.0)*	3 (100.0)*
	Dečaci	4 (57.1)	1 (25.0)#	3 (100.0)#
	Devojčice	3 (42.9)	3 (75.0)	0

GN-ganglioneurom, iGNB-intermiksni ganglioneuroblastom, NB-neuroblastom

Statističkom analizom nije nađena značajna razlika u raspodeli tipova NT po različitim lokalizacijama ni kod ukupnog broja bolesnika (*) ni za muški pol (#) pojedinačno.

NB su klasifikovani u podtipove (nediferentovan UD, slabo diferentovan PD i diferencirajući D). Za svaki tumor određen je MKI i pomoću njega, tumorskog podtipa i uzrasta bolesnika određivane su histološke prognostičke grupe (povoljne prognoze FH, nepovoljne prognoze UH) (Tabela 13, Grafikon 6). Nije nađena statistička značajnost u ovoj raspodeli.

Tabela 13 Odnos histološkog podtipa NB i histološke prognostičke grupe

		Broj bolesnika N (%)		
Tip NB	Ukupno	FH	UH	NK
UD	13 (32.5)	0	10 (43.5)	3 (60.0)
PD	24 (60.0)	9 (75.0)	13 (56.5)	2 (40.0)
D	3 (7.5)	3 (25.0)	0	0
Ukupno	40 (100.0)	12 (100.0)	23 (100.0)	5 (100.0)

FH-povoljna histološka prognoza, UH-nepovoljna histološka prognoza, NK-neklasifikovani, UD-nediferentovani, PD-slabodiferentovani, D-diferencirajući

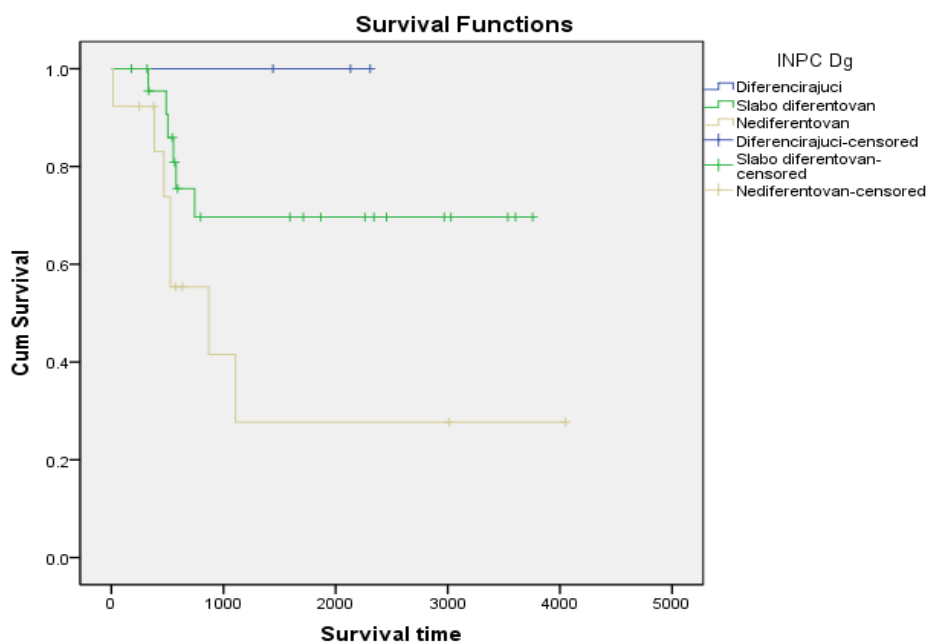
Tabela 14 Distribucija histoloških podtipova NB prema kliničkom stadijumu

Stadijum	Broj tumora N(%)			
	Ukupno	UD	PD	D
IVs, I, II, III	22 (55.0)	7 (53.9)	13 (54.2)	2 (66.7)
IV	18 (45.0)	6 (46.1)	11 (45.8)	1 (33.3)
Ukupno	40 (100.0)	13 (100.0)	24 (100.0)	3 (100.0)

UD-nediferentovani, PD-slabodiferentovani, D-diferencirajući

Nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji histoloških podtipova NB prema kliničkom stadijumu.

Preživljavanje je kalkulirano i prikazano Kaplan-Meierovim koeficijentom i krivama. Značajnost razlika u preživljavanju između različitih prognostičkih parametara testirano je Log-rank testom. Dobijena je statistički značajna razlika u preživljavanju između slabodiferentovanog i nediferentovanog podtipa NB (Grafikon 6, Tabela 15, *).



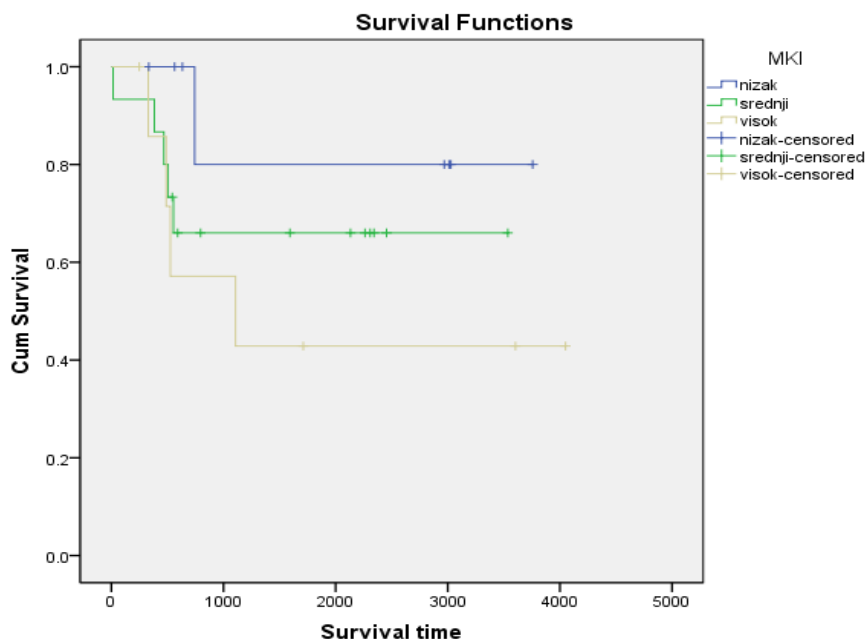
Grafikon 6 Ukupno preživljavanje u odnosu na podtip NB tumora

Tabela 15 Poređenje prognostičkog značaja histoloških podtipova NB (χ^2 , p)

	INPC	D	PD	UD
Log Rank	D	/	1.051, 0.305	3.352, 0.067
(Mantel-Cox)	PD	1.051, 0.305	/	4.006, 0.045*
	UD	3.352, 0.067	4.006, 0.045*	/

UD-nediferentovani, PD-slabodiferentovani, D-diferencirajući NB

Analizom preživljavanja u odnosu na kategorije MKI nije dobijena statistička značajnost (Grafikon 7), **Log Rank** (Mantel-Cox) test $\chi^2=2.433$ df=2, **p=0.296**.



Grafikon 7 Ukupno preživljavanje u odnosu na MKI (mitotsko-karioretski indeks)

Tabela 16 Raspodela prognostičkih grupa NB u odnosu na kliničke stadijume bolesti

Stadijum	Ukupno	Broj tumora N (%)		
		FH	UH	NK
IVs, I, II, III	22 (55.0)	7 (58.3)*	14 (60.9)*	1 (20.0)
IV	18 (45.0)	5 (41.7)*	9 (39.1)*	4 (80.0)
Ukupno	40 (100.0)	12 (100.0)	23 (100.0)	5 (100.0)

FH-povoljna histološka prognoza, UH-nepovoljna histološka prognoza, NK-neklasifikovani

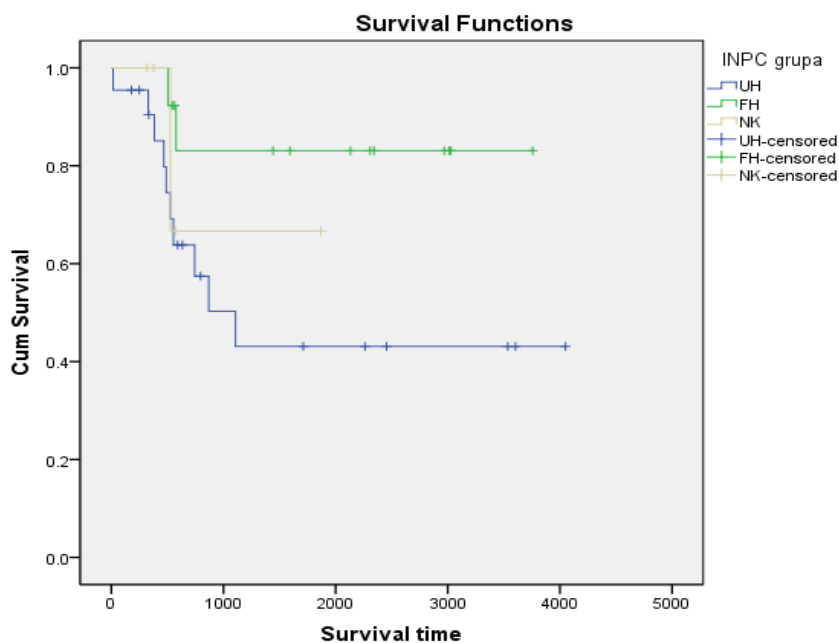
* $\chi^2=0.021$, df=1, p=0.884.

Nije nađena SZR u raspodeli prognostičkih grupa i kliničkog stadijuma (Tabela 16). Dobijena je SZR u preživljavanju između dobre i loše histološke prognostičke grupe (Grafikon 8, Tabela 17, *).

Tabela 17 Poređenje prognostičkog značaja histoloških prognostičkih grupa (χ^2 , p)

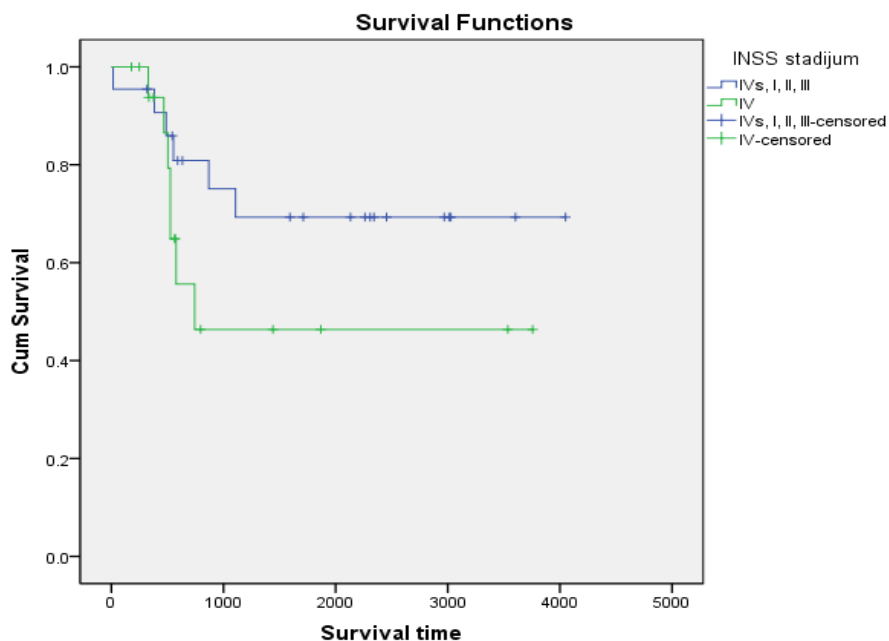
	INPC	UH	FH	NK
Log Rank	UH	/	4.253, 0.039*	0.305, 0.581
(Mantel-Cox)	FH	4.253, 0.039*	/	0.689, 0.407
	NK	0.305, 0.581	0.689, 0.407	/

FH-povoljna histološka prognostička grupa, UH-nepovoljna histološka prognostička grupa, NK-neklasifikovani



Grafikon 8 Ukupno preživljavanje u odnosu na histološke prognostičke grupe

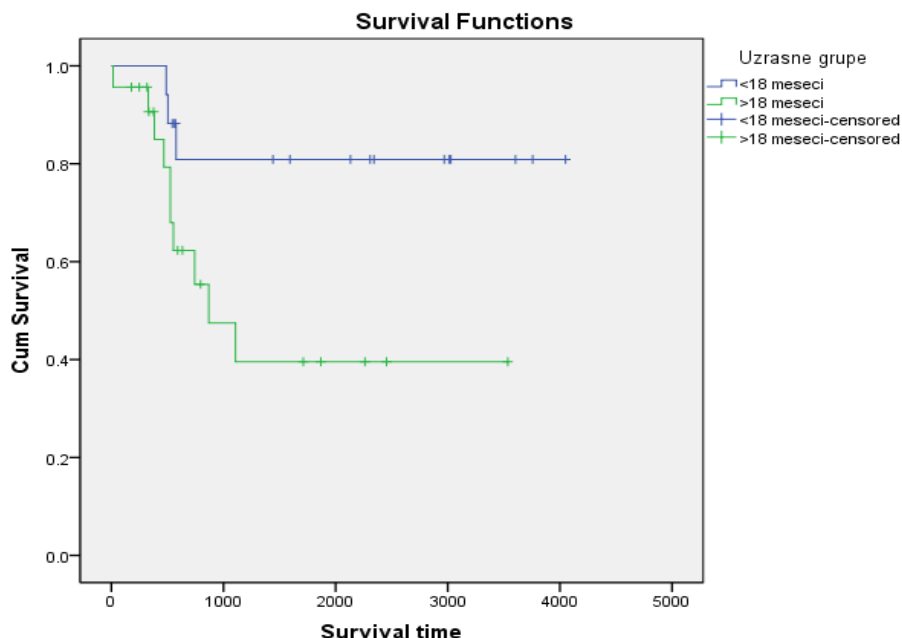
Urađena je analiza preživljavanja (Kaplan-Meier) u odnosu na klinički stadijum bolesti (INSS), svrstan u dve kategorije prognostički dobru (IVs, I, II i III) i prognostički lošu (IV). Nije nađena statistički značajna razlika između ovih kategorija (Grafikon 9).



Grafikon 9 Ukupno preživljavanje u odnosu na klinički stadijum bolesti

Log Rank (Mantel-Cox) test 1.903 df=2, p=0.168

Analizirano je i preživljavanja u odnosu na uzrasne kategorije: mlađi i stariji od 18 meseci (1.5 godina) i dobijena je statistički značajna razlika.



Grafikon 10 Ukupno preživljavanje u odnosu na uzrasne grupe (<18, >18 meseci)

Log Rank (Mantel-Cox) test 4.849 df=2, **p=0.028**

4.3. Analiza molekularno-genetičkih parametara

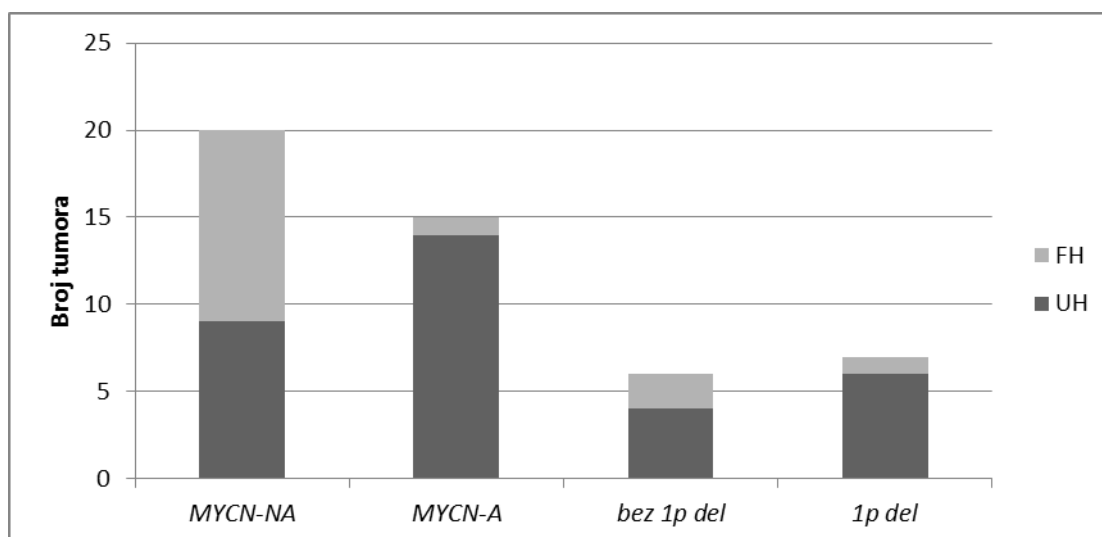
U sprovedenoj studiji uzorak je formiran tako da *MYCN* amplifikacija bude prisutna u 20 (50 %) od 40 NB tumorskih uzoraka. U tim uzorcima, 1p delecija je bila prisutna u 8 (57.14%) od 14 analiziranih, a 17q umnožavanje postojalo je kod 3 (60%) od 5 ispitanih uzoraka. U poređenju sa prognostičkim kategorijama *MYCN* amplifikacija je bila pozitivna kod 14 (60.87%) tumorskih uzoraka iz grupe sa nepovoljnom histološkom prognostičkom grupom, a samo u jednom (8.33%) koji je pripadao histološki povoljnoj prognostičkoj kategoriji (Tabela 18, Grafikon 11).

Tabela 18 Odnos *MYCN* amplifikacije, 1p delecije i histoloških prognostičkih kategorija NB

		Broj tumora N (%)			
		Ukupno	UH	FH	NK
<i>MYCN</i> amplifikacija	Nema	20 (50.0)	9(39.1)*	11 (91.7)*	0
	Ima	20 (50.0)	14 (60.9)*	1 (8.3)*	5 (100.0)
	Ukupno	40 (100.0)	23 (100.0)	12 (100.0)	5 (100.0)
1p delecija	Nema	6 (42.9)	4 (40.0)#	2 (66.7)#	0
	Ima	8 (57.1)	6 (60.0)#	1 (33.3)#	1 (100.0)
	Ukupno	14 (100.0)	10 (100.0)	3 (100.0)	1 (100.0)

FH-povoljna histološka prognostička grupa, UH-nepovoljna histološka prognostička grupa, NK-neklasifikovani

Fisherovim testom je dobijena statistički značajna udruženost *MYCN* amplifikacije i histoloških prognostičkih grupa, $p=0.004$ (Tabela 18, *), dok ta značajnost nije postojala za pojavu 1p delecije (Tabela 18, # $p=0.559$).



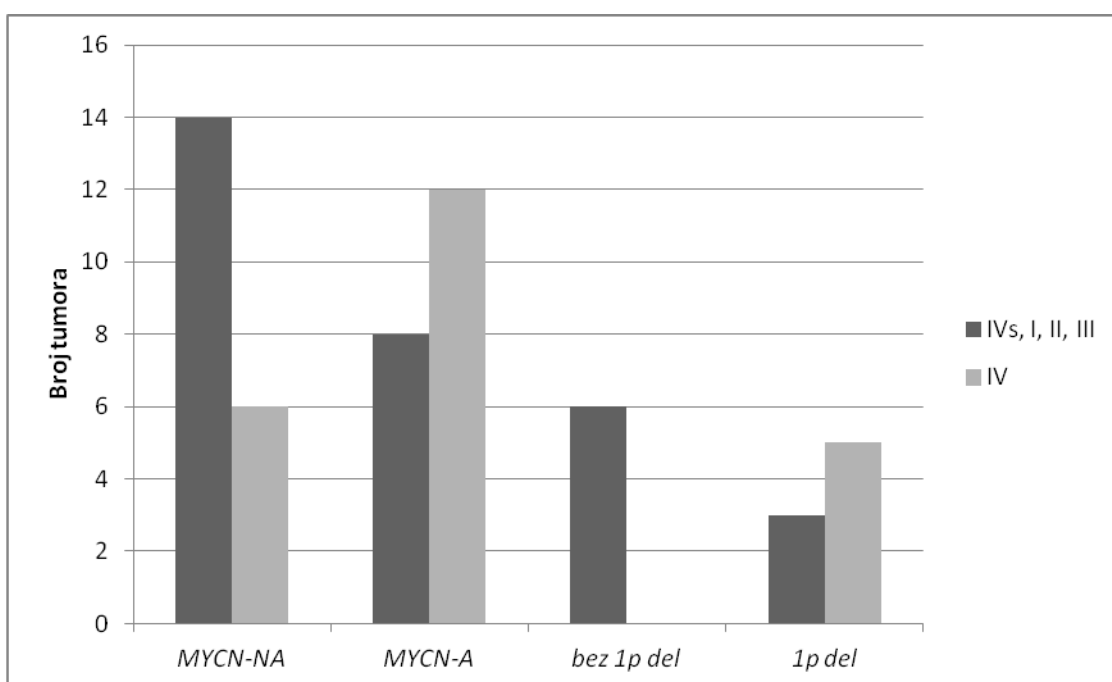
Grafikon 11 Odnos prognostičkih histoloških kategorija i *MYCN* amplifikacije

Sprovedenim ispitivanjima nije nađena *MYCN* amplifikacija kod bolesnika u prvom kliničkom stadijumu, a raspodela po prognostički grupisanim kliničkim stadijumima je prikazana u Tabeli 19 i Grafikonu 12.

Nije nađena statistički značajna udruženost *MYCN* amplifikacije i kliničkih stadijuma ($*p=0.11$), dok je ona postojala za 1p deleciju i udružene kliničke stadijume ($\#p=0.031$).

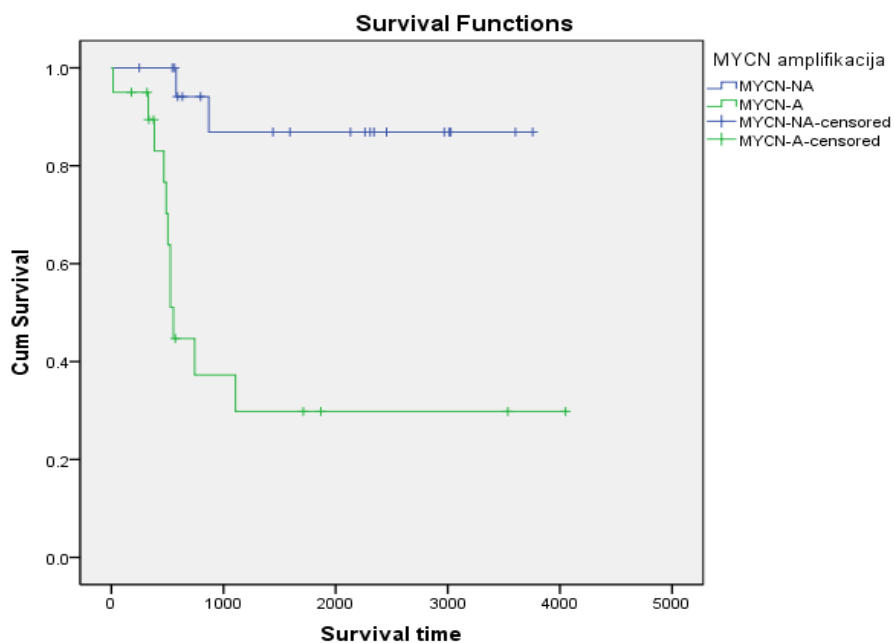
Tabela 19 *MYCN* amplifikacija i 1p delecija u odnosu na klinički stadijum bolesti

		INSS klinički stadijum tumora (N, %)	
Genetički faktor		IVs, I, II, III	IV
<i>MYCN</i> amplifikacija	Nema	14 (63.6)*	6 (33.3)*
	Ima	8 (36.4)*	12 (66.7)*
Ukupno		22 (100.0)	18 (100.0)
1p delecija	Nema	6 (66.7)#	0#
	Ima	3 (33.3)#	5 (100.0)#
Ukupno		9 (100.0)	5 (100.0)



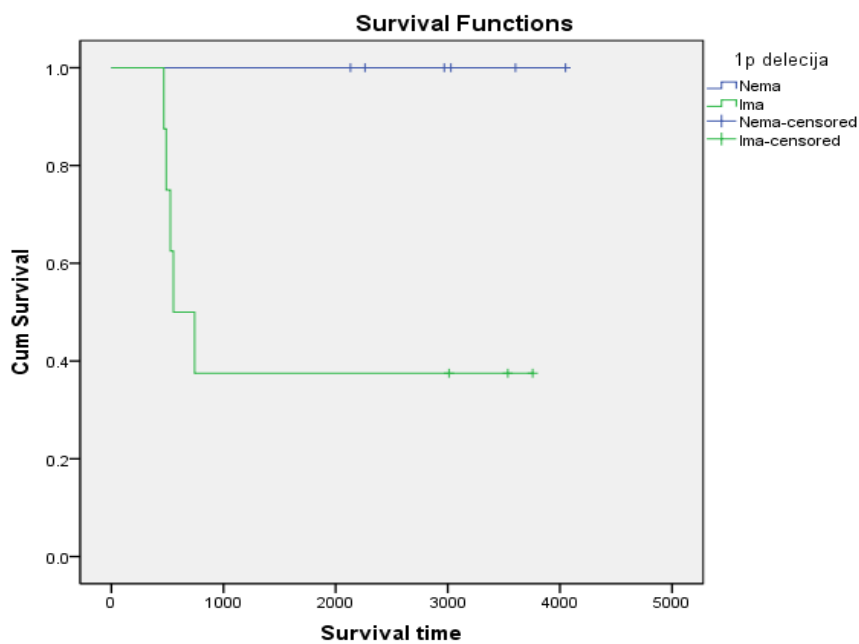
Grafikon 12 Odnos kliničkih stadijuma sa *MYCN* amplifikacijom i 1p delecijom

Analizirano je i preživljavanje u odnosu na prisustvo *MYCN* amplifikacije i 1p delecije i dobijene su statistički značajne razlike u preživljavanju grupa sa i bez ovih alteracija (Grafikon 13, 14). Kod *MYCN* amplifikacije radilo se o visokoj statističkoj značajnosti



Grafikon 13 Ukupno preživljavanje bolesnika sa NB u odnosu na status *MYCN* gena

Log Rank (Mantel-Cox) test $\chi^2=13.679$, $df=1$, $p<0.0005$



Grafikon 14 Ukupno preživljavanje bolesnika sa NB u odnosu na prisustvo 1p delecije

Log Rank (Mantel-Cox) test $\chi^2=5.221$, $df=1$, $p=0.022$

4.4. Elektronskomikroskopska analiza

4.4.1. Ultrastrukturne karakteristike NT

Ultrastrukturna analiza urađena je na uzorcima 20 bolesnika, kod kojih su postojali sačuvani smrznuti uzorci svežeg tumorskog tkiva. Analiziranu grupu je činilo po pet uzoraka tumorskog tkiva GN i iGNB i deset uzoraka NB (pet slabodiferentovanog i pet nediferentovanog podtipa) (Tabela 20).

Tabela 20 Kliničkopatološke karakteristike ultrastrukturno analizirane grupe bolesnika

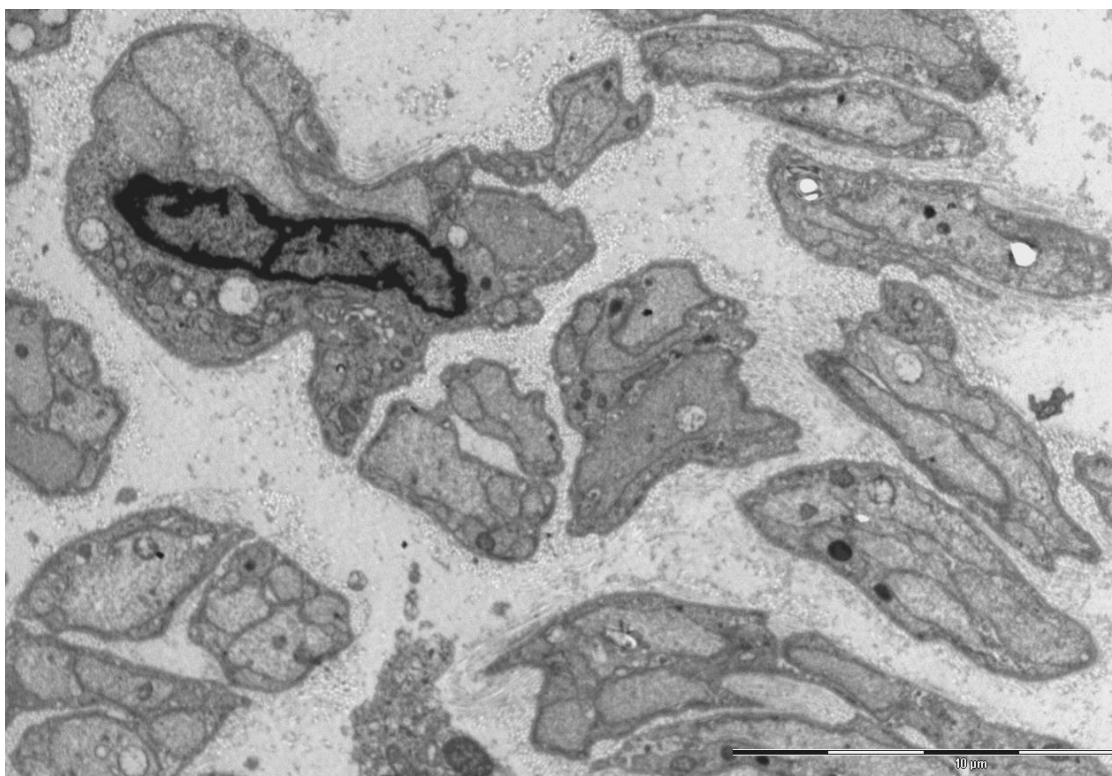
Rb	Uzrast	Lokalizacija	NT		INPC prognostička grupa	<i>MYCN</i> amplifikacija
1	72	abdomen	GN		FH	
2	57	medijastinum	GN		FH	
3	191	medijastinum	GN		FH	
4	57	medijastinum	GN		FH	
5	89	medijastinum	GN		FH	
6	8	karlica	iGNB		FH	
7	42	karlica	iGNB		FH	ne
8	98	abdomen	iGNB		FH	ne
9	51	adrenalno	iGNB		FH	ne
10	30	medijastinum	iGNB		FH	ne
11	32	medijastinum	NB	PD	UH	ne
12	18	abdomen, medijastinum	NB	PD	FH	ne
13	64	adrenalno	NB	PD	UH	da
14	3	kičmeni stub	NB	PD	FH	ne
15	6	adrenalno	NB	PD	FH	ne
16	26	abdomen	NB	UD	UH	da
17	36	abdomen	NB	UD	UH	ne
18	23	abdomen	NB	UD	UH	da
19	51	abdomen	NB	UD	UH	ne
20	20	adrenalno	NB	UD	UH	da

GN, ganglioneurom; iGNB, intermiksni ganglioneuroblastom; NB, neuroblastom; PD, slabodiferentovan; UD, nediferentovan; FH, povoljna histološka prognoza; UH, nepovoljna histološka prognoza

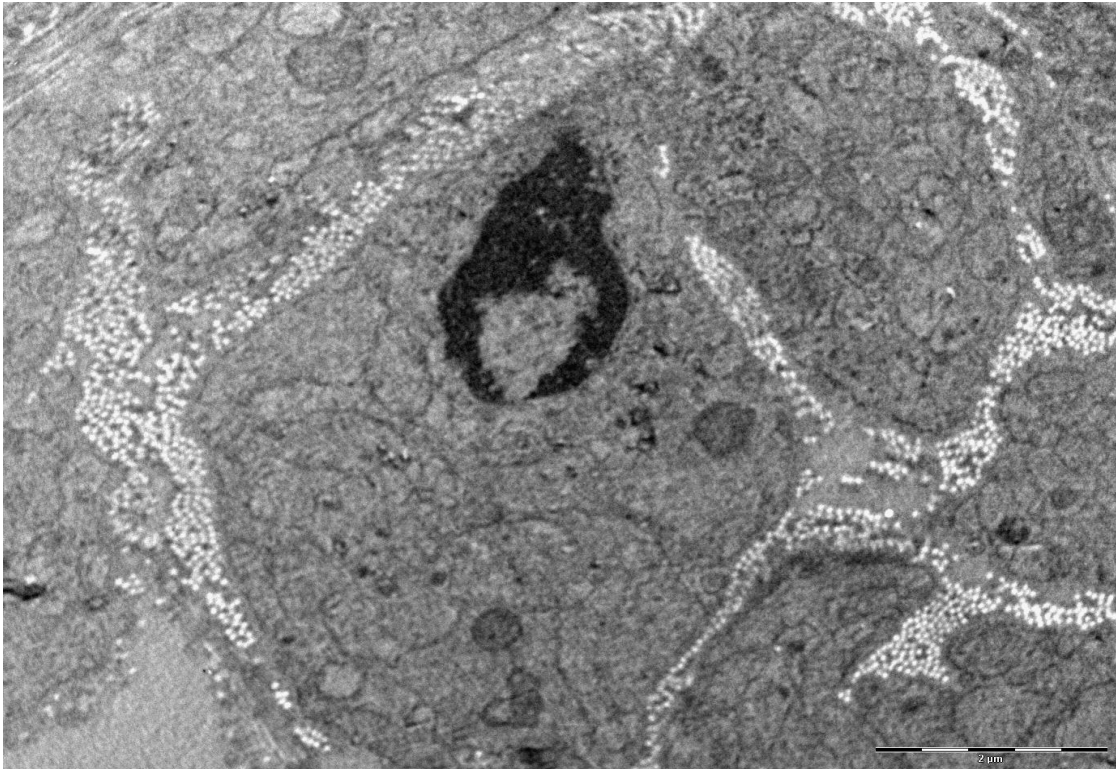
Ovu grupu je činilo 13 dečaka i 7 devojčica, prosečnog uzrasta 48.7 meseci. Uzrast se kretao od 3 meseca do 15 godina i 11 meseci. Grupa bolesnika sa GN i iGNB je bila starija (68.5 ± 50.24 meseci), sa češćom lokalizacijom tumora u medijastinumu, dok su bolesnici sa NB bili mlađi (27.9 ± 18.88 meseci) sa češćom lokalizacijom u

abdomenu (Tabela 20). Kod četiri bolesnika tumorske ćelije su imale *MYCN* amplifikaciju.

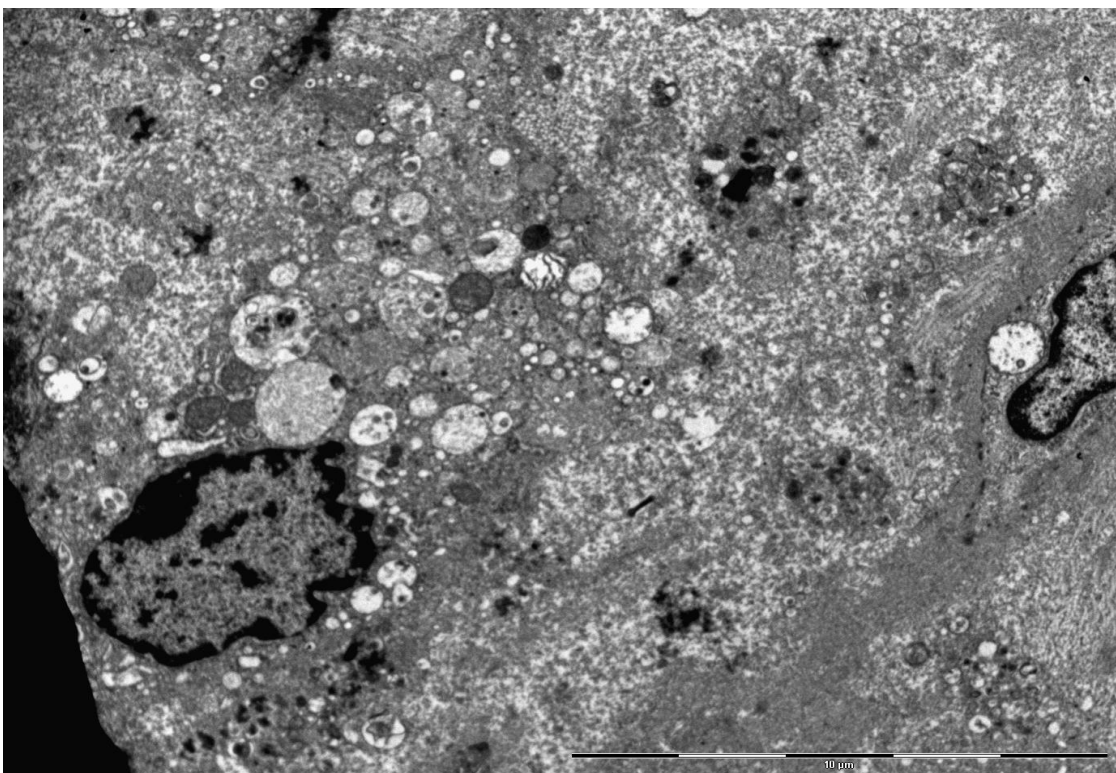
Ultrastrukturno u uzorcima GN uočavaju se nemijelinska i mijelinska vlakna sa brojnim Schwann ćelijama, kolagenim vlaknima i retkim ganglijskim ćelijama sa neuritskim produžecima, velikim euhromatičnim jedrima i velikum jedarcima (Slika 17). Prisutne su brojne citoplazmatske organele uključujući slobodne ribosome, granulisani ER, prominentni Goldži aparat, mitohondrije i sekretorne granule, kao i brojni neurotubuli. U uzorcima iGNB uočavale su se ćelije svih prelaznih oblika od neuroblasta do ganglijskih ćelija, Schwann ćelije i fokalno neuropil (Slika 18). Uzorci neuroblastoma su imali manje diferentovan izgled, oskudnu citoplazmu, nepravilna jedra i jedarca umerene veličine (Slika 19, 20). U slabo diferentovanom podtipu NB uočava se neuropil. U najvećem broju NB prisutne su neurosekretorne granule, brojnije u produžecima. Ultrastrukturno su uočene i apoptotski promenjene ćelije, pretežno u NB tumorima (Slika 21).



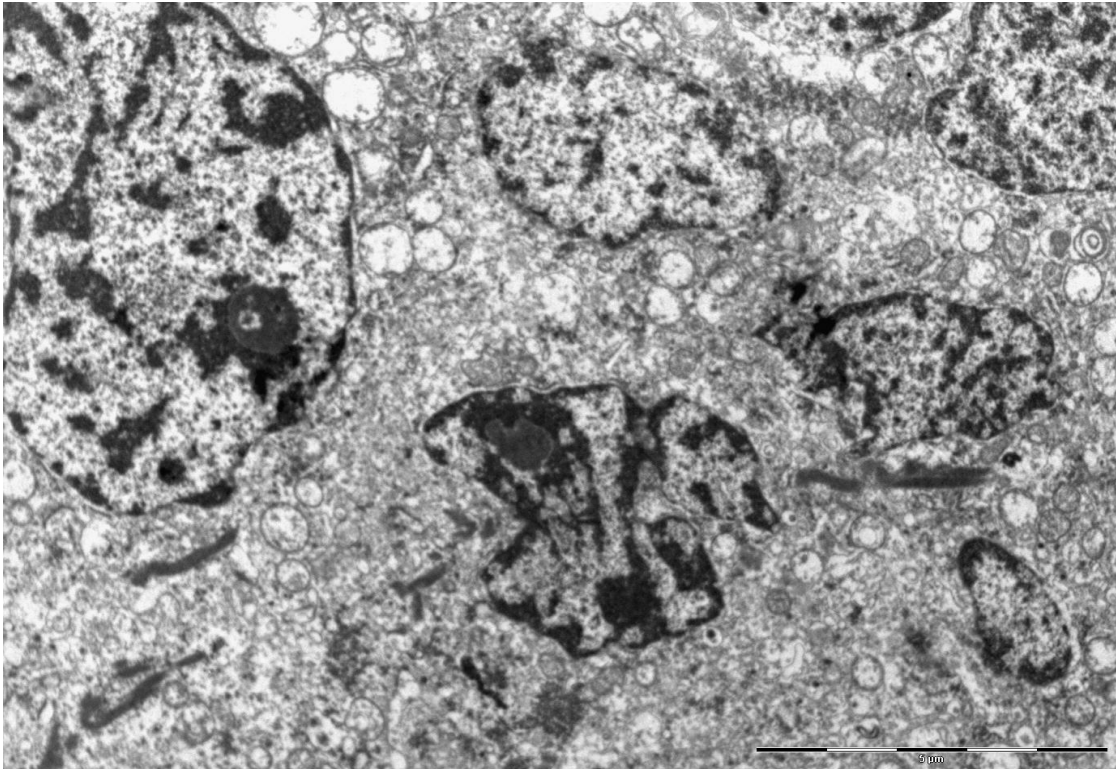
Slika 17 TEM fotomikrografija ultrastrukturnog izgleda ganglioneuroma



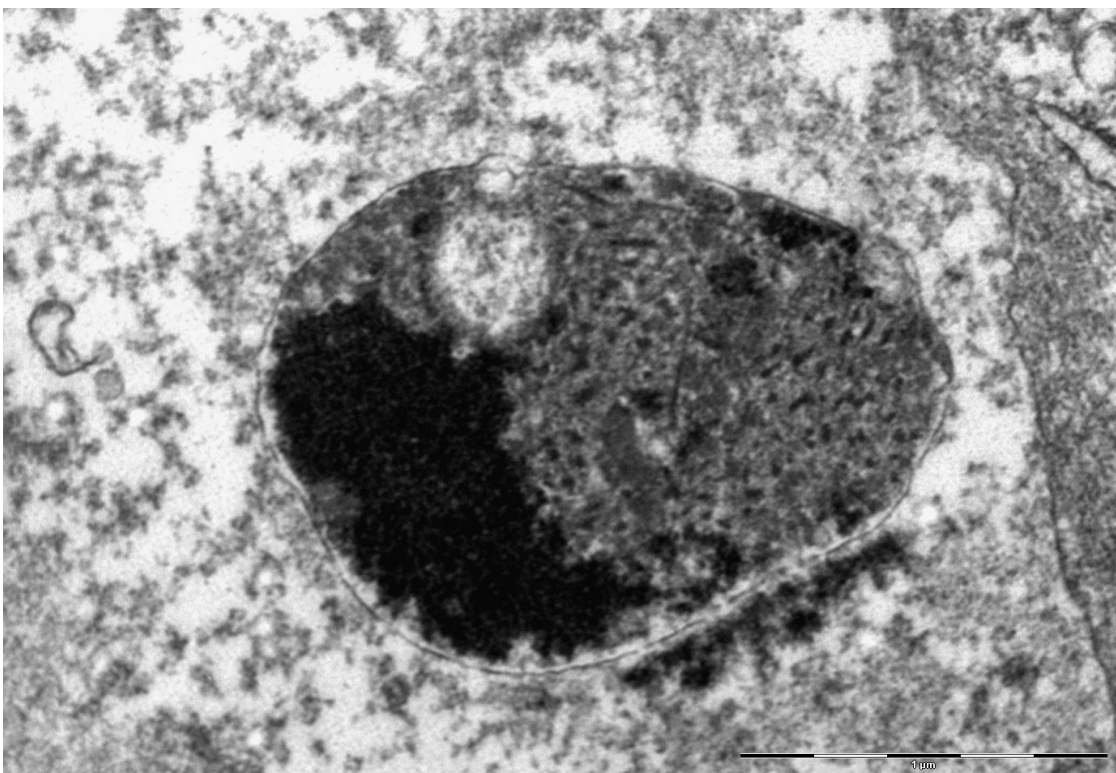
Slika 18 TEM fotomikrografija ultrastrukturnog izgleda intermiksnoG GNB



Slika 19 TEM fotomikrografija ultrastrukturnog izgleda slabo diferentovanog NB



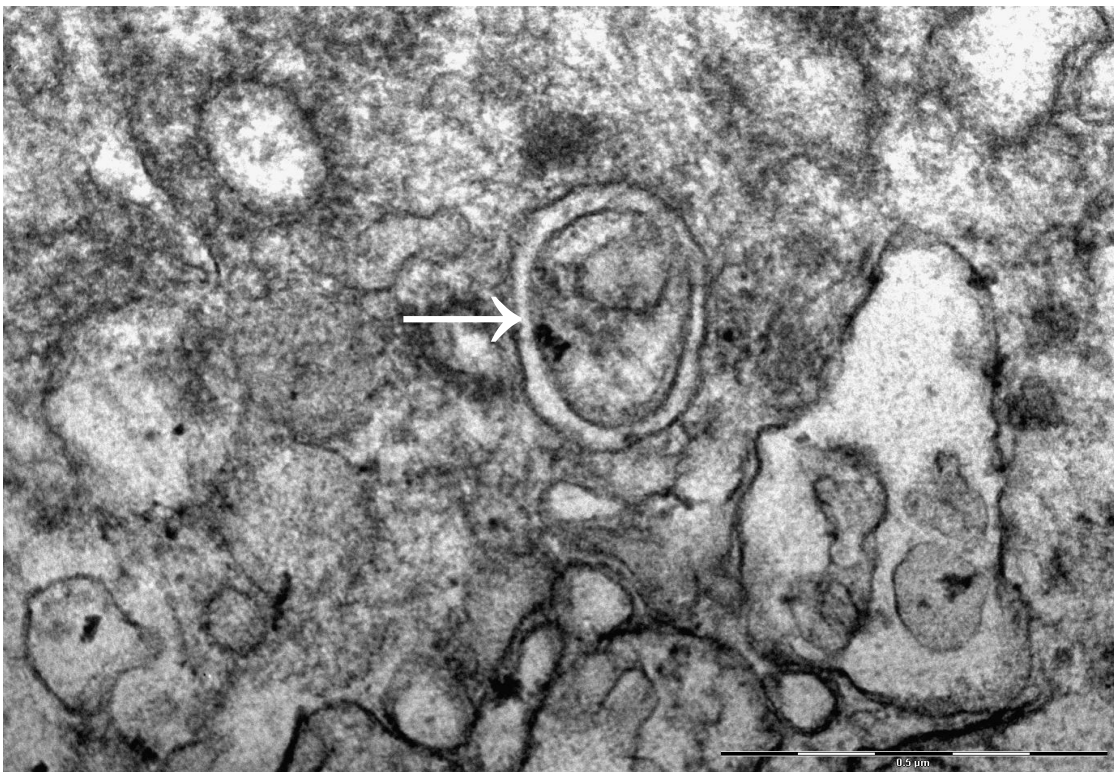
Slika 20 TEM fotomikrografija ultrastrukturnog izgleda nediferentovanog NB



Slika 21 Apoptična NB ćelija sa kondenzacijom hromatina uz jedarnu membranu

4.4.2. Autofagija u NT

U ćelijama svih analiziranih tipova NT primećene su autofagne vakuole (AV). Viđene su i rane autofagne vakuole (autofagozomi) sa duplom membranom oko komponenti predodređenih za degradaciju (Slika 22) i kasne autofagne vakuole (autolizozomi), strukture sa jednostrukom membranom (Slika 23-25).



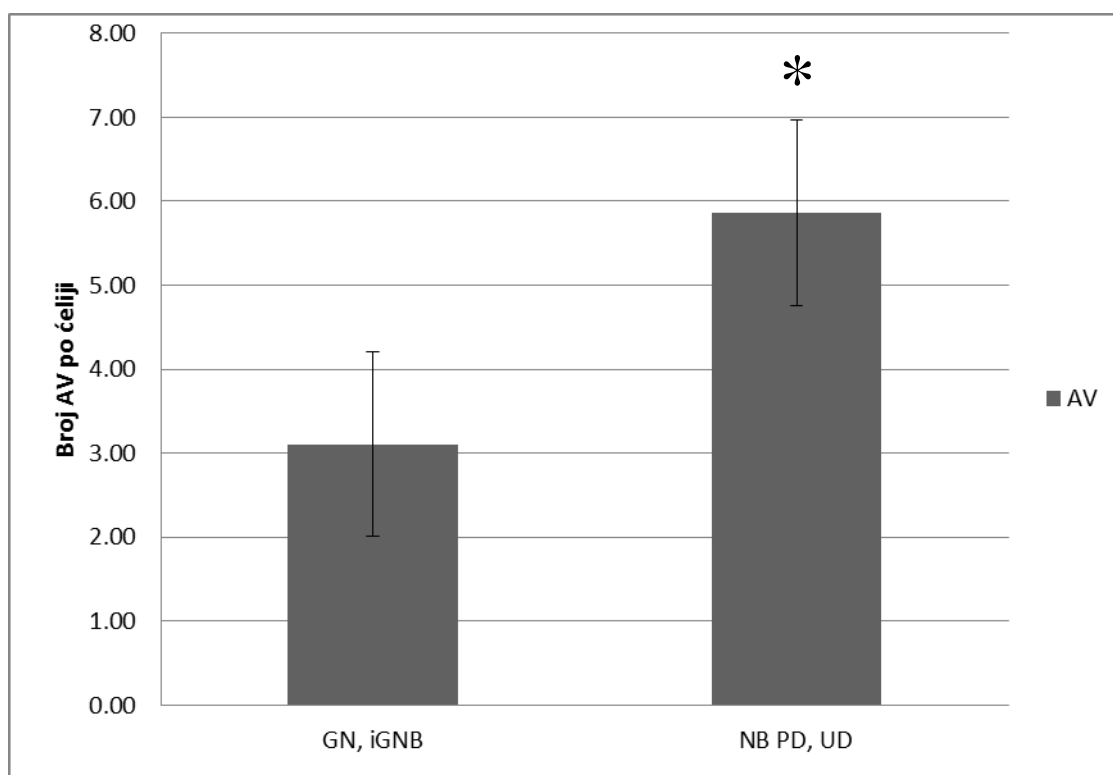
Slika 22 Ćelija NT u kojoj se uočava autofagozom

Autofagne vakuole su brojane u 60 ćelija svakog analiziranog uzorka, a njihov broj je izražavan kao prosečan broj autofagnih vakuola po ćeliji. Neki tipovi NT, kao GN su imali mali broj autofagnih vakuola po ćeliji. Urađeno je poređenje broja AV po ćeliji između grupe bolesnika sa jasno povoljnom prognozom (GN i iGNB) i grupe sa NB, čija je prognoza često loša i dobijena je statistički značajna razlika (Grafikon 15, Tabela 21).

Tabela 21 Broj autofagnih vakuola po ćeliji u različitim tipovima NT

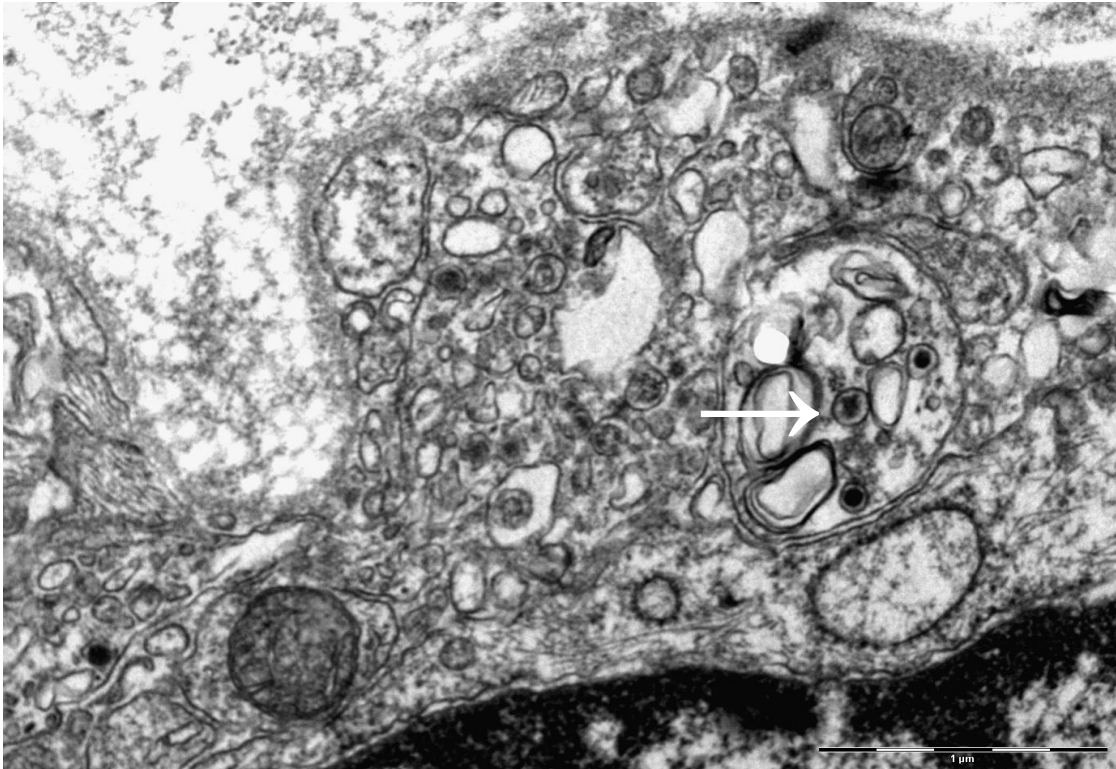
Tip tumora	AV ± SD
GN	2.24 ± 0.89
iGNB	3.97 ± 1.43
NB PD	4.69 ± 1.07
NB UD	7.03 ± 3.24

AV autofagne vakuole, SD standardna devijacija, GN ganglioneurom, iGNB ganglioneuroblastom, NB PD neuroblastom slabodiferentovan, NB UD neuroblastom nediferentovan

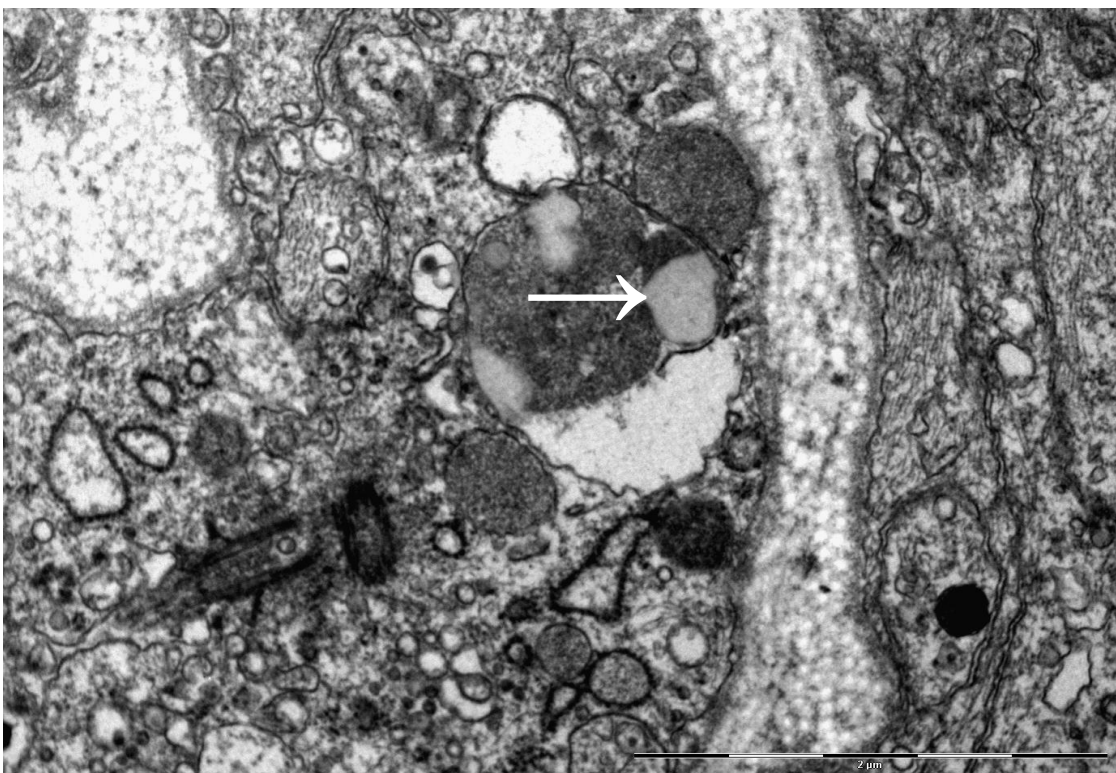


Grafikon 15 Distribucija autofagnih vakuola prema histološkom tipu NT
(* GN, iGNB vs NB, $p < 0.05$)

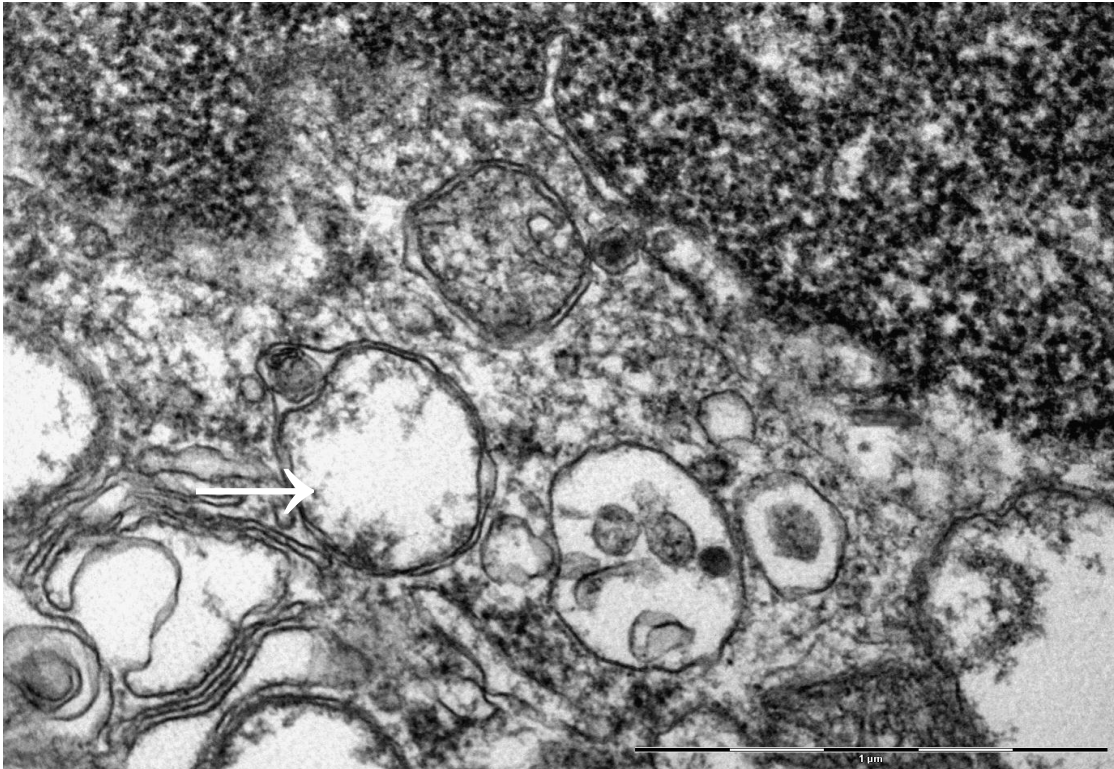
Iako se u lumenu autolizozoma najčešće nalazio nerazpoznatljiv membranski i citoplazmatski sadržaj, uočeni su i različiti oblici selektivne autofagije. Najčešće su u lumenu autolizozoma viđane sekretorne granule (krinofagija) (Slika 23), potom su uočavane jedna ili više lipidnih kapljica (lipofagija) (Slika 24) i strukture koje su odgovarale mitohondrijama, pretežno oštećenog izgleda (mitofagija) (Slika 25).



Slika 23 Krinofagija, selektivna autofagija sekretornih granula u autolizozomu



Slika 24 Lipofagija, selektivna autofagija masne kapi u autolizozomu

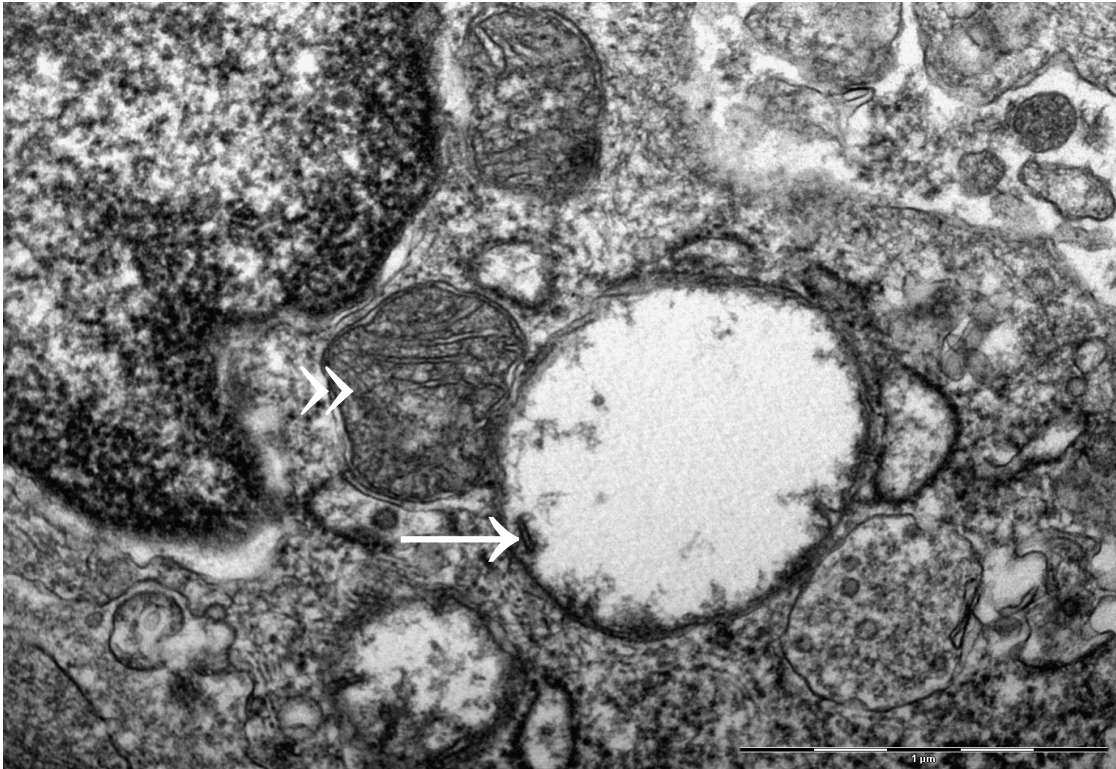


Slika 25 Mitofagija, u autolizozomu se uočavaju elementi koji odgovaraju delovima oštećene mitohondrije

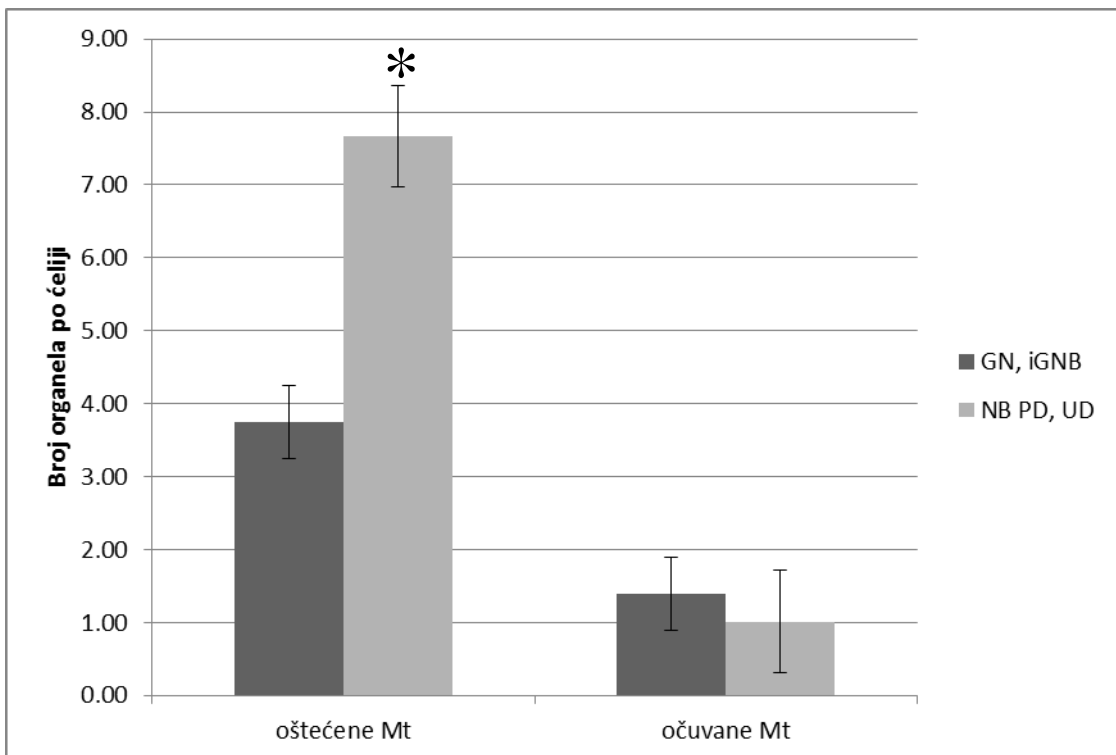
4.4.3. Mitohondrije, endoplazmatski retikulum i druge organele u NT

U ispitivanim uzorcima uočene su mitohondrije uobičajenog izgleda (Slika 26) ali i promenjene, velike, degenerativne mitohondrije (Slika 26, 27). U nekim mitohondrijama uočena su samo fokalna zatamnjenja (Slika 28) što se smatra ranim elementom ireverzibilnog ćelijskog oštećenja.

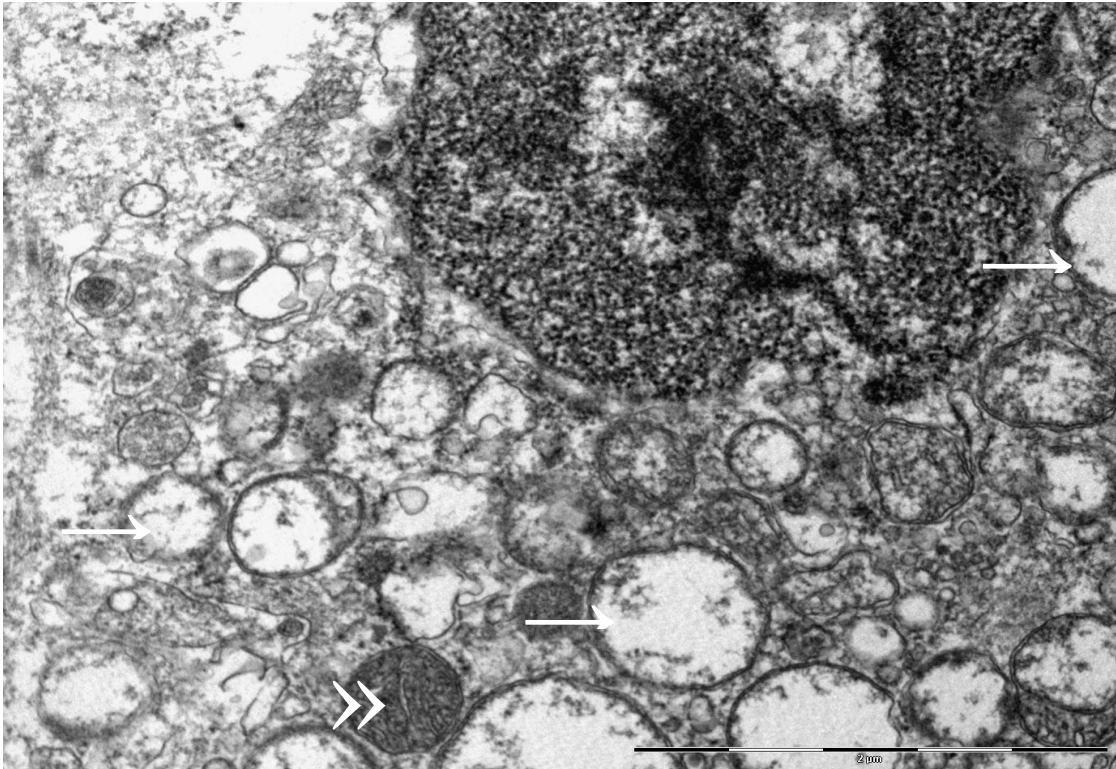
Brojane su normalne i oštećene mitohondrije i nađen je statistički značajno veći broj oštećenih mitohondrija po ćeliji u NB tumorskim uzorcima u poređenju sa prognostički dobrom grupom koju čine GN i iGNB (Tabela 22, Grafikon 16).



Slika 26 Edematozna, oštećena (→) i očuvana (») mitohondrija



Grafikon 16 Odnos broja oštećenih i očuvanih mitohondrija u NT
 (* GN, iGNB vs NB, $p < 0.05$)



Slika 27 Brojne oštećene (→) mitohondrije sa pojedinačnim (») očuvanog izgleda



Slika 28 Fokalno zatamnjenje mitohondrija

Tabela 22 Prosečan broj oštećenih i očuvanih mitohondrija po ćeliji NT

	Oštećene Mt (N ± SD)	Očuvane Mt (N ± SD)
GN, iGNB	3.75 ± 0.54	1.39 ± 0.74
NB PD, UD	7.67 ± 2.01	1.01 ± 0.77

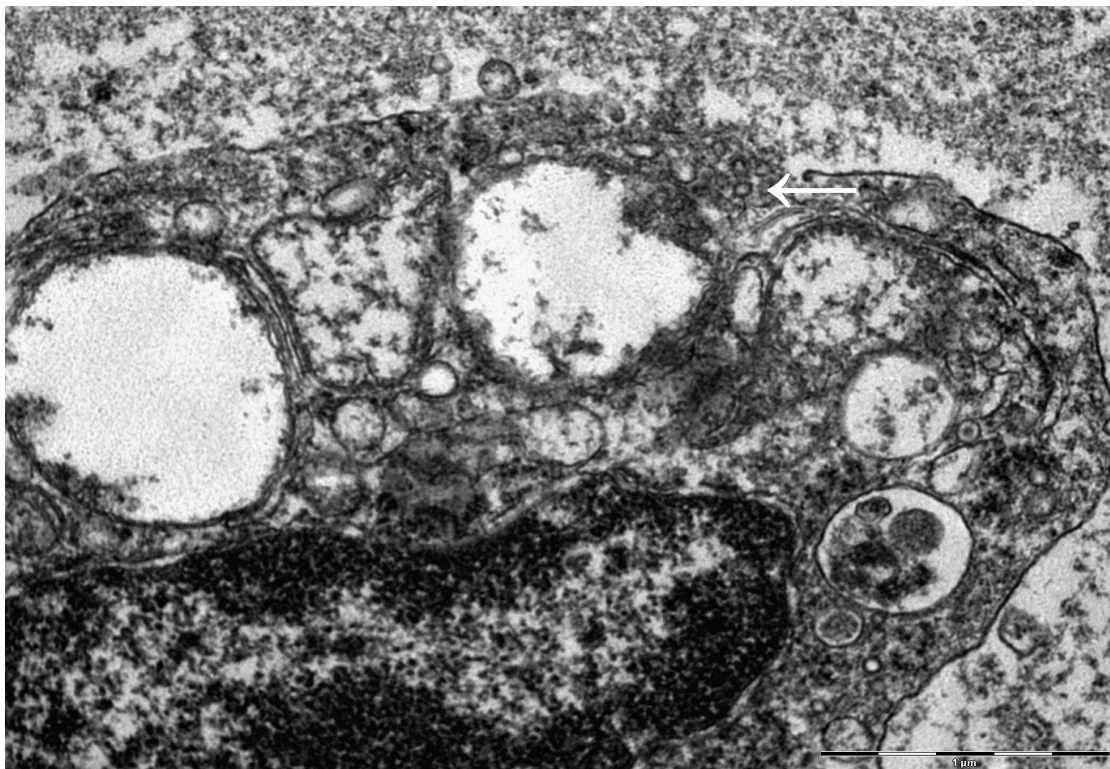
SD-standardna devijacija, GN-ganglioneurom, iGNB-ganglioneuroblastom, NB PD-neuroblastom slabodiferentovan, NB UD-neuroblastom nediferentovan

Takođe su brojane i druge organele kao klatrinske vezikule (Slika 29), multivezikularna tela (Slika 30) i lipidne kapi i kod njihovog međusobnog poređenja nije nađena statistička značajnost (Tabela 23).

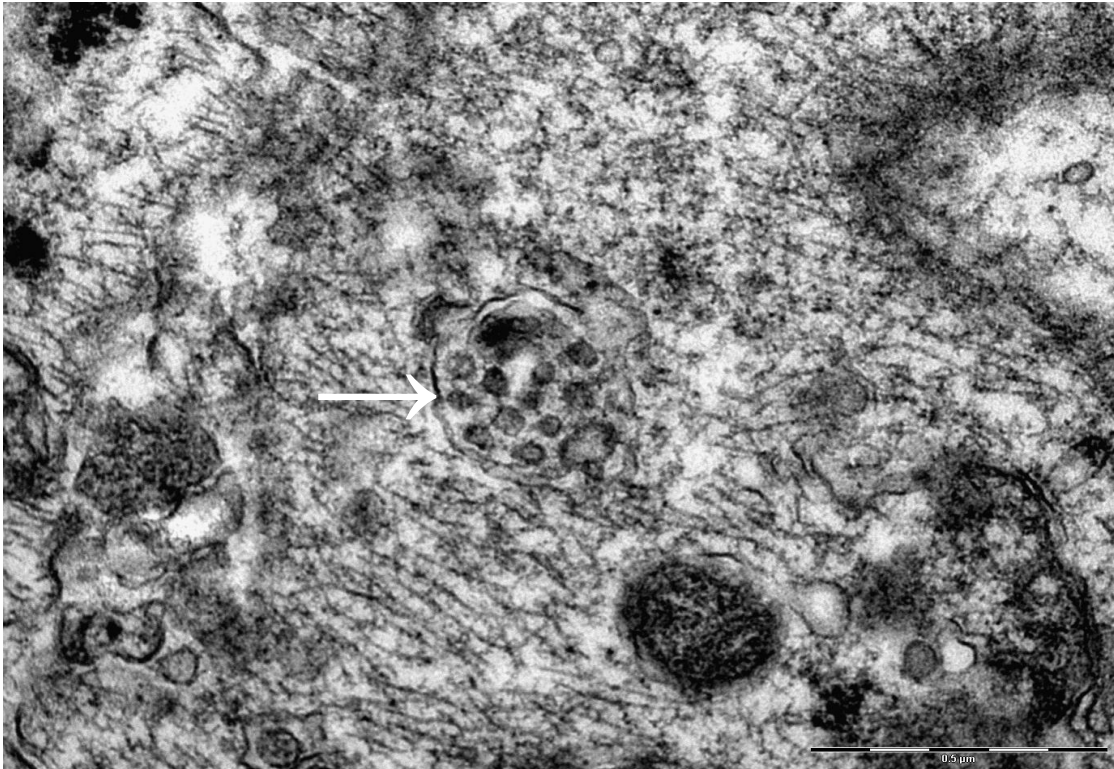
Tabela 23 Prosečan broj organela po ćeliji NT

	Multivezikularna tela (N ± SD)	Masne kapi (N ± SD)	Klatrinske vezikule (N ± SD)
GN, iGNB	0.08 ± 0.04	0.04 ± 0.02	0.01 ± 0.02
NB PD, UD	0.13 ± 0.09	0.13 ± 0.2	0.03 ± 0.04

SD-standardna devijacija, GN-ganglioneurom, iGNB-ganglioneuroblastom, NB PD-neuroblastom slabodiferentovan, NB UD-neuroblastom nediferentovan



Slika 29 Klatrinske vezikule u ćeliji NB



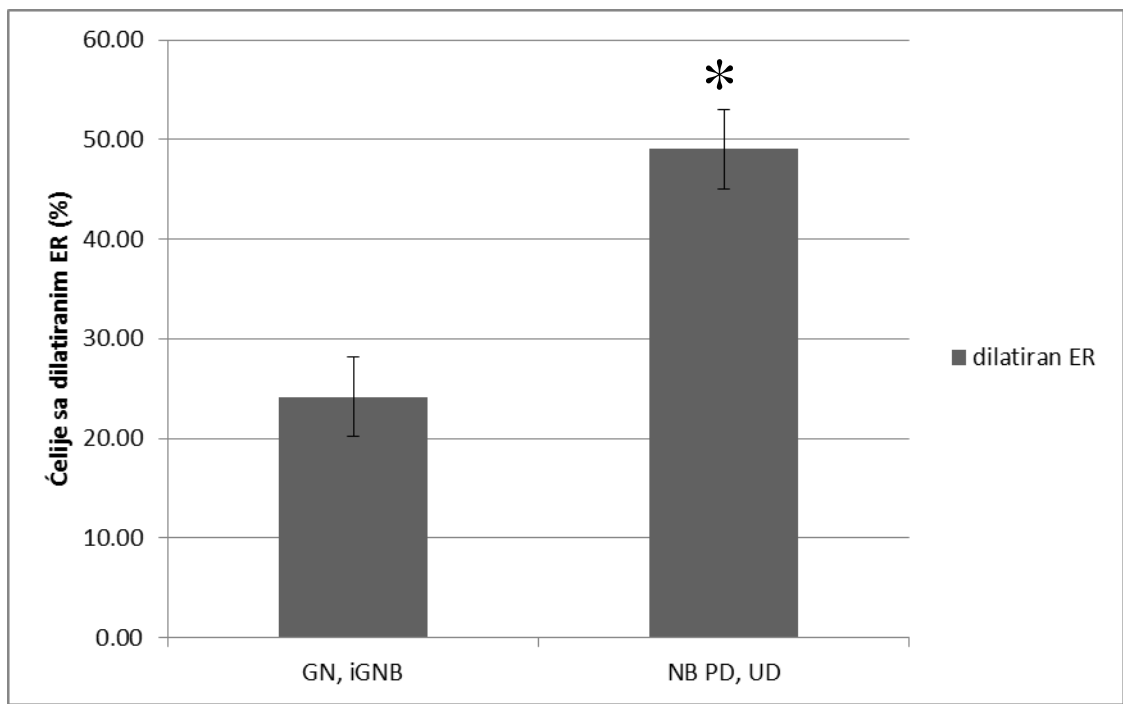
Slika 30 Multivezikularna tela u ćeliji NT

Istovremeno je određivan i broj ćelija u uzorku u kojima je uočena dilatacija endoplazmatskog retikuluma (Slika 31, 32), naglašeni poliribozomi i neurotubuli, a vrednosti su izražene kao procenat ukupnog broja pregledanih ćelija po uzorku i kao prosečna vrednost za svaki tip tumora (Tabela 24). Kada su međusobno upoređene prosečne vrednosti za grupu sa dobrom prognozom (GN i iGNB) i grupe sa lošijom prognozom (NB, PD i UD) dobijena je statistički značajna razlika prisustva dilatiranog endoplazmatskog retikuluma (Grafikon 17), a kod ostalih parametara te razlike nije bilo.

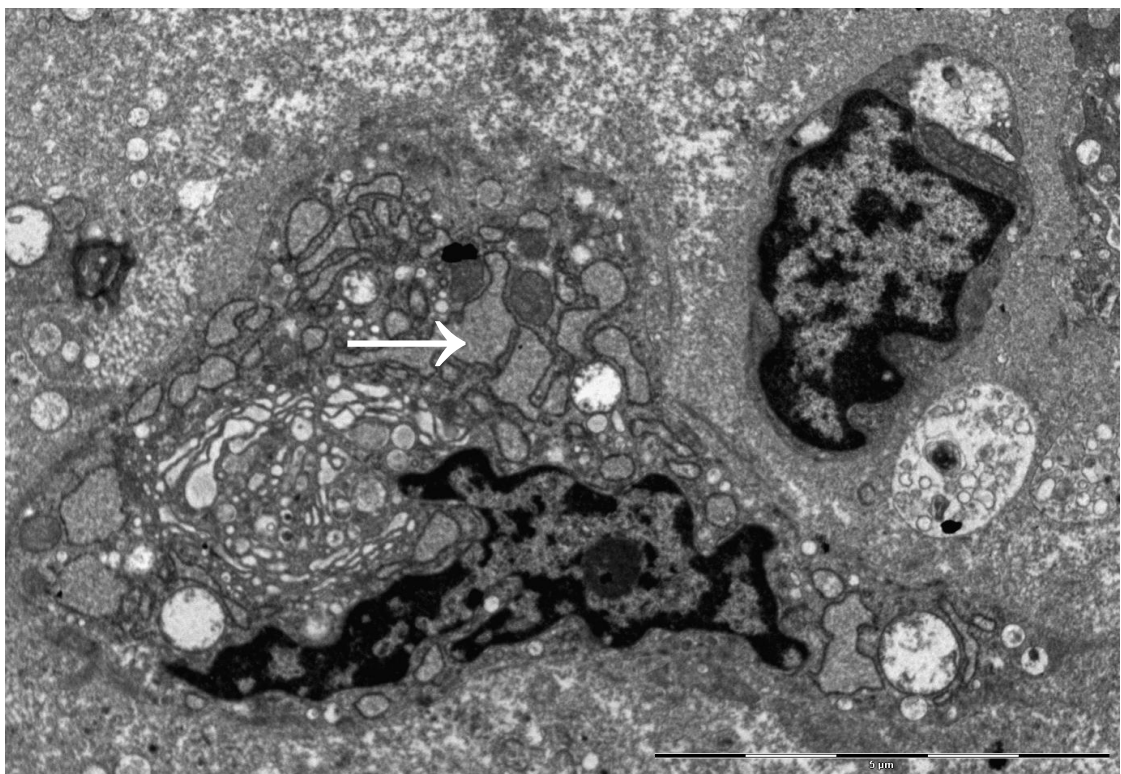
Tabela 24 Procenat ćelija NT sa dilatiranim ER, naglašenim poliribozomima i neurotubulima

	Dilatiran ER (% ± SD)	Naglašeni poliribozomi (% ± SD)	Naglašeni neurotubuli (% ± SD)
GN, iGNB	24.17 ± 4.33	25.17 ± 16.4	12.33 ± 7.98
NB PD, UD	49.05 ± 7.05	22.15 ± 22.32	8.56 ± 10.37

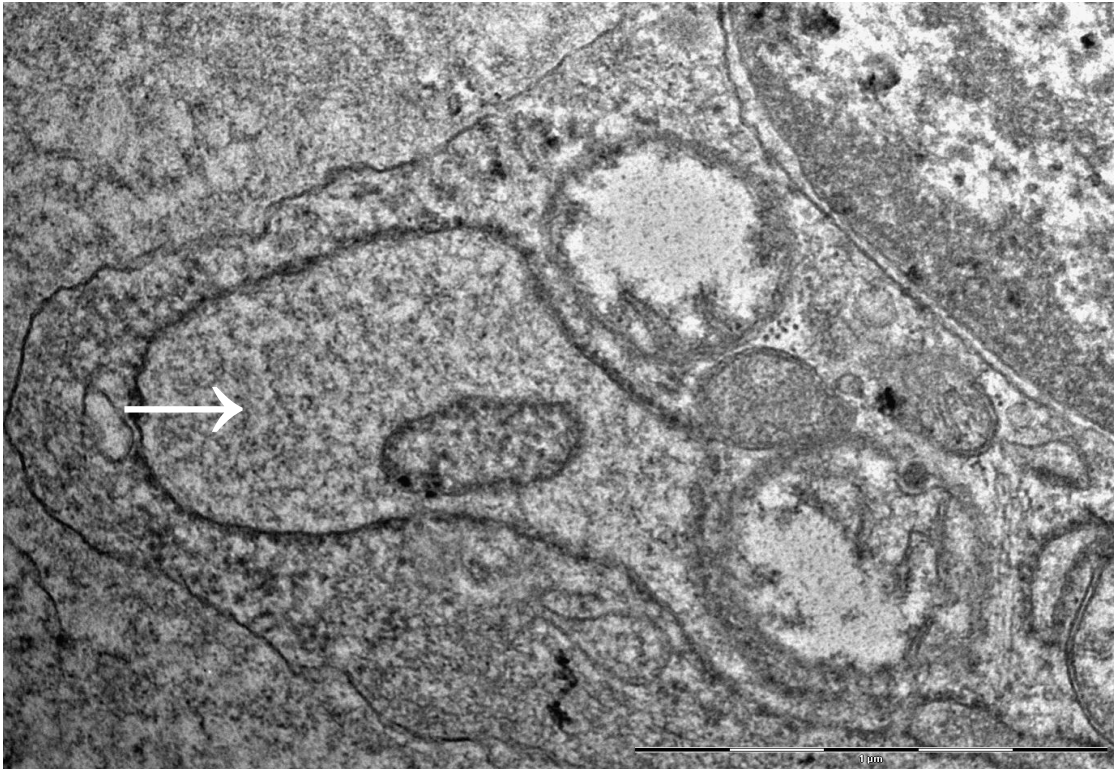
SD-standardna devijacija, GN-ganglioneurom, iGNB-ganglioneuroblastom, NB PD-neuroblastom slabodiferentovan, NB UD-neuroblastom nediferentovan



Grafikon 17 Distribucija dilatiranog ER prema histološkom tipu NT
 (* GN, iGNB vs NB, $p < 0.05$)



Slika 31 Dilatiran endoplazmatski retikulum u ćeliji NB



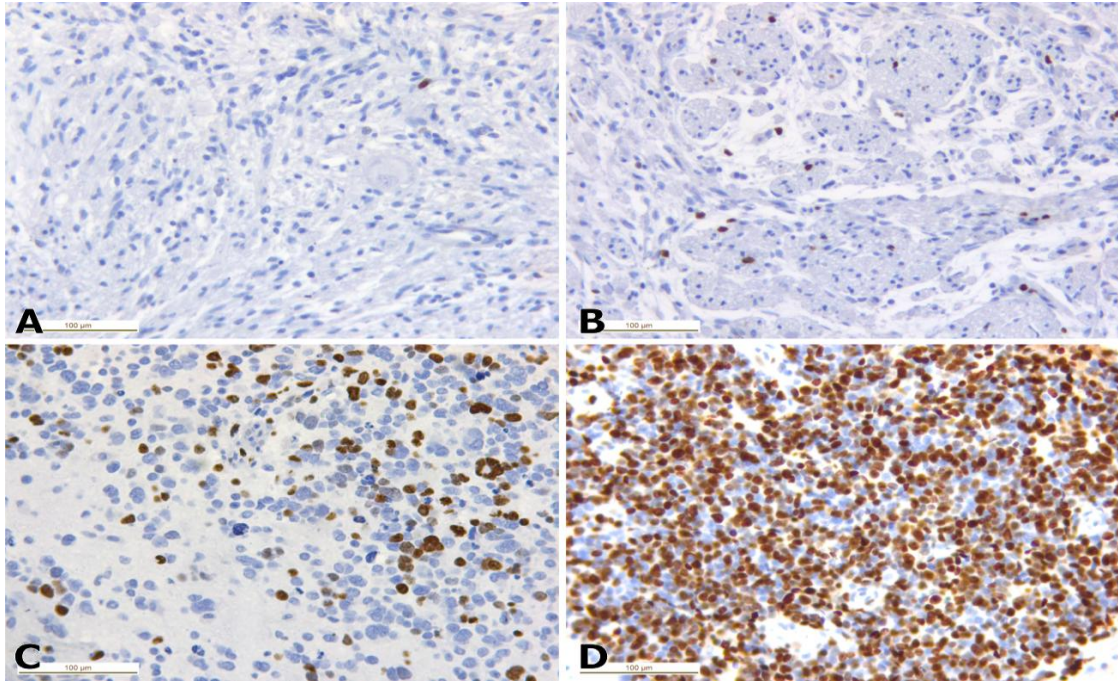
Slika 32 Dilatiran endoplazmatski retikulum u ćeliji NB

4.4.4. Odnos broja AV sa *MYCN* amplifikacijom i proliferacionim indeksom

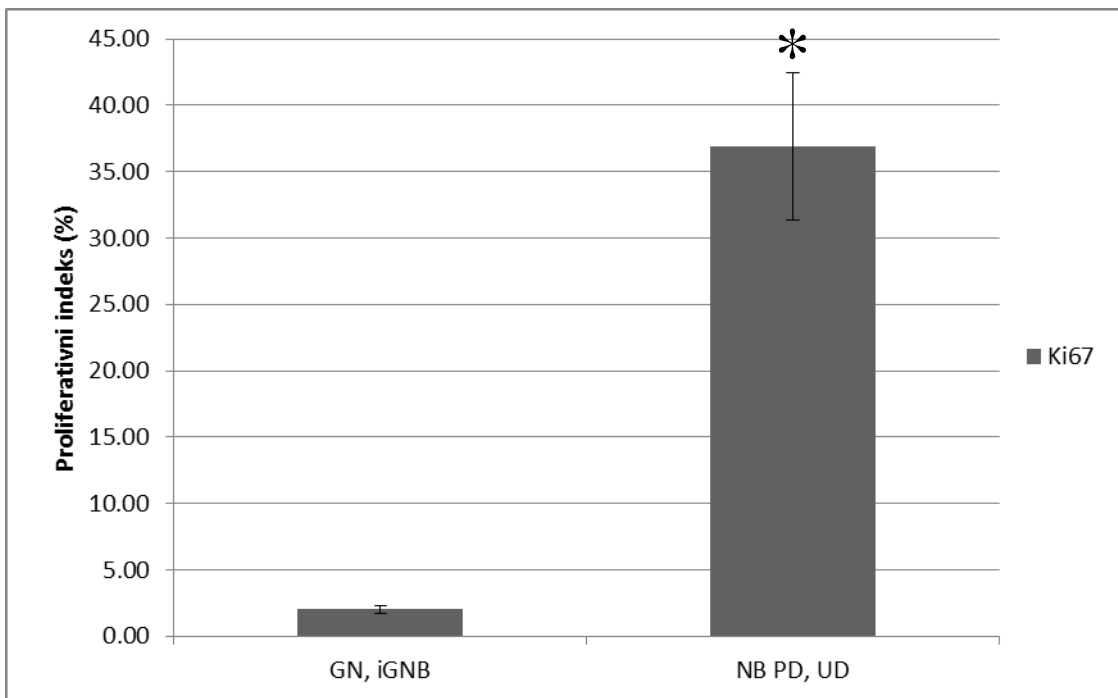
Proliferacioni indeks je procenjivan na Ki-67 imunohistochemijski obojenim pločicama. GN uzorci su pokazivali pozitivnost samo retkih, pojedinačnih ćelija (Slika 33). Oskudna pozitivnost je primećena i u uzorcima iGNB, dok je difuzna i intenzivna pozitivnost zabeležena u uzorcima NB (Slika 33).

Proliferacioni indeks se kretao od 0% do 80%, sa prosečnom vrednošću 2.02 ± 1.19 % za GN i iGNB, i 36.89 ± 19.76 % za NB. Procenat Ki-67 pozitivnih ćelija je udružen sa brojem AV i statistički značajno viši u uzorcima NB u poređenju sa dobrom prognostičkom grupom (GN i iGNB) (Grafikon 18).

Nije nađena statistički značajna veza između *MYCN* amplifikacije i broja AV.



Slika 33 Ki-67 obeležena proliferativna aktivnost u A) Ganglioneuromu, B) Intermiksnom ganglioneuroblastomu, C) i D) Neuroblastomu (x200)

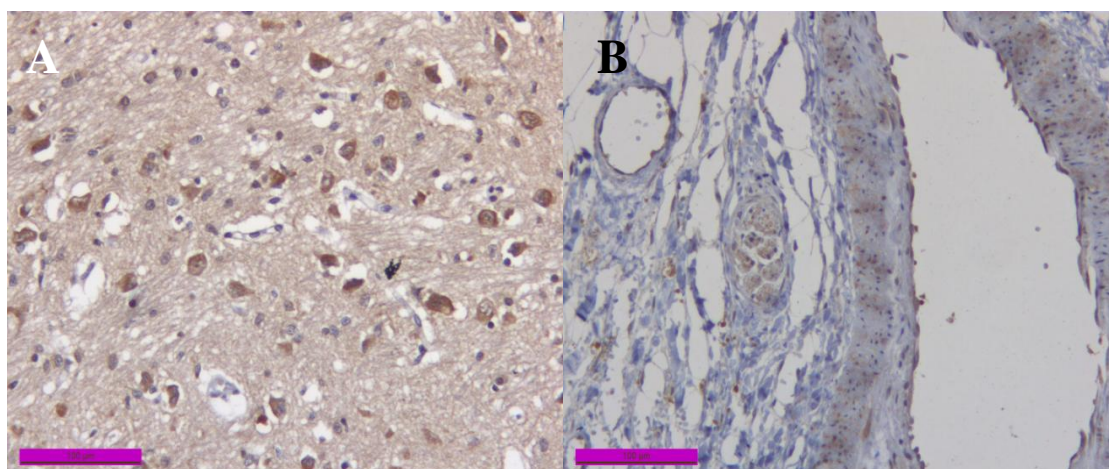


Grafikon 18 Procenat Ki-67 obeleženih ćelija kod različitih tipova NT (* GN, iGNB vs NB, $p < 0.001$)

4.4. Imunohistohemijska analiza NT

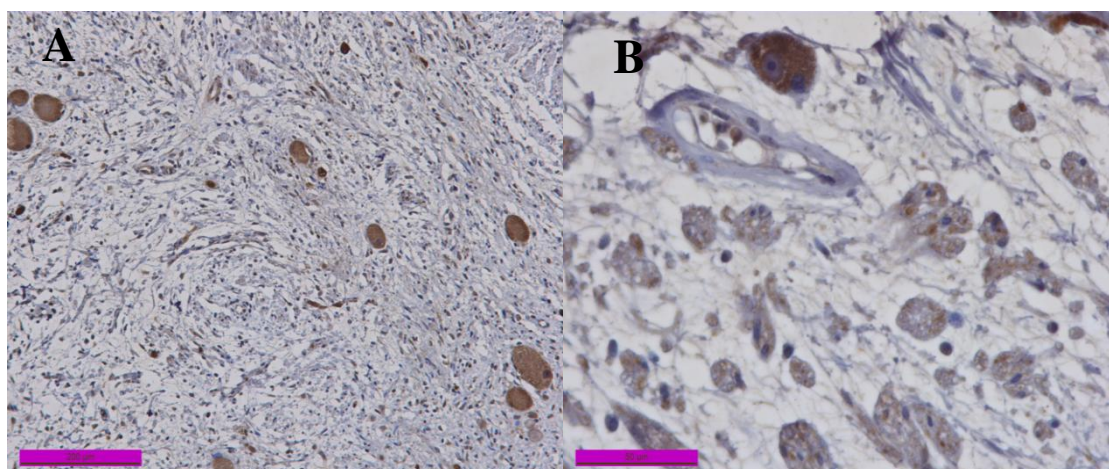
4.4.1. Imunohistohemijska analiza autofagije LC3B antitelom

Jaka, tačkasta (dot-like) LC3B pozitivnost je uočena u neuronima moždanog tkiva, perifernim nervima i perivaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (Slika 34), kao i makrofagnim ćelijama u kontrolnim uzorcima i normalnom tkivu prisutnom na periferiji tumorskih uzoraka.



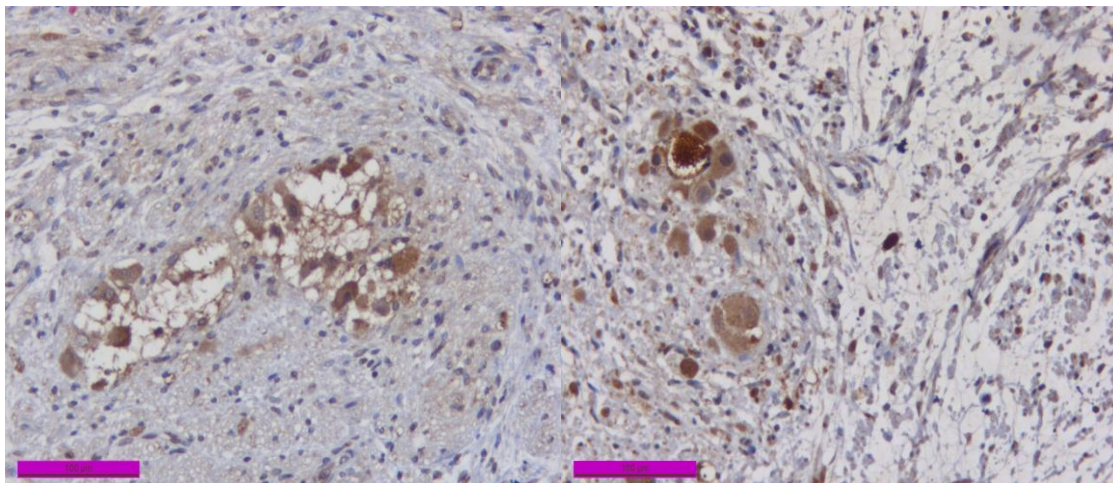
Slika 34 LC3B pozitivnost u A) moždanom tkivu i B) krvnim sudovima i nervu (x200)

Imunoreaktivni skor je određivan za uzorke svih tipova NT, brojana je samo tačkasta, citoplazmatska pozitivnost. LC3B ekspresija je zabeležena u svim uzorcima NT (Slika 35-39).



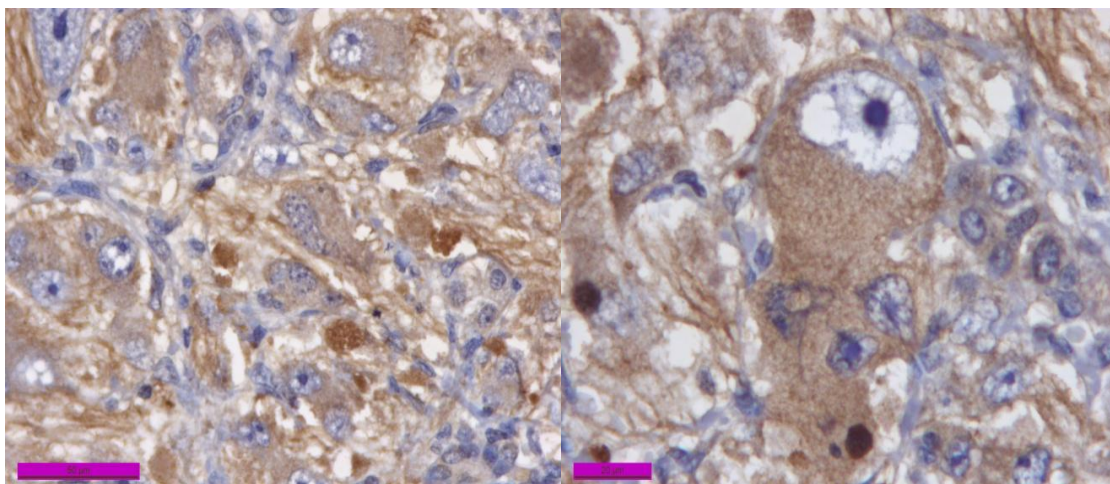
Slika 35 LC3B u GN, A) jako pozitivne ganglijske ćelije (x100), B) u osnovi blaga pozitivnost sa jednom jako pozitivnom ganglijskom ćelijom (x400)

U uzorcima GN i iGNB nije zabeležena jaka LC3B pozitivnost izuzev u pojedinačnim ganglijskim ćelijama i mikroskopskim ostrvcima NB (Slika 35, 36).



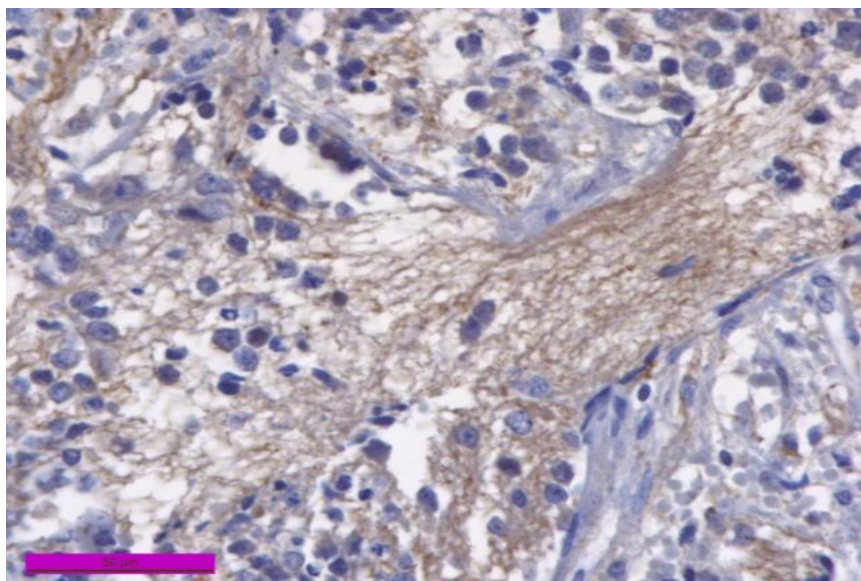
Slika 36 LC3B u iGNB, blaga do umerena pozitivnost, sa jakom imunoekspresijom u ostrvcima NB

Visoka LC3B pozitivnost je viđena u diferencirajućem podtipu NB (Slika 37).



Slika 37 LC3B izrazita imunoreaktivnost u NB diferencirajućeg podtipa

Uočena je značajno veća ekspresija LC3B imunoreaktivnosti u NB tumorima u odnosu na GN i iGNB. Kada je analizirana LC3B ekspresija samo u grupi NB, nije bilo značajne razlike u raspodeli LC3B skora u odnosu na grupe kliničkog stadijuma, histološke prognostičke grupe, status *MYCN* gena, kao ni uzrast bolesnika (Tabela 25). U uzorcima NB primećena je često jaka pozitivnost neuropila (Slika 38).

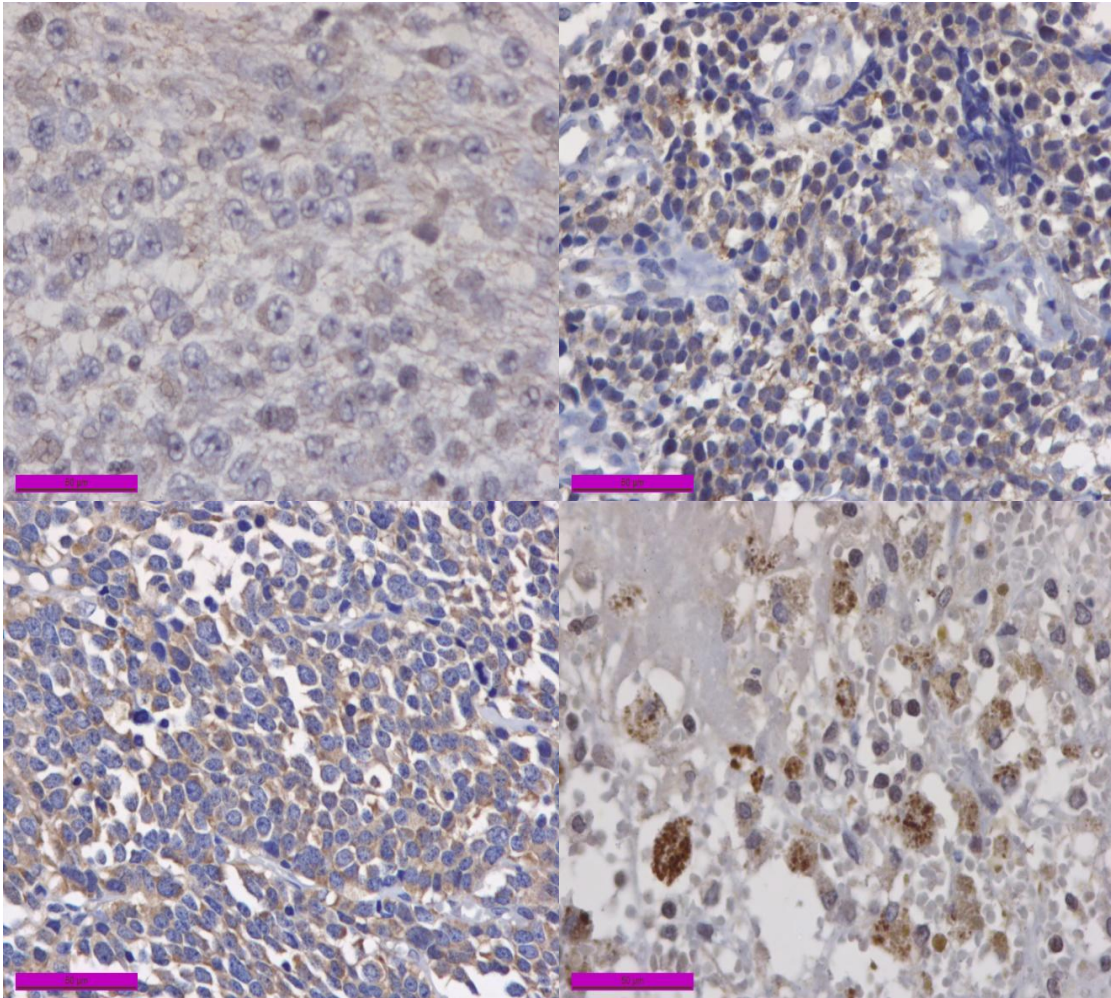


Slika 38 LC3B u NB pozitivno boji neuropil

Tabela 25 Raspodela skora LC3B imunoekspresije u odnosu na grupe kliničkog stadijuma, patološke prognostičke grupe, *MYCN* amplifikaciju i uzrast

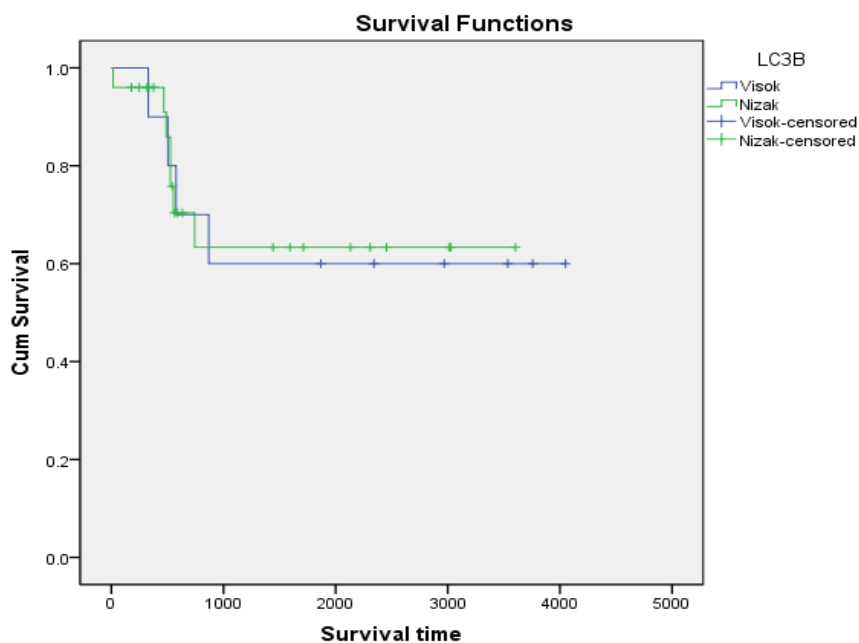
	LC3B skor	0	1	2	3
INSS	IVs, I, II, III	4 (40.0)	6 (85.7)	7 (50.0)	2 (50.0)
	IV	6 (60.0)	1 (14.3)	7 (50.0)	2 (50.0)
INPC	FH	5 (50.0)	4 (57.1)	2 (14.3)	2 (50.0)
	UH	4 (40.0)	3 (42.9)	10(71.4)	1 (25.0)
	NK	1 (10.0)	0	2 (14.3)	1 (25.0)
MYCN status	<i>MYCN-A</i>	5 (50.0)	1 (14.3)	10(71.4)	1 (25.0)
	<i>MYCN-NA</i>	5 (50.0)	6 (85.7)	4 (28.6)	3 (75.0)
Uzrast	< 18 meseci	6 (60.0)	5 (71.4)	3 (21.4)	2 (50.0)
	> 18 meseci	4 (40.0)	2 (28.6)	11(78.6)	2 (50.0)
Ukupno		10(100.0)	7(100.0)	14(100.0)	4(100.0)

INSS-klinički stadijum bolesti, INPC-patohistološka prognostička grupa, FH-povoljna prognoza, UH-nepovoljna prognoza, NK- neklasifikovani, *MYCN-A* amplifikovani, *MYCN-NA*- neamplifikovani



Slika 39 Različit intenzitet LC3B ekspresije u NB tumorima

Na osnovu LC3B skora formirane su dve grupe, niskog (gradus 0) i visokog nivoa ekspresije (gradusi 1-3). U analizi preživljavanja (Kaplan-Meier), grupa sa visoko izraženom ekspresijom LC3B imala je nešto manji koeficijent preživljavanja ali nije nađena statistički značajna razlika u preživljavanju u međusobnom odnosu grupa sa različitim nivoom LC3B ekspresije kod NB tumora. U analizi korelacije LC3B ekspresije nije nađena statistička značajnost ni sa jednim značajnim prognostičkim parametrom kod NB.

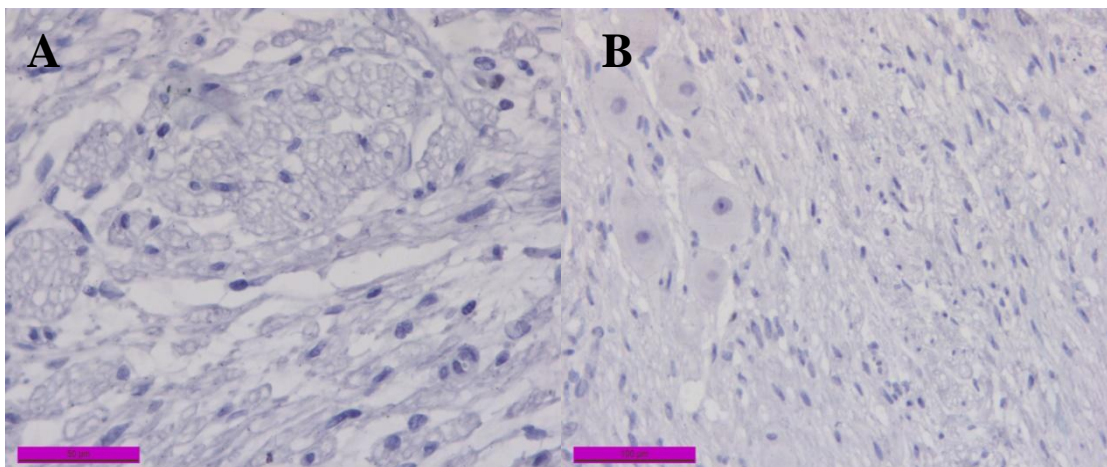


Grafikon 19 Ukupno preživljavanje bolesnika sa NB u odnosu na skor LC3B

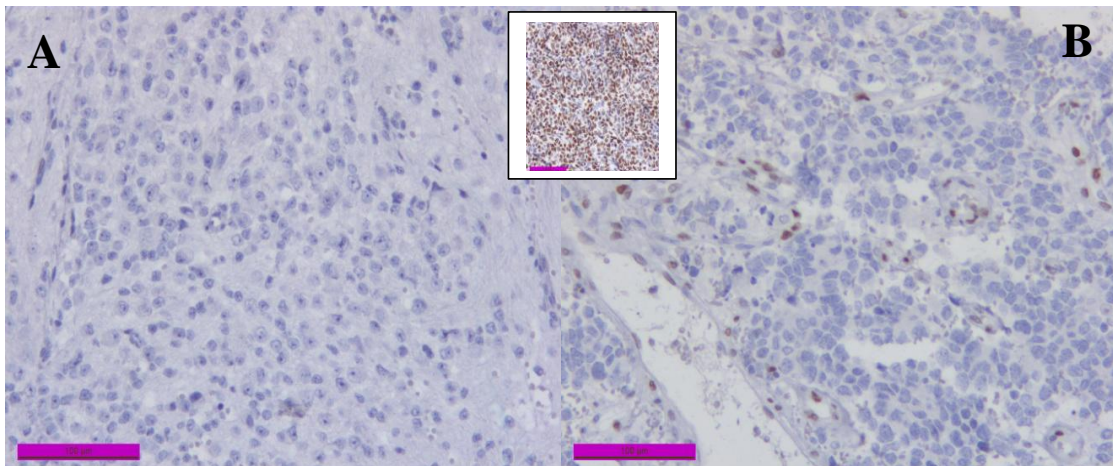
Log Rank (Mantel-Cox) test $\chi^2 = 0.008$, $df=1$, $p=0.930$

4.4.2. Imunohistohemijska analiza ekspresije MYC i MYCN proteina

Imunohistohemijskim bojenjem nije registrovan MYC (C-MYC) protein u uzorcima GN i iGNB (Slika 40), kao ni u tumorskim ćelijama NB (Slika 41). Retko (kod 6 bolesnika) je uočena jedarna pozitivnost ćelija krvnih sudova (Slika 41).

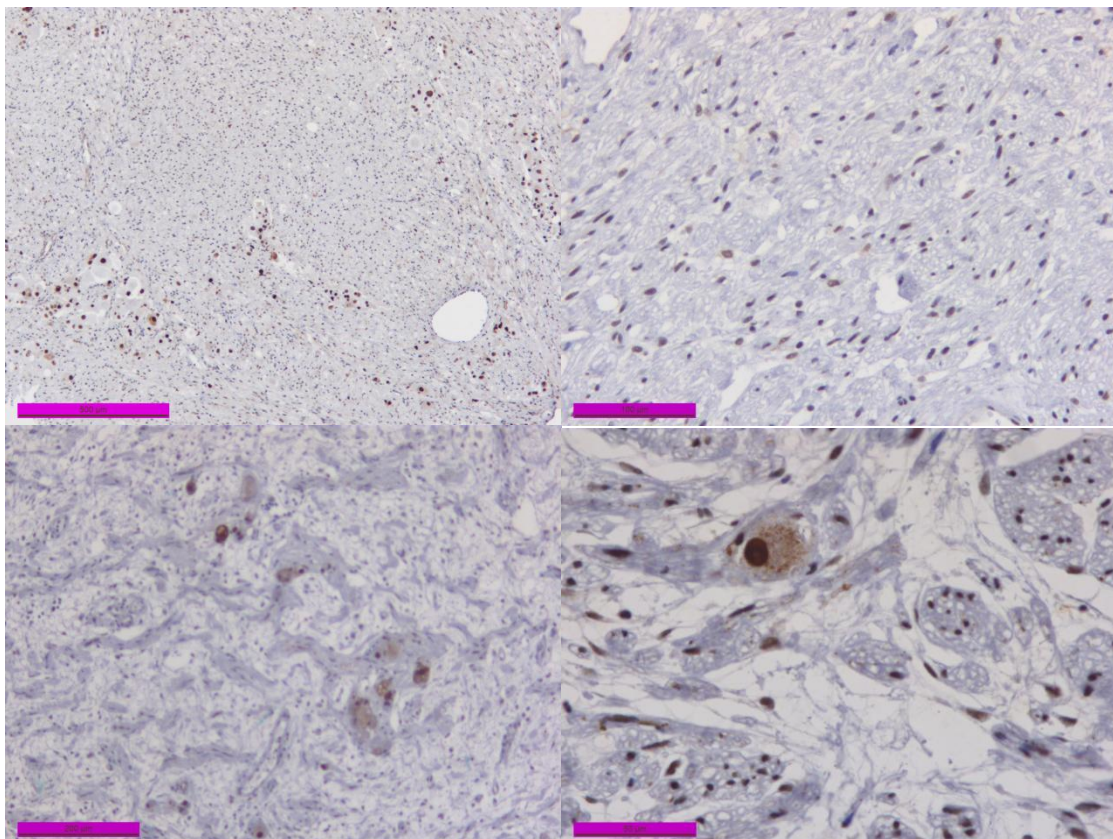


Slika 40 Negativno IHH bojenje MYC proteina u A) Ganglioneuromu, B) Intermiksnom ganglioneuroblastomu



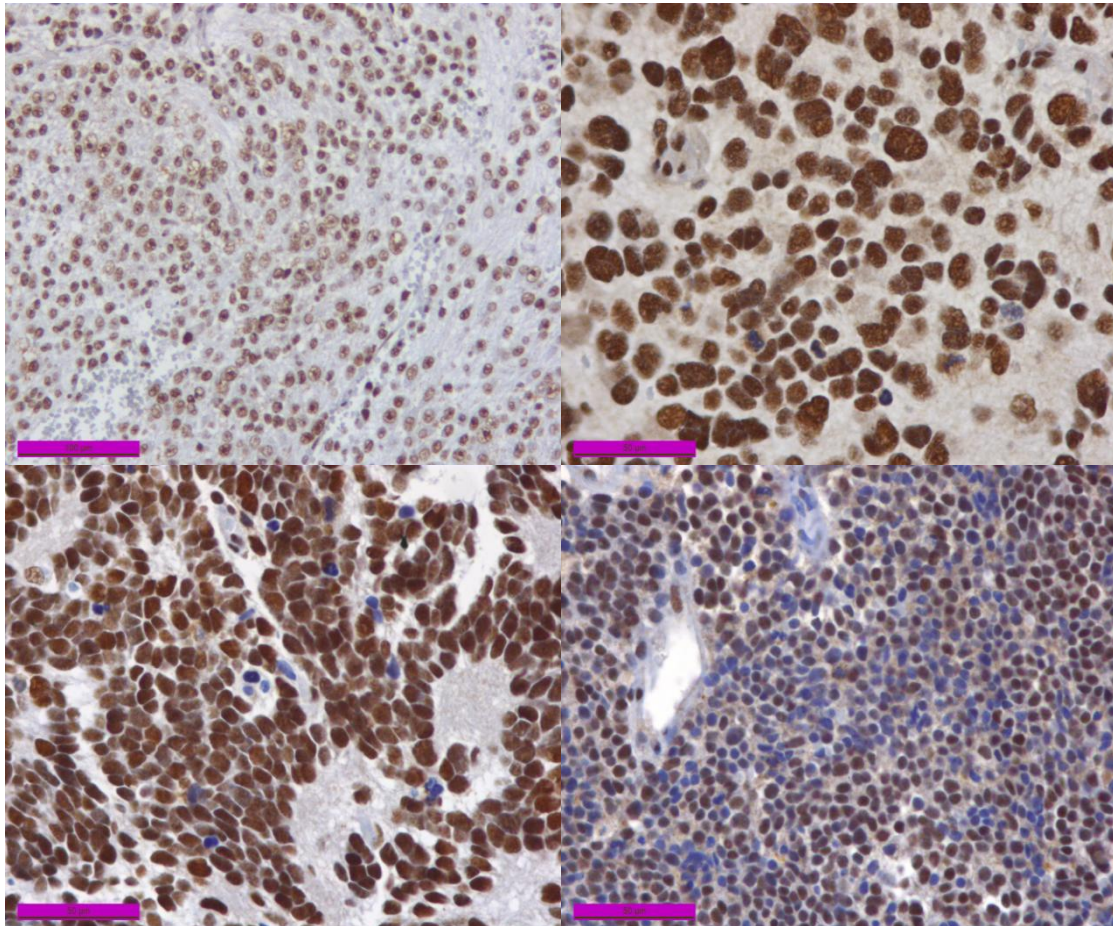
Slika 41 IHH bojenje MYC proteina u NB: A) negativno u tumorskim ćelijama, B) pozitivno u krvnim sudovima (pozitivna kontrola, DLCL, u maloj slici)

Imunohistohemijsko bojenje MYCN proteina je smatrano pozitivnim kada je postojala jedarnu pozitivnost. U uzorcima GN i iGNB ta pozitivnost je bila retka i najčešće vezana za ganglijske ćelije i ostrvca neuroblastomskog tkiva (Slika 42).



Slika 42 MYCN protein u GN i iGNB pokazuje samo fokalnu jedarnu pozitivnost

Nasuprot tome u uzorcima NB uočena je jedarna pozitivnost brojnih neuroblastnih ćelija, različitog intenziteta bojenja i procenta obojenih ćelija (Slika 43).

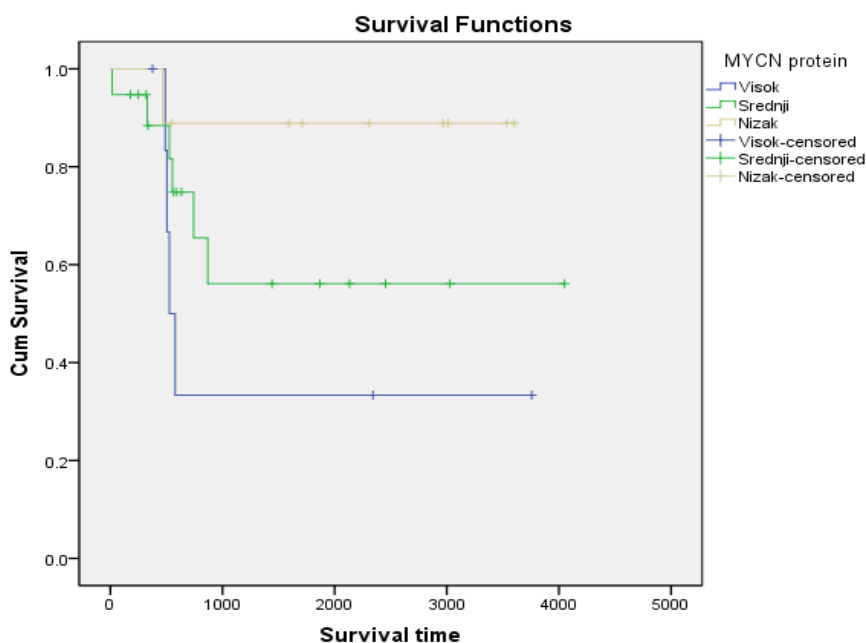


Slika 43 IHH MYCN protein jedarna pozitivnost NB tumora

Postojala je statistički značajna razlika između ekspresije MYCN proteina u GN i iGNB na jednoj strani i NB na drugoj. Za tumore iz grupe NB, prethodno određeni skor imunohistohemijske ekspresije MYCN proteina je dalje analiziran u smislu njegovog prognostičkog značaja. Uočeno je da je preživljavanje bolesnika sa visoko izraženim MYCN proteinom lošije. Dobijena je statistička značajnost u poređenju ove grupe bolesnika sa grupom čije su tumorske ćelije eksprimirale nizak nivo ovog proteina (Tabela 26, Grafikon 20).

Tabela 26 Poređenje prognostičkog značaja grupa sa različitim stepenom ekspresije MYCN proteina (χ^2 , p)

	MYCN protein	Visok	Srednji	Nizak
Log Rank (Mantel-Cox)	Visok	/	1.217, 0.270	4.019, 0.045*
	Srednji	1.217, 0.270	/	1.997, 0.158
	Nizak	4.019, 0.045*	1.997, 0.158	/



Grafikon 20 Ukupno preživljavanje bolesnika sa NB u odnosu na ekspresiju MYCN proteina u tumorskim ćelijama

Primenom Pearsonovog korelacionog testa analizirana je korelacija ispitivanih parametara sa do sada poznatim prognostičkim parametrima značajnim za prognozu ishoda neuroblastomske bolesti. Korelacija je smatrana značajnom do nivoa p 0.05 i obeležena * i visoko značajnom do nivoa p 0.01 i obeležena ** (Tabela 27).

Tabela 27 Korelacija parametara značajnih za prognozu NB

CMYC protein	Uzrast		MKI		Stadijum		INPC		LC3B		MYCN ampl		MYCN protein		
	p	PC	p	PC	p	PC	p	PC	p	PC	p	PC	p	PC	
.681	.073	.967	-.007	.766	-.060	.050	-.333	.896	-.024	.753	.055	.337	-.167	1	
.941	-.013	.003	.455 ^{***}	.046	.361 [*]	.059	.302	.001	-.546 ^{**}	.706	.066	1	.337	-.167	
.458	.132	.141	.254	.544	.122	.875	-.028	.324	-.183	1	.066	.706	.066	.753	.055
.737	.063	.000	-.838 ^{***}	.008	-.469 ^{**}	.891	-.024	1	.324	-.183	.066	.706	-.546 ^{**}	.896	-.024
.518	-.113	.301	.168	.616	-.094	1	.028	.891	-.024	.875	-.028	.059	.302	.050	-.333
.183	-.259	.331	.180	1	.616	-.094	.094	.008	-.469 ^{**}	.544	.122	.046	.361 [*]	.766	-.060
1	.518	.113	.113	.183	-.259	.518	-.113	.737	.063	.458	.132	.941	-.013	.681	.073
.518	.113	.331	.180	.331	.180	.301	.168	.000	-.838 ^{**}	.141	.254	.003	.455 ^{**}	.967	-.007

5. DISKUSIJA

5.1. Osnovne kliničko-patološke karakteristike

Sprovedenim ispitivanjem obuhvaćeno je 60 bolesnika, 36 dečaka i 24 devojčice (1.5:1). Odnos polova je bio sličan podacima iz studije Zimlinga i saradnika na uzorku danske populacije (72:53, 1.36:1) (371). Uzorak u sprovedenoj studiji je formiran da podjednako budu zastupljeni bolesnici sa GN i iGNB (po 10), a da u grupi NB (40) pola uzorka ima *MYCN* amplifikaciju, te kao takav ne predstavlja verno pojavu analizirane grupe tumora u populaciji. Zbog činjenice da biologija i ponašanje nGNB zavisi od neuroblastomske komponente, a nodularna građa utiče na heterogenost tumora, ispitivanjem nije ohuhvaćena grupa bolesnika sa nGNB.

Medijana uzrasta ispitivanih bolesnika bila je 36 meseci (tri godine) što je u korelaciji sa nalazom Zimlinga i saradnika, u čijem istraživanju je iznosila 30 meseci (371). Bolesnici sa GN su bili najstariji (medijana 92 meseca, 7.7 godina), a medijana uzrasta bolesnika sa iGNB bila je 50 meseci (4.2 godine). U poređenju sa podacima iz velike, multicentrične studije (GN 4.8, iGNB 3.5 godina), medijana uzrasta ispitivanih bolesnika je veća (101). Činjenica da se GN i iGNB, u sprovedenoj studiji dijagnostikuju u starijem uzrastu u odnosu na podatke iz literature, nema negativni uticaj na ishod bolesti, s obzirom da ove grupe NT imaju povoljno kliničko i biološko ponašanje. Medijana uzrasta u trenutku dijagnostikovanja NB bila je 22 meseca, što je nešto više od literaturnih podataka (18 meseci) (20, 101). Stariji uzrast u grupi NB verovatno je posledica činjenice da u analiziranom uzorku ima 50% *MYCN* amplifikovanih tumora, koji su najčešće udruženi sa višim kliničkim stadijumom bolesti i starijim uzrastom. Najmlađe su bile devojčice sa NB (medijana 17 meseci), a najstariji dečaci sa GN (128 meseci). U ispitivanoj seriji abdominalna lokalizacija je bila najčešća (43.3%), dok je u multicentričnoj studiji (30) nađeno da je najčešća primarna lokalizacija nadbubrežna žlezda, kod 33.8% bolesnika. Objašnjenje za ovo neslaganje može biti u nedovoljno precizno definisanom podatku o lokalizaciji u analiziranoj medicinskoj dokumentaciji.

5.2. Histopatološka analiza

Posle klasifikacije tumora po histološkim kriterijumima, uočeno je da je NB češći kod dečaka (2.33:1), a GN kod devojčica (1:2.33), dok su polovi bili podjednako zastupljeni u iGNB. Statistički je potvrđeno da su bolesnici sa GN i iGNB stariji od onih sa NB što je u skladu sa podacima iz literature (28). Statistički značajna razlika medijana uzrasta u odnosu na histološki tip nađena je za ceo uzorak, kao i za svaki pol pojedinačno. Dobijena je i visoko statistički značajna veza tipa NT, analiziranog u grupama sa povoljnom (GN i iGNB) i nepovoljnom (NB) prognozom, i uzrasnih kategorija.

U analizi kliničkog stadijuma i uzrasnih kategorija nije bilo statističke značajnosti.

Utvrđeno je da ne postoji značajna razlika u raspodeli histoloških tipova u odnosu na lokalizaciju kao ni u odnosu na pol što je u saglasnosti sa nalazima drugih autora (28).

Podatak o dimenziji tumorskog tkiva postojao je za 39 uzoraka i prosečna dimenzija je bila 5.7 cm, sa medijanom od 6 cm, što je u skladu sa podacima iz literature (21, 30). Prosečna masa je bila 121 gram, takođe u skladu sa podacima iz literature (30).

U daljoj analizi NB je klasifikovan na podtipove i određene su histološke prognostičke kategorije prema INPC kriterijumima. Najčešći je bio slabo diferentovani podtip (60%). Analiziran je prognostički značaj podtipova NB i nediferentovani NBi su imali koeficijent ukupnog preživljavanja (overall survival, OS) 30%, slabo diferentovani 70%, a diferencirajući 100%. Nađena je statistički značajna razlika u preživljavanju između nediferentovanog i slabodiferentovanog ($p=0.045$) podtipa neuroblastoma.

Histološka INPC klasifikacija je u analiziranom uzorku imala prognostički značaj sa Kaplan-Meierovim koeficijentom ukupnog preživljavanja od 84.6% za FH i 54.5% za UH. Podaci iz literature takođe ukazuju na postojanje prognostičkog značaja INPC patološke klasifikacije sa različitim vrednostima OS koje se kreću od 35,7% do 54,7% za UH i od 84% do 97,6% za FH (29-32, 58). Ukupno preživljavanje u ispitivanoj grupi bolesnika sa nepovoljnom histologijom odgovara podacima iz

literature i nalazi se u grupi istraživanja sa boljim preživljavanjem, dok je u grupi sa povoljnom histologijom lošije (29-32, 58) ali i dalje u skladu sa podacima iz literature. Lošije preživljavanje u grupi sa povoljnom histologijom je verovatno u vezi sa većom učestalošću *MYCN* amplifikacije nego što navode drugi autori. Takođe, u kategoriju sa povoljnom histološkom prognozom neki istraživači uključuju i prognostički dobre tumore GN i iGNB, te zbog toga dobijaju više vrednosti preživljavanja (371). U sprovedenom istraživanju procena preživljavanja izvođena je samo na uzorcima NB.

U poređenju histoloških prognostičkih kategorija (FH i UH) sa kliničkim stadijumima raširenosti bolesti, nađeno je da se UH pojavljuje češće nego što je očekivano u prognostički boljim kliničkim stadijumima (IVs, I, II, III). To je, najverovatnije, u vezi sa *MYCN* amplifikacijom koja je prisutna u polovini uzoraka NB, a koja je povezana sa lošom histološkom prognozom. Statističkom analizom nisu dobijene značajne razlike između histoloških prognostičkih kategorija i kliničkog stadijuma bolesti.

Ispitivan je i prognostički značaj mitotsko-karioretskog indeksa i dobijen je koeficijent preživljavanja za grupu sa niskim MKI od 87.5%, za grupu srednjeg 66.7% i grupu visokog MKI 50%. Nije nađena statistički značajna razlika u preživljavanju između grupa MKI, ali je najlošije preživljavanje nađeno u grupi sa visokim MKI. Ova činjenica zajedno sa podacima o statistički značajnoj razlici u preživljavanju između slabodiferentovanog i nediferentovanog podtipa NB i između povoljne i nepovoljne histološke prognostičke grupe ($p=0.039$), ukazuje da histološka klasifikacija i kriterijumi za svrstavanje u prognostičke grupe predstavljaju pouzdane, za prognozu neuroblastomske bolesti značajne parametre. Korelacionim testom (Pearson) dobijena je statistički visoko značajna veza INPC patoloških prognostičkih grupa sa uzrastom bolesnika ($p<0.0005$), *MYCN* amplifikacijom ($p=0.001$) i MKI ($p=0.008$). Nađena je i statistički značajna korelacija MKI sa *MYCN* amplifikacijom (0.046), koja je u skladu sa podatkom iz literature o značajnoj ulozi *MYCN* gena u proliferaciji i ćelijskom rastu tumorskih ćelija (62, 380).

Analizirana su i dva klinička prognostička faktora (uzrast i klinički stadijum bolesti). Dobijen je visok prognostički značaj ($p=0.028$) uzrasnih grupa, sa Kaplan-Meierovim koeficijentom ukupnog preživljavanja za mlađe od 18 meseci od 80% i 40%

za starije od 18 meseci. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima iz literature, i potvrđuje opravdanost podizanja prognostičke uzrasne granice sa 12 na 18 meseci (19, 59).

Analiza prognostičkog značaja kliničkog stadijuma nije donela statistički značajnu razliku u preživljavanju između grupe sa dobrim (IVs, I, II i III) i lošim (IV) kliničkim stadijumom bolesti, što je u suprotnosti sa literaturnim podacima (59). U sprovedenom istraživanju dobijeni rezultat je verovatno posledica veštački napravljenog uzorka sa češće prisutnom *MYCN* amplifikacijom, posebno u grupi sa povoljnim kliničkim stadijumima. Koeficijent preživljavanja u grupi prognostički boljih kliničkih stadijuma je bio viši (70%) u odnosu na prognostički lošiji, IV klinički stadijum (45%).

5.3. Analiza molekularno-genetičkih parametara

S obzirom da je jedan od ciljeva istraživanja da se proverí postojanje ekspresije *MYC* i *MYCN* proteina, kao i njihova veza sa prognostičkim faktorima, formiran je uzorak u kome je *MYCN* amplifikacija prisutna u polovini tumorskih uzoraka NB (20/40). Kod 14 tumorskih uzoraka urađena je i analiza 1p delecije koja je bila pozitivna kod 8 (57.1%) tumora.

Analiza 17q umnožavanja sprovedena je kod 5 uzoraka i bila je pozitivna u 3 (60%). 17q umnožavanje, iako u sprovedenoj studiji analizirano u vrlo malom broju uzoraka, predstavlja najčešću genetsku aberaciju, što je u skladu sa podacima iz drugih istraživanja gde se njena učestalost kretala oko 70% (90). Ovo frekventno pojavljivanje promene statusa 17q hromozoma u neuroblastomima ukazuje na moguću ranu pojavu ove aberacije u procesu tumorogeneze. S obzirom na mali broj analiziranih uzoraka nije vršeno dalje poređenje ove aberacije sa prognostičkim parametrima.

Frekvencija pojavljivanja *MYCN* amplifikacije u multicentričnoj seriji INRG urađenoj na 8800 tumora bila je 16.26%, a 1p delecije 22.90% (90). S obzirom da je ispitivani uzorak formiran tako da je *MYCN* amplifikacija dva do tri puta češća nego u populacijskim uzorcima, to je uticalo na promene u pojavljivanju i drugih proučavanih parametara.

U poređenju sa patohistološkim prognostičkim kategorijama *MYCN* amplifikacija je bila pozitivna kod 14 (60.9%) tumorskih uzoraka iz grupe sa nepovoljnom histologijom (UH), a samo u jednom (8.3%) koji je pripadao povoljnoj histološkoj grupi (FH).

Fisherovim testom je dobijena statistički značajna udruženost *MYCN* amplifikacije i histoloških prognostičkih grupa. Pet *MYCN* pozitivnih uzoraka nalazilo se među tumorima koji su zbog primenjene preoperativne hemioterapije, po INPC kriterijumima, ostali prognostički neklasifikovani. S obzirom da su u ovoj grupi tri tumora nediferentovanog i dva slabodiferentovanog podtipa, od čega četiri u grupi starijih od 18 meseci, da je bila moguća histološka prognostička klasifikacija, ta četiri, a možda i svih pet tumora bi imalo lošu prognozu (UH). U tom slučaju veza amplifikacije i nepovoljne histološke prognostičke grupe bila bi još intenzivnija.

MYCN amplifikovanih tumora nije bilo u diferencirajućem podtipu, dok se 11 nalazilo u grupi PD (55%), a 9 u grupi UD (45%). Slična raspodela registrovana je i u multicentričnoj studiji Dečje kancer grupe (CCG) (57).

Iako je *MYCN* amplifikacija bila češća u IV stadijumu (66.7%), nego u zbirnoj grupi kliničkih stadijuma sa boljom prognozom (IVs, I, II, III) (36.3%), to se nije pokazalo statistički značajnim. Grupa *MYCN* amplifikovanih tumora u prognostički dobrim kliničkim stadijumima bolesti je nedovoljno jasna, pre svega zbog njene niske učestalosti. Nešto bolje razumevanje postignuto je INRG studijom (61), na uzorku od 2660 bolesnika stadijuma I i II, od čega je 87 imalo *MYCN* amplifikovane tumore (3%). Zaključeno je da dodatni prognostički značaj u ovoj grupi bolesnika ima ploidijska (hiperdiploidni tumori su imali statistički bolje preživljavanje od diploidnih tumora) i da se ona, potencijalno, može koristiti u određivanju bolesnika koji su kandidati za primenu redukovane terapije (61). Identični zaključci su doneti i u istraživanju COG, a njihov uzorak je obuhvatao i bolesnike sa IVs stadijumom bolesti (60). Značaj *MYCN* amplifikacije u grupi sa nepovoljnom histologijom (UH) i u visoko rizičnim kliničkim stadijumima je dobro dokumentovan i njeno prisustvo ukazuje na najozbiljnije bolesnike kod kojih je u terapiji neophodno primeniti sva terapijska sredstva (59, 90).

MYCN status, kao najznačajniji prognostički parametar, se i u sprovedenom istraživanju pokazao visoko statistički značajnim ($p < 0.0005$), sa vrednostima Kaplan-Meierovog koeficijenta ukupnog preživljavanja od 30% za amplifikovane i 90% za neamplifikovane tumore. Rezultati sprovedene studije su u potpunom skladu sa drugim istraživanjima (49, 61, 63). Podaci iz literature variraju u određenom opsegu. U različitim istraživanjima su dobijene različite učestalosti pojave *MYCN* amplifikovanih tumora koje se kreću od 16% do 30% (32, 63) sa stopama preživljavanja, za grupu

amplifikovanih tumora, od 12% trogodišnjeg preživljavanja (63) do 50% (49). U istraživanju Bagatellijeve sa saradnicima najniža stopa ukupnog preživljavanja se sreće u grupi amplifikovanih tumora koji su istovremeno i diploidnog DNK statusa (32.4%), dok je u grupi amplifikovanih, hiperdiploidnih tumora ona 54.5%, a kod neamplifikovanih tumora 86.7% (49).

1p delecija je nađena u 8 uzoraka, od čega je, kao kod *MYCN* amplifikacije, najveći deo pripadao nepovoljnoj histološkoj kategoriji (75%), a samo jedan povoljnoj (12.5%), bez statistički značajne razlike. Jedan bolesnik sa dijagnostikovanom 1p delecijom se nalazio u grupi neklasifikovanih tumora (12.5%).

Raspodela po histološkim podtipovima je pokazala da ove promene nije bilo među diferencirajućim tumorima, 5 se nalazilo u grupi PD (62.5%) i tri u UD (37.5%) NB-ima. U analizi veze 1p delecije sa kliničkim stadijumima bolesti postojala je statistička značajnost.

U analizi preživljavanja, nađen je statistički značajan uticaj prisustva 1p delecije na ukupno preživljavanje ($p=0.022$). Treba imati u vidu da je analizirani uzorak bio mali i da u grupi bez 1p delecije nije bilo nijednog smrtnog ishoda. Stopa preživljavanja za grupu sa 1p delecijom je bila 37.5%, dok je u grupi bez 1p delecije iznosila 100%. Podaci iz literature se kreću oko 48% za grupu sa delecijom i 76% za grupu bez delecije (80).

Uloga 1p hromozoma, iako je jedan od najduže proučavanih genetskih markera u NB, i dalje ostaje nejasna. Neki od radova izveštavaju rezultate slične rezultatima iz sprovedene studije, o statistički značajnom uticaju 1p delecije na ukupno preživljavanje (372), dok u drugim radovima rezultati ukazuju da 1p delecija ne utiče na ukupno preživljavanje već samo na preživljavanje bez pojave relapsa (event free survival, EFS) (80).

Značaj i učešće 1p delecije u kancerogenezi neuroblastoma ostaje tema za dalja istraživanja.

5.4. Elektronskomikroskopska analiza

Brojne studije su ukazale na dvostruku ulogu autofagije u tumorogenezi. Autofagija funkcioniše kao tumor supresor ali i kao mehanizam koji obezbeđuje

tumorskim ćelijama preživljavanje, posebno u uslovima ćelijskog stresa izazvanog gladovanjem i hipoksijom (103, 373, 374). Autofagija sprečava tumorogenezu zahvaljujući svojoj sposobnosti da ćeliju oslobodi aberantnih proteina i oštećenih organela (171). Uprkos toj tumor supresorskoj ulozi, jednom kada je tumor stvoren autofagija omogućava tumorskim ćelijama da prežive u svom mikrookruženju (374). Većina ovih dokaza potiče iz istraživanja na mišjim modelima i genetski definisanim ćelijskim linijama. Sprovedeno istraživanje je jedno od retkih koje određuje autofagiju primenom elektronske mikroskopije na hirurškim, tumorskim uzorcima pedijatrijskih bolesnika. Istraživanjem su nađene AV u svim biopsijama u studiju uključenih pedijatrijskih bolesnika sa NT. Nalaz ukazuje da je autofagija povezana sa različitim tipovima neuroblastnih tumora, od benignih GN do najmalignijih NB. Kao što su neki autori špekulisali u proučavanju kolorektalnih tumora, to bi moglo da znači da je autofagija uključena u rane faze nastanka neuroblastnih tumora (375). Dvostruka priroda NT je uticala na formiranje dve grupe uzoraka za ispitivanje autofagije: jednu sa dobrom kliničkom prognozom (GN i iGNB) i drugu sa pretežno lošim ishodom (NB).

Statistički značajno veći broj AV, nađen u grupi NB tumora, ukazuje na vezu autofagije sa malignijim tumorima i lošijim ishodom. Autofagija doprinosi preživljavanju ćelija tako što omogućava samoodržanje u situacijama u kojima je ugroženo snabdevanje hranljivim supstancama, omogućavajući recikliranje aminokiselina i sintezu novih proteina sa produkcijom energije (374). Kako tumor raste, posebno u centralnim zonama sa lošijom vaskularizacijom i u uslovima višestrukog stresa tokom tumorske progresije, autofagija biva aktivirana kao odgovor na gladovanje. To bi moglo biti objašnjenje za pojavu većeg broja AV u analiziranim NB, kao i za postojanje statističke veze broja AV i proliferativnog indeksa. Dobro je poznato da veliki broj AV ne znači uvek i povećanu autofagijsku aktivnost. Postoji razlika između merenja autofagnih elemenata u nekom trenutku tokom procesa u odnosu na merenje celokupnog autofagnog protoka, s obzirom da kompletan proces uključuje ukupnu količinu razgrađenih supstanci (104, 148). Autofagozomi su nađeni u studijama različitih malignih tumora, posebno u metabolički stresnim zonama, a u nekim studijama je istovremeno utvrđeno postojanje redukcije autofagne aktivnosti (375). Imajući to u vidu, povećani broj, u ovoj studiji nađenih AV u NB, ne ukazuje sam po

sebi na povećanu autofagnu aktivnost, već može biti povezan i sa blokadom autofagije i posledičnim nakupljanjem AV.

Ultrastrukturalna analiza uzoraka NT otkrila je prisustvo velikog broja oštećenih mitohondrija. Mitohondrije su glavni izvor ROS-a i kao takve posebno osetljive na ROS oštećenja. Oštećenja mitohondrija mogu biti različita, a najčešće je konstatovan edem koji nastaje kao posledica ulaska vode ili tečnosti. Mitohondrije su najčešće svetlog matriksa i dezorganizovanih kristi, ali mogu imati različit izgled zavisno od stepena oštećenja i komponente koja je u oštećenje uključena (spoljašnji, intermembranski prostor ili unutrašnji prostor koji sadrži matriks mitohondrije). Održavanje zdrave populacije mitohondrija je esencijalno za dobrobit svake ćelije, a mitofagija je glavni degradativni proces koji to omogućava (178, 179, 184). Statistički značajno veći broj oštećenih mitohondrija, nađen je u tumorskim uzorcima NB, što može biti rezultat okrutnog okruženja prisutnog u malignijim tumorima. To takođe može objasniti pojavu mitofagije, koja je uočena u malignim NB uzorcima. Istovremeno je primećen, statistički ne značajno, veći broj nepromenjenih mitohondrija po ćeliji u benignijim oblicima tumora u odnosu na NB.

Istraživanjem je primećen i statistički značajno veći broj ćelija NB tumora u poređenju sa GN i iGNB u kojima je viđena dilatacija endoplazmatskog retikuluma, najčešće granulisanog. Broj ćelija sa dilatiranim ER je izražavan u vidu procenta u odnosu na ukupan broj pregledanih ćelija (60 po tumoru). Kada, u fiziološkim ili patološkim uslovima, mehanizmi koji obezbeđuju ispravno savijanje proteina budu nadvladani, u lumenu ER dolazi do nakupljanja pogrešno savijenih proteina i nastaje stanje koje se zove stres endoplazmatskog retikuluma (ER stres) (199), koje može biti manifestovano i dilatacijom ER. Ćelija na ER stres odgovara aktivacijom više signalnih puteva, kao što su odgovor na prisustvo pogrešno savijenih proteina (unfolded protein response, UPR), aktivacija autofagije i, kod prolongiranog stresa, apoptotsko umiranje (199). Kako je u istoj grupi analiziranih tumora (NB) uočen češće dilatiran ER i povećan broj AV, može se špekulisati o učešću ER u procesu aktivacije autofagije kod neuroblastoma.

Neki objavljeni rezultati ukazuju na autofagiju kao proces ćelijske zaštite u NB ćelijama koje su tretirane terapijskim sredstvima i da je nivo ove samozaštitne autofagije povezan sa nivoom *MYCN* ekspresije (333, 362). Više studija je našlo da

tumori sa većom MYC ekspresijom aktiviraju autofagiju da bi obezbedili preživljavanje ćelija tretiranih antitumorskim lekovima (364, 365). Činjenica da u sprovedenoj studiji nije nađena veza *MYCN* amplifikacije i broja AV ne podržava teoriju da *MYCN* ekspresija aktivira autofagiju. Nalaz autofagije i u *MYCN* negativnim tumorima to dodatno pojačava. Postoji mogućnost da oštećenje mitohondrija i oksidativni stres, zajedno sa dilatacijom ER i ER stresom predstavlja značajnije faktore ili faktore koji se pojavljuju ranije u procesu indukcije autofagije u odnosu na *MYCN* amplifikaciju.

Sveukupno, studija je ukazala da postoji značajan porast broja AV u malignijim tipovima NT i da oštećenje mitohondrija i dilatacija ER može biti jedan od faktora indukcije autofagije u njima.

5.6. Imunohistohemijska analiza

5.6.1. Imunohistohemijska analiza LC3B antitelom

S ciljem da se analizira autofagija u neuroblastnim tumorima uz elektronskomikroskopsku analizu uključena je i imunohistohemijska analiza LC3B antitelom na celokupnom uzorku. U tu svrhu korišćen je tkivni mikroniz koji omogućava istovremenu i adekvatnu analizu brojnih tumorskih uzoraka (368, 369).

LC3 se sastoji od LC3-I i LC3-II izoforme, ali se smatra da je količina LC3-II pouzdanija za procenu autofagije jer je dobro povezana sa stvaranjem autofagozoma zato što se, za razliku od LC3-I, direktno vezuje za autofagozome (370, 376). Brojna LC3 antitela pokazuju ukrštenu reakciju između LC3-I i II izoforme. Da bi imunohistohemijskom metodom bili što vernije detektovani autofagozomi, u istraživanju je korišćeno visoko specifično LC3B antitelo koje detektuje samo LC3-II formu (370).

U skladu sa studijama sprovedenim na ćelijama različitih tumora (324, 370) i rezultati ove studije su pokazali da je LC3B pozitivnost nađena u velikom broju uzoraka. U analiziranoj seriji ova pozitivnost je bila prisutna u svim tipovima NT, zahvatajući različit procenat ćelija i ekspimirajući se različitim intenzitetom. Imunohistohemijska analiza je bila u skladu sa elektronskomikroskopski dobijenim podatkom da je značajno više AV registrovano u uzorcima NB u poređenju sa GN i

iGNB. Imunohistohemijski GN i iGNB su bili pozitivni samo blago i u manjem broju ćelija, jedino su ganglijske ćelije u GN i ostrvca neuroblastoma u iGNB pokazivali jači intenzitet imunoekspresije. Činjenica da se LC3B antitelom pozitivno boje neuroni moždanog tkiva i normalna nervna vlakna, ukazuje na viši stepen bazalne autofagije u ovim ćelijama (370). Jača LC3B pozitivnost ganglijskih ćelija, koje su u perifernom nervnom sistemu paralela neuronima u centralnom, možda se takođe može objasniti višim nivoom bazalne autofagije. Uz nešto jaču pozitivnost neuroblastomskih ostrvaca u iGNB zabeležena je i intenzivna LC3B pozitivnost ćelija u diferencirajućem tipu NB što bi moglo ukazivati na vezu autofagije i procesa diferencijacije u neuroblastima. S obzirom da su u analiziranom uzorku bila prisutna samo tri diferencirajuća neuroblastoma nije bilo moguće detaljnije analizirati ovo zapažanje.

Podaci iz literature ukazuju da je LC3, kao specifični marker autofagije, uključen u karcinogenezu (324). U sprovedenoj studiji nije nađena statistički značajna veza LC3B ekspresije sa kliničko-patološkim parametrima značajnim za prognozu neuroblastomske bolesti. U analizi preživljavanja uzorci NB sa visokim nivoom ekspresije LC3B su imali niži Kaplan-Meierov koeficijent preživljavanja (58%) u odnosu na uzorke NB sa nižom LC3B ekspresijom (63%). Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju između grupa sa različitim stepenom LC3B ekspresije. Nije nađena ni statistički značajna korelacija (Pearson test) LC3B ekspresije sa faktorima značajnim za prognozu neuroblastomske bolesti. Slični rezultati su dobijeni i u objavljenim analizama karcinoma jednjaka i melanoma (324, 342). Može se zaključiti da je autofagija prisutna u tumorskim ćelijama neuroblastoma i da verovatno predstavlja adaptivni ćelijski mehanizam povezan sa nekontrolisanom proliferacijom i metaboličkim stresom kao što su hipoksija i gladovanje (324, 333). Takođe, treba imati u vidu da visoka imunohistohemijska LC3B reaktivnost, slično kao i povećan broj AV, ne mora obavezno da ukazuje na visok nivo aktivnog procesa autofagije. Autolizozomi, vizualizovani imunohistohemijski kao tačkasta pozitivnost, mogu se akumulirati u ćeliji kao posledica indukovane autofagije ali i kao posledica inhibirane autofagije sa akumulacijom autolizozoma usled njihove neadekvatne degradacije.

Identifikovanje tačnih mehanizama koji utiču na proces autofagije je neophodno za iznalaženje adekvatnog pristupa lečenju neuroblastoma u budućnosti.

5.6.2. Imunohistohemijska analiza ekspresije MYC i MYCN proteina

Jedan od krupnih, nerešenih problema, predstavlja velika grupa bolesnika sa neuroblastomom koji imaju nepovoljnu histologiju i pripadaju rizičnim kliničkim stadijumima ali su bez *MYCN* amplifikacije, kao i značajno manja grupa bolesnika koji imaju *MYCN* amplifikaciju ali su u histološki povoljnoj prognostičkoj grupi i klinički povoljnim stadijumima raširenosti bolesti. Za određivanje adekvatnog pristupa u lečenju ovih bolesnika neophodni su dodatni prognostički faktori. Nedavno publikovanim istraživanjima pokazana je moguća prognostička uloga ekspresije MYC i MYCN proteina (68-70).

Ekspresija MYCN proteina je tkivno specifična i javlja se tokom ranih faza razvoja, dok je ekspresija MYC proteina (C-MYC) mnogo šira (377). Različita ekspresija MYCN i MYC je posebno izražena kod bubrega i u B-ćelijskom razvoju, gde su oba proteina eksprimirana tokom razvoja, a samo MYC ostaje eksprimiran u adultnom organizmu (377).

Ekspresija MYCN je generalno viša u nezrelim ćelijama sa redukovanom ekspresijom u adultnom tkivu. U skladu sa tim je nalaz da je sa smanjenom ekspresijom MYCN udružena diferencijacija ćelija neuroblastoma (378, 379). MYCN podstiče transkripciju fokalne adhezin kinaze (focal adhesion kinase, FAK), i generalno povećava migraciju i metastaziranje tumorskih ćelija (380). Transkripcija FAK može biti smanjena uticajem p53, što ukazuje na moguću kompeticiju između MYCN i p53 (381). MYCN takođe povećava aktivnost matriks metaloproteinaze (matrix metalloproteinases, MMPs). Sveukupno, MYCN je transkripcioni faktor iz porodice protoonkogeni koji reguliše kritične ćelijske procese kao što su proliferacija, ćelijski rast i diferencijacija (62). U sprovedenoj studiji svi uzorci neuroblastoma su pokazali određeni stepen MYCN jedarne pozitivnosti koji je gradiran prema procentu zahvaćenih ćelija i intenzitetu ekspresije, a potom analiziran kao prognostički faktor preživljavanja bolesnika. Koeficijent preživljavanja za grupu sa visokim stepenom ekspresije MYCN proteina bio je 35%, za grupu srednjeg stepena ekspresije 55%, a za grupu sa niskim stepenom ekspresije ovog proteina bio je 90%. Nađena je statistički značajna razlika u preživljavanju između grupe sa visokim i grupe sa niskim nivoom ekspresije MYCN proteina ($p=0.045$). Dobijeni nalaz je u skladu sa očekivanim delovanjem ovog proteina

na procese u ćelijama neuroblastoma, a posledično i prognostičkim značajem za neuroblastomsku bolest. Analizirana je i korelacija za neuroblastom prognostički značajnih parametara sa ekspresijom MYCN proteina (Pearsonov test) i nije nađena statistička značajnost. U analizi veze ekspresije MYCN proteina i kliničkog stadijuma bolesti vrednost korelacije nalazila se na samoj granici značajnosti ($p=0.05$).

Imunohistohemijska bojenja MYC proteina u ispitivanim uzorcima neuroblastnih tumora bila su uniformno negativna. Istovremeno bojena pozitivna kontrola krupnoćelijskog B limfoma je bila difuzno i jako pozitivna. Kod malog broja uzoraka neuroblastoma (6) uočena je fokalna pozitivnost endotelnih ćelija, što se može smatrati i pozitivnom unutrašnjom kontrolom imunohistohemijskog bojenja. Dalja analiza ovog malog broja pozitivnih vaskularnih struktura nije pokazala nikakav statistički značaj niti korelaciju sa poznatim prognostičkim parametrima. Ipak, nalaz MYC pozitivnosti u krvnim sudovima potvrđuje u literaturi publikovanu značajnu ulogu ovog gena u procesu angiogeneze (384). Pod uticajem MYC-a i vaskularno endotelnog faktora rasta (VEGF) prvo se formiraju endotelne ćelije koje obrazuju prve vaskularne cevčice. Potom se od njih procesom razgranavanja i remodeliranja formiraju kapilari. U tom procesu još učestvuju regulišući ga i angiopoetin-1 (angiopoietin-1, ANG-1) i angiopoetin-2 (angiopoietin-2, ANG-2) (382). Nekontrolisana angiogeneza igra značajnu ulogu tokom tumorskog rasta i formiranje novih krvnih sudova u tumorima ima veliki značaj za širenje malignih tumora (383). Angiogeneza se javlja rano tokom tumorske progresije i delom predstavlja odgovor na uticaje okruženja, posebno hipoksiju, koja reguliše ekspresiju angiogenetskih faktora ključnih za nastanak krvnih sudova kako u tumorima, tako i tokom embriogeneze. Podaci pokazuju da MYC (c-Myc) podstiče tumorogenezu funkcionišući kao glavni regulator citokina neophodnih za rast, angiogenezu i primitivnu eritropoezu (384).

6. ZAKLJUČCI

- Neuroblastni tumori u grupi bolesnika koji su obuhvaćeni istraživanjem su češći u muškom polu (1.5:1) sa medijanom uzrasta u vreme postavljanja dijagnoze za sve NT 36 meseci, a 22 meseca za NB.
- Postoji statistički značajna razlika u uzrastu u odnosu na histološki tip NT. Bolesnici sa GN i iGNB su značajno stariji od bolesnika sa NB.
- Potvrđen je prognostički značaj uzrasta bolesnika za grupe mlađih i starijih od 18 meseci i statistički značajna korelacija uzrasta sa histološkim prognostičkim grupama i *MYCN* amplifikacijom.
- Analizom histoloških parametara pokazana je statistički značajna razlika u preživljavanju između nediferentovanog i slabo diferentovanog tipa NB, kao i između prognostički dobre i loše histološke grupe.
- Status *MYCN* gena je imao najveći prognostički značaj na preživljavanje, a nađena je statistički značajna korelacija *MYCN* amplifikacije sa prognostičkim histološkim grupama, mitotsko-karioretskim indeksom i uzrasnim kategorijama.
- Nađen je statistički značajno veći broj autofagnih vakuola u NB u poređenju sa GN i iGNB, praćen značajno većim brojem oštećenih mitohondrija, češćim prisustvom dilatiranog ER i višom proliferativnom aktivnosti.
- LC3B ekspresija je prisutna u svim tipovima NT, a najviše u uzorcima NB. Step en ove ekspresije nije pokazivao statističku značajnosti u analizi preživljavanja niti korelaciju sa drugim za neuroblastom značajnim prognostičkim parametrima.
- Utvrđena je veća ekspresija *MYCN* proteina u NB u poređenju sa GN i iGNB. U analizi *MYCN* proteinske ekspresije kod NB nađena je statistički značajna

razlika u preživljavanju između grupe sa visokim i niskim stepenom ekspresije ovog proteina. Ekspresija MYCN proteina nije pokazala korelaciju ni sa jednim od analiziranih parametara značajnih za prognozu neuroblastomske bolesti.

- Nije nađena ekspresija MYC proteina u tumorskim ćelijama GN, iGNB i NB. Uočena je sporadična ekspresija MYC proteina u ćelijama novostvorenih krvnih sudova što ukazuje na značaj ovog proteina u procesu angiogeneze.

7. LITERATURA

1. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews. Cancer.* 2003; 3: 203-216.
2. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *The Lancet.* 2007; 369: 2106-2120.
3. Gatta G, Botta L, Rossi S, Aareleid T, Bielska-Lasota M, Clavel J, et al. Childhood cancer survival in Europe 1999–2007: results of EUROCARE-5- a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014; 15: 35–47.
4. Smith MA, Seibel NL, Altekruse SF, Ries LA, Melbert DL, O'Leary M, et al. Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 2625–2634.
5. Papaioannou G, Kieran McH. Neuroblastoma in childhood: review and radiological findings. *Cancer Imaging.* 2005; 5: 116-127.
6. De Beukelaar WJ, Sillevis Smitt AP. Managing paraneoplastic neurological disorders. *Oncologist.* 2006; 11: 293-305.
7. Vujić D, Guć-Šćekić M, Kuzmanović M, Jeftić D, Zečević Ž. Dijagnoza i terapija neuroblastoma. Iz: Zdravković D, urednik. Problemi u pedijatriji. 28 izd. Beograd: Zavod za udžbenike. 2007; 330-341.
8. Powell JE, Esteve J, Mann JR, Parker L, Frappaz D, Michaelis J, et al. Neuroblastoma in Europe: differences in the pattern of disease in the UK. SENSE. Study group for the Evaluation of Neuroblastoma Screening in Europe. *Lancet.* 1998; 352: 682–687.
9. Simpson KJ, Gaze NM. Current management of neuroblastoma. *Oncologist.* 1998; 3: 253-62.
10. Weinstein LJ, Katzenstein MH, Cohn LS. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist.* 2003; 8: 278-292.
11. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1997; 19: 93-101.
12. Ambros PF, Ambros IM. Pathology and biology guidelines for resectable and unresectable neuroblastic tumors and bone marrow examination guidelines. *Med Pediatr Oncol.* 2001; 37: 492–504.

13. Simon T, Hero B, Hunneman DH, Berthold F. Tumour markers are poor predictors for relapse or progression in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 2003; 39: 1899–1903.
14. Berthold F, Trechow R, Utsch S, Zieschang J. Prognostic factors in metastatic neuroblastoma. A multivariate analysis of 182 cases. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1992; 14: 207–215.
15. Shuster JJ, McWilliams NB, Castleberry R, Nitschke R, Smith EI, Altshuler G, et al. Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group recursive partitioning study. *Am J Clin Oncol*. 1992; 15: 295–303.
16. Lau L. Neuroblastoma: a single institution's experience with 128 children and an evaluation of clinical and biological prognostic factors. *Pediatr Hematol Oncol*. 2002; 19: 79–89.
17. Hsiao RJ, Seeger RC, Yu AL, O'Connor DT. Chromogranin A in children with neuroblastoma. Serum concentration parallels disease stage and predicts survival. *J Clin Invest*. 1990; 85: 1555–1559.
18. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castelberry RP, De Bernardi B, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*. 1993; 11: 1466–1477.
19. De Bernardi B, Cohn LS. Risk-based treatment for children with neuroblastoma. In International Society of Paediatric Oncology Education Book 2005. <http://www.siop.nl>. Preuzeto 05.02.2007.
20. Monclair T. The new international neuroblastoma risk group staging system – implications for surgeons. In: International Society of Paediatric Oncology Education Book 2006. <http://www.siop.nl>. Preuzeto 05.02.2007.
21. Goldblum JR, Weiss SW, Folpe AL. Enzinger and Weiss's soft tissue tumors. Elsevier Health Sciences; 2013.
22. Joshi VV. Peripheral neuroblastic tumors: pathologic classification based on Recommendations of International Neuroblastoma Pathology Committee (Modification of Shimada Classification). *Pediatr Devel Pathol*. 2000; 3: 184-199.
23. Ambros IM, Zellner A, Roald B, Amann G, Ladenstein R, Printz D, et al. Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1996; 334: 1505–1511.

24. Krams M, Hero B, Berthold F, Parwarwsch R, Harms D, Rudolph P. Proliferation marker KI-S5 discriminates between favorable and adverse prognosis in advanced stages of neuroblastoma with and without MYCN amplification. *Cancer*. 2002; 94: 854-861.
25. Latimer E, Anderson G, Sebire NJ. Ultrastructural features of neuroblastic tumours in relation to morphological, and molecular findings; a retrospective review study. *BMC Clin Path*. 2014; 14: 13.
26. Miettinen M, Chatten J, Paetau A, Stevenson A. Monoclonal antibody NB84 in the differential diagnosis of neuroblastoma and other small round cell tumors. *Am J Surg Pathol*. 1998; 22: 327-332.
27. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999; 86: 364–372.
28. Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV, Hata J, Roald B, Dehner LP, et al. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer*. 2003; 98: 2274-2281.
29. Shimada H, Chatten J, Newton WA, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, et al. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst*. 1984; 73: 405–416
30. Joshi VV, Cantor AB, Altshuler G, Larkin EW, Neill JS, Shuster JJ, et al. Age-Linked Prognostic Categorization Based on a New Histologic Grading System of Neuroblastomas. A Clinicopathologic Study of 211 Cases From the pediatric Oncology Group. *Cancer*. 1992; 69: 2197-2210.
31. Joshi VV, Cantor AB, Brodeur GM, Look AT, Shuster JJ, Altshuler G, et al. Correlation between morphologic and other prognostic markers of neuroblastoma. A study of histologic grade, DNA index, N-myc gene copy number, and lactic dehydrogenase in patients in Pediatric Oncology Group. *Cancer*. 1993 ; 71: 3173-3181.
32. Umehara S, Nakagawa A, Matthay KK, Lukens JN, Seeger RC, Stram DO, et al. Histopathology defines prognostic subsets of ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer*. 2000; 89: 1150-1161.

33. Dodge HJ, Benner MC. Neuroblastoma of the adrenal medulla in siblings. *Rocky Mt Med.* 1945; 42: 35–38.
34. Knudson AGJr, Strong LC. Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am J Hum Genet.* 1972; 24: 514–532.
35. Kushner BH, Gilbert F, Helson L. Familial neuroblastoma. Case reports, literature review, and etiologic considerations. *Cancer.* 1986; 57: 1887–1893.
36. Maris JM, Brodeur GM. Genetics of neuroblastoma. In: Cowell JK (ed) *Molecular genetics of cancer*, 2nd edn. BIOS, Oxford, 2001. p 335–361.
37. Verloes A, Elmer C, Lacombe D, Heinrichs C, Rebuffat E, Demarquez JL, et al. Ondine-Hirschsprung syndrome (Haddad syndrome). Further delineation in two cases and review of the literature. *Eur J Pediatr.* 1993; 152: 75–77.
38. Amiel J, Laudier B, Attie-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet.* 2003; 33: 459–461.
39. Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, Maris JM. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet.* 2004; 75: 727-730.
40. Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, et al. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet.* 2004; 74: 761-764.
41. Van Limpt V, Schramm A, van Lakeman A, Sluis P, Chan A, van Noesel M, et al. The PHOX2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas. *Oncogene.* 2004; 23: 9280-9288.
42. Raabe EH, Laudenslager M, Winter C, Wasserman N, Cole K, LaQuaglia M, et al. Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. *Oncogene.* 2008; 27: 469-476.
43. Stutterheim J, Gerritsen A, Zappeij-Kannegeieter L, Kleijn I, Dee R, Hooft L, et al. PHOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 5443-5449.

44. Maris JM, Chatten J, Meadows AT, Biegel JA, Brodeur GM. Familial neuroblastoma: a three generation pedigree and a further association with Hirschsprung disease. *Med Pediatr Oncol*. 1997; 28: 1–5.
45. Maris JM, Weiss MJ, Mosse Y, Hii G, Guo C, White PS, et al. Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12–13. *Cancer Res*. 2002; 62: 6651– 6658.
46. Origone P, Defferrari R, Mazzocco K, Lo Cunsolo C, de Bernardi B, Tonini GP. Homozygous inactivation of NF1 gene in a patient with familial NF1 and disseminated neuroblastoma. *Am J Med Genet*. 2003; 118A: 309–313.
47. Martinsson T, Sjoberg RM, Hedborg F, Kogner P. Homozygous deletion of the neurofibromatosis-1 gene in the tumor of a patient with neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997; 95: 183–189.
48. Shojaei-Brosseau T, Chompret A, Abel A, de Vathaire F, Raquin MA, Brugieres L, et al. Genetic epidemiology of neuroblastoma: a study of 426 cases at the Institute Gustave-Roussy in France. *Pediatr Blood Cancer*. 2004; 42: 99-105.
49. Bagatell R, Rumcheva P, London WB, Cohn SL, Look AT, Brodeur GM et al. Outcome of children with intermediate-risk neuroblastoma after treatment stratified by MYCN status and tumor cell ploidy. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 8819-8827.
50. Kaneko Y, Knudson AG. Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000; 29: 89–95.
51. Cox D, Yuncken C, Spriggs AI. Minute chromatin bodies in malignant tumours of childhood. *Lancet*. 1965; 62: 55–58.
52. Biedler JL, Spengler BA. A novel chromosome abnormality in human neuroblastoma and antifolate-resistant Chinese hamster cell lines in culture. *J Natl Cancer Inst*. 1976; 57: 683-695.
53. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-MYC in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984; 224: 1121–1124.
54. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, et al. 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.

55. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H. Association of multiple copies of N-myc oncogene with rapid progression in neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1985; 313: 1111–1116.
56. Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol*. 2003; 4: 472–480.
57. Goto S, Umehara S, Gerbing RB, Stram DO, Brodeur GM, Seeger RC, 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.
58. De Bernardi B, Gerrard M, Boni L, Rubie H, Canete A, Di Cataldo A, et al. Excellent outcome with reduced treatment for infants with disseminated neuroblastoma without MYCN gene amplification. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 1034-1040.
59. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 289-297.
60. Schneiderman J, London WB, Brodeur GM, Castleberry RP, Look TA, Cohn SL. Clinical Significance of *MYCN* Amplification and Ploidy in Favorable-Stage Neuroblastoma: Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 913-918.
61. Bagatell R, Beck-Popovic M, London WB, Zhang Y, Pearson ADJ, Matthay KK, et al. Significance of *MYCN* Amplification in International Neuroblastoma Staging System Stage 1 and 2 Neuroblastoma: A Report From the International Neuroblastoma Risk Group Database. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 365-370.
62. Sears RS. The life cycle of c-Myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle*. 2004; 3: 1133–1137.
63. Schmidt ML, Lal A, Dittmann D. Differential expression in an antisense MYCN neuroblastoma model. *Med Pediatr Oncol* 2000; 35: 669-672.
64. Cohn SL, Salwen H, Quasney MW, Ikegaki N, Cowan JM, Herst CV, et al. Prolonged N-myc protein half-life in a neuroblastoma cell line lacking N-myc amplification. *Oncogene*. 1990; 136: 1043-1052.

65. Wada RK, Seeger RC, Brodeur GM, Eihorn PA, Rayner SA, Tomayko MM, Reynolds CP. Human neuroblastoma cell lines that express N-myc without gene amplification. *Cancer*. 1993; 72: 3346-3354.
66. Sivak LE, Tai KF, Smith RS, Dillon PA, Brodeur GM, Carroll WL. Autoregulation of the human N-myc oncogene is disrupted in amplified but not single-copy neuroblastoma cell lines. *Oncogene*. 1997; 15: 1937-1946.
67. Suganuma R, Wang LL, Sano H, Naranjo A, London WB, Seeger RC, et al. Peripheral Neuroblastic Tumors With Genotype-Phenotype Discordance: A Report From the Children's Oncology Group and the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Pediatr Blood Cancer*. 2013; 60: 363-370.
68. Wang LL, Suganuma R, Ikegaki N, Tang X, Naranjo A, McGrady P, et al. Neuroblastoma of Undifferentiated Subtype, Prognostic Significance of Prominent Nucleolar Formation, and MYC/MYCN Protein Expression. *Cancer*. 2013; 119: 3718-3726.
69. Wang LL, Teshiba R, He L, Naranjo A, London WB, Gastier-Foster JM, et al. MYCN/MYC protein expression in high-MKI (Mitosis-Karyorrhexis Index) neuroblastoma: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer Research* 2014; 74: B40(A).
70. Wang LL, Teshiba R, Ikegaki N, Tang XX, Naranjo A, London WB, et al. Augmented expression of MYC and/or MYCN protein defines highly aggressive MYC-driven neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *Br J Cancer*. 2015; 113: 57-63.
71. Gilbert F, Feder M, Balaban G, Brangman D, Lurie DK, Podolsky R, et al. Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res*. 1984; 44: 5444-5449.
72. Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1999; 340: 1954-61.
73. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 68: 820-823.
74. Brodeur GM, Sekhon G, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer*. 1977; 40: 2256-2263.

75. Brodeur GM, Green AA, Hayes FA, Williams KJ, Williams DL, Tsiatis AA. Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res.* 1981; 41: 4678–4686.
76. Brodeur GM, Nakagawara A. Molecular basis of clinical heterogeneity in neuroblastoma. *Am J Pediatr Hematol-Oncol.* 1992; 14: 111–116.
77. Caron H, Spieker N, Godfried M, Veenstra M, van Sluis P, de Kraker J, et al. Chromosome bands 1p35–36 contain two distinct neuroblastoma tumor suppressor loci, one of which is imprinted. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001; 30: 168–174.
78. Ejeskar K, Sjoberg RM, Abel F, Kogner P, Ambros PF, Martinsson T. Fine mapping of a tumour suppressor candidate gene region in 1p36.2–3, commonly deleted in neuroblastomas and germ cell tumours. *Med Pediatr Oncol.* 2001; 36: 61–66.
79. Hogarty MD, Liu X, Guo C, Thompson PM, Weiss MJ, White PS, et al. Identificaiton of a 1-megabase consensus region of deletion at 1p36.3 in primary neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol.* 2000; 35: 512–515.
80. Maris JM, Guo C, Blake D, White PS, Hogarty MD, Thompson PM, et al. Comprehensive analysis of chromosome 1p deletions in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001; 36: 32–36.
81. Takeda T, Shimada M, Iizuka S, Takasugi N. Effects of mass screening for neuroblastoma and the presumptive natural history of this tumor. *Prog Clin Biol Res.* 1994; 385: 383–388.
82. Maris JM, Weiss MJ, Guo C, Gerbing RB, Stram DO, White PS, et al. 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.
83. Spitz R, Hero B, Westermann F, Ernestus K, Schwab M, Berthold F. Fluorescence in situ hybridization analyses of chromosome band 1p36 in neuroblastoma detect two classes of alterations. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002; 34: 299–305.
84. Maris JM, Guo C, White PS, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, et al. Allelic deletion at chromosome bands 11q14–23 is common in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001; 36: 24–27.

85. Mertens F, Johansson B, Hoglund M, Mitelman F. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res.* 1997; 57: 2765–2780.
86. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F. Gain of distal chromosome arm 17q is not associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 4835–4840.
87. Plantaz D, Vandesompele J, van Roy N, Laureys G, Brinskchmidt C, Christiansen H, et al. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *Int J Cancer.* 2001; 91: 680–686.
88. Guo C, White PS, Hogarty MD, Brodeur GM, Gerbing R, Stram DO, Maris JM. Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol.* 2000; 35: 544–546.
89. Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, et al. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene.* 1999; 18: 4948–4957.
90. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, et al. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer.* 2009; 100: 1471-1482.
91. Beheshti B, Braude I, Marrano P, Thorner P, Zielenska M, Squire JA. Chromosomal localization of DNA amplifications in neuroblastoma tumors using cDNA microarray comparative genomic hybridization. *Neoplasia.* 2003; 5: 53–62.
92. Cowel JK, Nowak NJ. High-resolution analysis of genetic events in cancer cells using bacterial artificial chromosome arrays and comparative genome hybridization. *Adv Cancer Res.* 2003; 90: 91–125.
93. Schleiermacher G, Michon J, Huon I, d'Enghien CD, Klijanienko J, Brisse H, et al. Chromosomal CGH identifies patients with a higher risk of relapse in neuroblastoma without MYCN amplification. *Br J Cancer.* 2007; 97: 238-246.
94. Michels E, De Preter K, Van Roy N, Speleman F. Detection of DNA copy number alterations in cancer by array comparative genomic hybridization. *Genet Med.* 2007; 9: 574-584.

95. Hoebeeck J, Michels E, Menten B, Van Roy N, Eggert A, Schramm A, et al. High resolution tiling-path BAC array deletion mapping suggest commonly involved 3p21-p22 tumor supresor genes in neuroblastoma and more frequent tumors. *Int J Cancer*. 2007; 120: 533-538.
96. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, Lequin D, et al. Overall Genomic Pattern Is a Predictor of Outcome in Neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2009 ; 27: 1026-1033.
97. Nakagawara A, Brodeur GM. Role of neurotrophins and their receptors in human neuroblastomas: a primary culture study. *Eur J Cancer*. 1997; 33: 2050-2053.
98. Suzuki T, Bogenmann E, Shimada H, Stram D, Seeger RC. Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst*. 1993; 85: 377-384.
99. Kogner P, Barbany G, Dominici C, Castello MA, Raschella G, Persson H. Coexpression of meddenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res*. 1993; 53: 2044-2050.
100. Kaplan DR, Miller FD. Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr Opin Neurobiol*. 1995; 5: 579-587.
101. Shimada H, Umehara S, Monoe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, et al. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*. 2003; 92: 2451-2461.
102. Kushner BH. Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. *J Nucl Med*. 2004; 45: 1172-88.
103. Chen N and Karanza V. Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 2011; 11: 157-168.
104. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2010; 90: 1383-1435.
105. Sridhar S, Botbol Y, Macian F, Cuervo AM. Autophagy and disease: always two sides to a problem. *J Pathol*. 2012; 226: 255-273.

106. Kung CP, Budina A, Balaburski G, Bergenstock MK, Murphy M. Autophagy in tumorsuppression and cancer therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2011; 21: 71-100.
107. Wu WK, Coffelt SB, Cho CH, Wang XJ, Lee CW, Chan FK et al. The autophagic paradox in cancer therapy. *Oncogene.* 2012; 31: 939-953.
108. Sui X, Jin L, Huang X, Geng S, He C, Hu X. p53 signaling and autophagy in cancer: a revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. *Autophagy.* 2011; 7: 565-571.
109. Rhodin J. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Dissertation. Karolinska Institutet, Stockholm, 1954.
110. de Duve C. Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. In: Hayashi T, editor. Subcellular particles. New York: Ronald Press Co., 1959. p. 128-159.
111. Raju TN. The Nobel chronicles. 1974: Albert Claude (1899-1983), George Emil Palade (b 1912), and Christian René de Duve (b 1917). *Lancet.* 1999; 354: 1219.
112. de Reuck AVS, Cameron MP. Ciba Foundation Symposium on Lysosomes. London: J.A. Churchill Ltd, 1963.
113. Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy.* 2008; 4: 740-743.
114. Fawcett DW. The Cell. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1981.
115. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science.* 2004; 304: 1500-1502.
116. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol.* 2004; 6: 1221-1228.
117. Sumpter R Jr, Levine B. Selective autophagy and viruses. *Autophagy.* 2011; 7: 260-265.
118. Yordy B, Tal MC, Hayashi K, Arojo O, Iwasaki A. Autophagy and selective deployment of Atg proteins in antiviral defense. *Int Immunol.* 2013; 25: 1-10.
119. Randow F. How cells deploy ubiquitin and autophagy to defend their cytosol from bacterial invasion. *Autophagy.* 2011; 7: 304-309.

120. Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Hain T, Chakraborty T, Sasakawa C. Autophagytargeting of *Listeria monocytogenes* and the bacterial countermeasure. *Autophagy*. 2011; 7: 310-314.
121. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol*. 2012; 22: 407-417.
122. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69: 1125-1136.
123. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*. 2011; 7: 673-682.
124. Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell*. 2011; 20: 131-139.
125. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 931-937.
126. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011; 7: 279-296.
127. Veenhuis M, Douma A, Harder W, Osumi M. Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes. *Arch Microbiol*. 1983; 134: 193-203.
128. Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy*. 2005; 1: 1-10.
129. Kovács AL, Pálfi Z, Réz G, Vellai T, Kovács J. Sequestration revisited: integrating traditional electron microscopy, de novo assembly and new results. *Autophagy*. 2007; 3: 655-662.
130. Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells. *Methods Enzymol*. 2009; 452: 143-164.
131. Eskelinen EL. Fine structure of the autophagosome. *Methods Mol Biol*. 2008; 445: 11-28.
132. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*. 2003; 5: 539-545.
133. Schlumpberger M, Schaeffeler E, Straub M, Bredschneider M, Wolf DH, Thumm M. AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1997; 179: 1068-1076.

134. Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1997; 192: 245-250.
135. Motley AM, Nuttall JM, Hettema EH. Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 2012; 31: 2852-2868.
136. Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol*. 2010; 12: 831-835.
137. Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. The preautophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J*. 2001; 20: 5971-5981.
138. Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res*. 2007; 17: 839-849.
139. Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, Mizushima N. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*. 2009; 5: 973-979.
140. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 1433-1437.
141. Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*. 2009; 5: 1180-1185.
142. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2008; 182: 685-701.
143. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*. 2010; 141: 656-667.
144. Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS et al. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*. 2009; 325: 477-481.

145. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 2013; 495: 389-393.
146. Young AR, Chan EY, Hu XW, Köchl R, Crawshaw SG, High S et al. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci*. 2006; 119: 3888-3900.
147. Tanida I, Sou YS, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem*. 2004; 279: 36268-36276.
148. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016; 12: 1-222.
149. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*. 2012; 151: 1256-1269.
150. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science*. 2010; 330: 1344-1348.
151. Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*. 2010; 465: 942-946.
152. Rong Y, Liu M, Ma L, Du W, Zhang H, Tian Y et al. Clathrin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulate autophagic lysosome reformation. *Nat Cell Biol*. 2012; 14: 924-934.
153. Clague MJ, Urbé S, de Lartigue J. Phosphoinositides and the endocytic pathway. *Exp Cell Res*. 2009; 315: 1627-1631.
154. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*. 2009; 43: 67-93.
155. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*. 2005; 121: 179-193.

156. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*. 2006; 441: 424-430.
157. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008; 30: 214-226.
158. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011; 13: 132-41.
159. Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, Liu R, Zhong Q, Guan KL. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*. 2013; 152: 290-303.
160. Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*. 2009; 461: 654-658.
161. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999; 402: 672-676.
162. Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*. 1999; 59: 59-65.
163. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*. 2003; 112: 1809–1820.
164. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 15077–15082.
165. Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, Lopez-Otin C. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem*. 2007; 282: 18573–18583.
166. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cialing HD, Sun M, Sato Y et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*. 2007; 9: 1142–1151.

167. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH et al. Autophagic and tumoursuppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol.* 2006; 8: 688–699.
168. Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P et al. The tumoursuppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting thephosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem.* 2001; 276: 35243–35246.
169. Gozuacik D, Kimchi A. DAPk protein family and cancer. *Autophagy.* 2006; 2: 74-79.
170. Kang C, Avery L. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: finetuningof autophagy in Caenorhabditis elegans homeostasis. *FEBS J.* 2010; 277: 66-73.
171. Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R et al. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ.* 2009; 16: 87-93.
172. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 961-967.
173. Shen S, Kepp O, Kroemer G. The end of autophagic cell death? *Autophagy.* 2012; 8: 1-3.
174. Kenific CM, Thorburn A, Debnath J: Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22: 241-245.
175. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther.* 2011; 10: 1533-1541.
176. Martin SJ. Oncogene-induced autophagy and the Goldilocks principle. *Autophagy.* 2011; 7: 922-923.
177. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144: 646- 674.
178. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12: 9-14.
179. Springer W, Kahle PJ. Regulation of PINK1-Parkin-mediated mitophagy. *Autophagy.* 2011; 7: 266-278.

180. Rambold AS, Kostelecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 10190-10195.
181. Kongara S, Karantza V. The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis. *Front Oncol*. 2012; 2: 171.
182. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 401-410.
183. Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao TP. Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol*. 2010; 189: 671-679.
184. Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J*. 2010; 29: 969-980.
185. Okatsu K, Saisho K, Shimanuki M, Nakada K, Shitara H, Sou YS et al. p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells*. 2010; 15: 887-900.
186. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 378-383.
187. Cesari R, Martin ES, Calin GA, Pentimalli F, Bichi R, McAdams H et al. Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 5956-5961.
188. Picchio MC, Martin ES, Cesari R, Calin GA, Yendamuri S, Kuroki T et al. Alterations of the tumor suppressor gene Parkin in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 2720-2724.
189. Wang F, Denison S, Lai JP, Philips LA, Montoya D, Kock N et al. Parkin gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004; 40: 85-96.
190. Pouligiannis G, McIntyre RE, Dimitriadi M, Apps JR, Wilson CH, Ichimura K et al. PARK2 deletions occur frequently in sporadic colorectal cancer and accelerate adenoma development in Apc mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 15145-15150.

191. Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y et al. Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2008; 27: 6002-6011.
192. Price JC, Guan S, Burlingame A, Prusiner SB, Ghaemmaghami S. Analysis of proteome dynamics in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 14508-14513.
193. Cambridge SB, Gnad F, Nguyen C, Bermejo JL, Krüger M, Mann M. Systems-wide proteomic analysis in mammalian cells reveals conserved, functional protein turnover. *J Proteome Res*. 2011; 10: 5275-5284.
194. Savas JN, Toyama BH, Xu T, Yates JR 3rd, Hetzer MW. Extremely long-lived nuclear pore proteins in the rat brain. *Science*. 2012; 335:942.
195. Chen B, Retzlaff M, Roos T, Frydman J. Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011; 3: a004374.
196. Nagaoka U, Kim K, Jana NR, Doi H, Maruyama M, Mitsui K et al. Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions. *J Neurochem*. 2004; 91: 57-68.
197. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*. 2009; 137: 1062-1075.
198. Duran A, Amanchy R, Linares JF, Joshi J, Abu-Baker S, Porollo A et al. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell*. 2011; 44: 134-146.
199. Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem*. 2006; 281: 30299-30304.
200. Deegan S, Saveljeva S, Gorman AM, Samali A. Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70: 2425-2441.
201. Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 9220-9231.
202. Rao R, Balusu R, Fiskus W, Mudunuru U, Venkannagari S, Chauhan L et al. Combination of pan-histone deacetylase inhibitor and autophagy inhibitor exerts superior efficacy against triple-negative human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2012; 11: 973-983.

203. Thomas S, Sharma N, Golden EB, Cho H, Agarwal P, Gaffney KJ et al. Preferential killing of triple-negative breast cancer cells in vitro and in vivo when pharmacological aggravators of endoplasmic reticulum stress are combined with autophagy inhibitors. *Cancer Lett.* 2012; 325: 63-71.
204. Eskelinen EL, Reggiori F, Baba M, Kovacs AL, Seglen PO. Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy.* 2011; 7: 935-956.
205. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010; 140: 313-326.
206. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 2012; 8: 445-544.
207. Phadwal K, Alegre-Abarrategui J, Watson AS, Pike L, Anbalagan S, Hammond EM et al. A novel method for autophagy detection in primary cells: impaired levels of macroautophagy in immunosenescent T cells. *Autophagy.* 2012; 8: 677-689.
208. Wang L, Chen M, Yang J, Zhang Z. LC3 fluorescent puncta in autophagosomes or in protein aggregates can be distinguished by FRAP analysis in living cells. *Autophagy.* 2013; 9: 756-769.
209. Kraft LJ, Kenworthy AK. Imaging protein complex formation in the autophagy pathway: analysis of the interaction of LC3 and Atg4BC⁷⁴A in live cells using Förster resonance energy transfer and fluorescence recovery after photobleaching. *J Biomed Opt.* 2012; 17: 011008.
300. Hancock MK, Hermanson SB, Dolman NJ. A quantitative TR-FRET plate reader immunoassay for measuring autophagy. *Autophagy.* 2012; 8: 1227-1244.
301. Schneider G, Guttmann P, Heim S, Rehbein S, Mueller F, Nagashima K et al. Three dimensional cellular ultrastructure resolved by X-ray microscopy. *Nat Methods.* 2010; 7: 985-987.
302. Rosenfeldt MT, Nixon C, Liu E, Mah LY, Ryan KM. Analysis of macroautophagy by immunohistochemistry. *Autophagy.* 2012; 8: 963-969.
303. Martinet W, Schrijvers DM, Timmermans JP, Bult H, De Meyer GR. Immunohistochemical analysis of macroautophagy: Recommendations and limitations. *Autophagy.* 2013; 9: 386-402.

304. Alva AS, Gultekin SH, Baehrecke EH. Autophagy in human tumors: cell survival or death? *Cell Death Differ.* 2004; 11: 1046-1048.
305. Watson AS, Mortensen M, Simon AK. Autophagy in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Cell Cycle.* 2011; 10: 1719-1725.
306. Puissant A, Robert G, Auberger P. Targeting autophagy to fight hematopoietic malignancies. *Cell Cycle.* 2010; 9: 3470-3478.
307. Helgason GV, Karvela M, Holyoake TL. Kill one bird with two stones: potential efficacy of BCR-ABL and autophagy inhibition in CML. *Blood.* 2011; 118: 2035-2043.
308. MacCallum SF, Groves MJ, James J, Murray K, Appleyard V, Prescott AR et al. Dysregulation of autophagy in chronic lymphocytic leukemia with the small-molecule Sirtuin inhibitor Tenovin-6. *Sci Rep.* 2013; 3: 1275.
309. Mahoney E, Maddocks K, Flynn J, Jones J, Cole SL, Zhang X et al. Identification of endoplasmic reticulum stress-inducing agents by antagonizing autophagy: a new potential strategy for identification of anti-cancer therapeutics in B-cell malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2013; 54: 2685-2692.
310. Kovaleva V, Mora R, Park YJ, Plass C, Chiramel AI, Bartenschlager R et al. miRNA-130 a targets ATG2B and DICER1 to inhibit autophagy and trigger killing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer Res.* 2012; 72: 1763-1772.
311. Amrein L, Soulières D, Johnston JB, Aloyz R. p53 and autophagy contribute to dasatinib resistance in primary CLL lymphocytes. *Leuk Res.* 2011; 35: 99-102.
312. Hart LS, Cunningham JT, Datta T, Dey S, Tameire F, Lehman SL et al. ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *J Clin Invest.* 2012; 122: 4621-4634.
313. Cloonan SM, Williams DC. The antidepressants maprotiline and fluoxetine induce Type II autophagic cell death in drug-resistant Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer.* 2011; 128: 1712-1723.
314. Jia L, Gopinathan G, Sukumar JT, Gribben JG. Blocking autophagy prevents bortezomib induced NF- κ B activation by reducing I- κ B α degradation in lymphoma cells. *PLoS One.* 2012; 7: e32584.
315. Ryter SW, Choi AM. Autophagy in the lung. *Proc Am Thorac Soc.* 2010; 7: 13-21.

316. Liu F, Liu D, Yang Y, Zhao S. Effect of autophagy inhibition on chemotherapy-induced apoptosis in A549 lung cancer cells. *Oncol Lett.* 2013; 5: 1261-1265.
317. Zou Y, Ling YH, Sironi J, Schwartz EL, Perez-Soler R, Piperdi B. The Autophagy Inhibitor Chloroquine Overcomes the Innate Resistance of Wild-Type EGFR Non-Small-Cell Lung Cancer Cells to Erlotinib. *J Thorac Oncol.* 2013; 8: 693-702.
318. Pan X, Zhang X, Sun H, Zhang J, Yan M, Zhang H. Autophagy inhibition promotes 5-fluorouraci-induced apoptosis by stimulating ROS formation in human non-small cell lung cancer A549 cells. *PLoS One.* 2013; 8: e56679.
319. Tu YJ, Fan X, Yang X, Zhang C, Liang HP. Evodiamine activates autophagy as a cytoprotective response in murine Lewis lung carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2013; 29: 481-490.
320. Lee JG, Wu R. Combination erlotinib-cisplatin and Atg3-mediated autophagy in erlotinib resistant lung cancer. *PLoS One.* 2012; 7: e48532.
321. Kaminsky VO, Piskunova T, Zborovskaya IB, Tchevkina EM, Zhivotovsky B. Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and -independent apoptosis by stimulating ROS formation. *Autophagy.* 2012; 8: 1032-1044.
322. Kim EJ, Jeong JH, Bae S, Kang S, Kim CH, Lim YB. mTOR inhibitors radiosensitize PTEN-deficient non-small-cell lung cancer cells harboring an EGFR activating mutation by inducing autophagy. *J Cell Biochem.* 2013; 114: 1248-1256.
323. Chang SH, Minai-Tehrani A, Shin JY, Park S, Kim JE, Yu KN et al. Beclin1-induced autophagy abrogates radioresistance of lung cancer cells by suppressing osteopontin. *J Radiat Res.* 2012; 53: 422-432.
324. Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, Yamasaki M, Sohma I, Gotoh K et al. LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers. *Int J Oncol.* 2008; 33: 461-468.
325. Liu D, Yang Y, Liu Q, Wang J. Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Med Oncol.* 2011; 28: 105- 111.
326. Liu DL, Zhang JG, Wang JJ. Autophagy: a potential mechanism for resistance of esophageal squamous cell carcinoma to therapy. *J Formos Med Assoc.* 2010; 109: 775-776.

327. Chen YS, Song HX, Lu Y, Li X, Chen T, Zhang Y et al. Autophagy inhibition contributes to radiation sensitization of esophageal squamous carcinoma cells. *Dis Esophagus*. 2011; 24: 437-443.
328. O'Donovan TR, O'Sullivan GC, McKenna SL. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. *Autophagy*. 2011; 7: 509-524.
329. Li Y, Zhang J, Ma H, Chen X, Liu T, Jiao Z et al. Protective role of autophagy in matrine induced gastric cancer cell death. *Int J Oncol*. 2013; 42: 1417-1426.
330. Humbert M, Medová M, Aebersold DM, Blaukat A, Bladt F, Fey MF et al. Protective autophagy is involved in resistance towards MET inhibitors in human gastric adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 431: 264-269.
331. Zhan Z, Li Q, Wu P, Ye Y, Tseng HY, Zhang L et al. Autophagy-mediated HMGB1 release antagonizes apoptosis of gastric cancer cells induced by vincristine via transcriptional regulation of Mcl-1. *Autophagy*. 2012; 8: 109-121.
332. Xu L, Qu XJ, Liu YP, Xu YY, Liu J, Hou KZ et al. Protective autophagy antagonizes oxaliplatin-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Chin J Cancer*. 2011; 30: 490-496.
333. Wang K, Liu R, Li J, Mao J, Lei Y, Wu J et al. Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1 α -mediated signaling. *Autophagy*. 2011; 7: 966-978.
334. Liu J, Zhang Y, Qu J, Xu L, Hou K, Zhang J et al. β -Elemene-induced autophagy protects human gastric cancer cells from undergoing apoptosis. *BMC Cancer*. 2011; 11: 183.
335. Selvakumaran M, Amaravadi R, Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. Autophagy Inhibition Sensitizes Colon Cancer Cells to Anti-angiogenic and Cytotoxic Therapy. *Clin Cancer Res*. 2013; 19: 2995-3007.
336. Li DD, Sun T, Wu XQ, Chen SP, Deng R, Jiang S et al. The inhibition of autophagy sensitises colon cancer cells with wild-type p53 but not mutant p53 to topotecan treatment. *PLoS One*. 2012; 7: e45058.
337. Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, Kawai K, Hongo K, Hiyoshi M et al. Resistance of colon cancer to 5-fluorouracil may be overcome by combination with chloroquine, an in vivo study. *Anticancer Drugs*. 2012; 23: 675-682.

338. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Kuwano H. Inhibition of autophagy augments 5- fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. *Eur J Cancer*. 2010; 46: 1900-1909.
339. Chiou SK, Hoa N, Ge L, Jadus MR. Nutrient availability alters the effect of autophagy on sulindac sulfide-induced colon cancer cell apoptosis. *Gastroenterol Res Pract*. 2012; 2012: 897678.
340. Basile V, Belluti S, Ferrari E, Gozzoli C, Ganassi S, Quaglino D et al. bis-dehydroxy-curcumin triggers mitochondrial-associated cell death in human colon cancer cells through ER-stress induced autophagy. *PLoS One*. 2013; 8: e53664.
341. Biggers JW, Nguyen T, Di X, Gupton JT, Henderson SC, Emery SM et al. Autophagy, cell death and sustained senescence arrest in B16/F10 melanoma cells and HCT-116 colon carcinoma cells in response to the novel microtubule poison, JG-03-14. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013; 71: 441-455.
342. Del Bello B, Toscano M, Moretti D, Maellaro E. Cisplatin-induced apoptosis inhibits autophagy, which acts as a pro-survival mechanism in human melanomacells. *PLoS One*. 2013; 8: e57236.
343. Xie X, White EP, Mehnert JM. Coordinate autophagy and mTOR pathway inhibition enhances cell death in melanoma. *PLoS One*. 2013; 8: e55096.
344. Marino ML, Pellegrini P, Di Lernia G, Djavaheri-Mergny M, Brnjic S, Zhang X et al. Autophagy is a protective mechanism for human melanoma cells under acidic stress. *J Biol Chem*. 2012; 287: 30664-30676.
345. Orlotti NI, Cimino-Reale G, Borghini E, Pennati M, Sissi C, Perrone F et al. Autophagy acts as a safeguard mechanism against G-quadruplex ligand-mediated DNA damage. *Autophagy*. 2012; 8: 1185-1196.
346. Liang X, De Vera ME, Buchser WJ, Romo de Vivar Chavez A, Loughran P, Beer Stolz D et al. Inhibiting systemic autophagy during interleukin 2 immunotherapy promotes longterm tumor regression. *Cancer Res*. 2012; 72: 2791-2801.
347. Li X, Wu D, Shen J, Zhou M, Lu Y. Rapamycin induces autophagy in the melanoma cell line M14 via regulation of the expression levels of Bcl-2 and Bax. *Oncol Lett*. 2013; 5: 167-172.
348. Luo C, Li Y, Wang H, Cui Y, Feng Z, Li H et al. Hydroxytyrosol Promotes Superoxide Production and Defects in Autophagy Leading to Anti-Proliferative and

- Apoptotic Effects on Human Prostate Cancer Cells. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013; 13: 625-639.
349. Boutin B, Tajeddine N, Vandersmissen P, Zanou N, Van Schoor M, Mondin L et al. Androgen deprivation and androgen receptor competition by bicalutamide induce autophagy of hormone-resistant prostate cancer cells and confer resistance to apoptosis. *Prostate*. 2013; 111: 256-261.
350. Yu L, Tumati V, Tseng SF, Hsu FM, Kim DN, Hong D et al. DAB2IP regulates autophagy in prostate cancer in response to combined treatment of radiation and a DNA-PKcs inhibitor. *Neoplasia*. 2012; 14: 1203-1212.
351. Tomasetti M, Nocchi L, Neuzil J, Goodwin J, Nguyen M, Dong L et al. Alpha-tocopheryl succinate inhibits autophagic survival of prostate cancer cells induced by vitamin K3 and ascorbate to trigger cell death. *PLoS One*. 2012; 7: e52263.
352. Lamoureux F, Thomas C, Crafter C, Kumano M, Zhang F, Davies BR et al. Blocked autophagy using lysosomotropic agents sensitizes resistant prostate tumor cells to the novel Akt inhibitor AZD5363. *Clin Cancer Res*. 2013; 19: 833-844.
353. Shi Y, Han JJ, Tennakoon JB, Mehta FF, Merchant FA, Burns AR et al. Androgens promote prostate cancer cell growth through induction of autophagy. *Mol Endocrinol*. 2013; 27: 280-295.
354. Lin JF, Tsai TF, Liao PC, Lin YH, Lin YC, Chen HE et al. Benzyl isothiocyanate induces protective autophagy in human prostate cancer cells via inhibition of mTOR signaling. *Carcinogenesis*. 2013; 34: 406-414.
355. Kumano M, Furukawa J, Shiota M, Zardan A, Zhang F, Beraldi E et al. Cotargeting stress activated Hsp27 and autophagy as a combinatorial strategy to amplify endoplasmic reticular stress in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*. 2012; 11: 1661-1671.
356. Saleem A, Dvorzhinski D, Santanam U, Mathew R, Bray K, Stein M et al. Effect of dual inhibition of apoptosis and autophagy in prostate cancer. *Prostate*. 2012; 72: 1374-1381.
357. Xu S, Weihua Z. Loss of EGFR induced autophagy sensitizes hormone refractory prostate cancer cells to adriamycin. *Prostate*. 2011; 71: 1216-1224.
358. Wu Z, Chang PC, Yang JC, Chu CY, Wang LY, Chen NT et al. Autophagy Blockade Sensitizes Prostate Cancer Cells towards Src Family Kinase Inhibitors. *Genes Cancer*. 2010; 1: 40-49.

359. Turner LS, Cheng JC, Beckham TH, Keane TE, Norris JS, Liu X. Autophagy is increased in prostate cancer cells overexpressing acid ceramidase and enhances resistance to C6 ceramide. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2011; 14: 30-37.
360. Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev.* 2011; 25: 717-729.
361. Nagy P, Varga A, Pircs K, Hegedus K, Juhasz G. Myc-Driven Overgrowth Requires Unfolded Protein Response-Mediated Induction of Autophagy and Antioxidant Responses in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 2013; 9: e1003664.
362. Wang J, Gu S, Huang J, Chen S, Zhang Z, Xu M. Inhibition of autophagy potentiates the efficacy of Gli inhibitor GANT-61 in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *BMC Cancer.* 2014; 14: 768.
363. Fulda S, Lutz W, Schwab M, Debatin KM: MycN sensitizes neuroblastoma cells for drug-induced apoptosis. *Oncogene.* 1999; 18: 1479–1486
364. Li H, Li J, Li Y, Singh P, Cao L, Xu LJ, et al. Sonic hedgehog promotes autophagy of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012; 303: H1319–H1331.
365. Oehme I, Linke JP, Bock BC, Milde T, Lodrini M, Hartenstein B, et al. Histone deacetylase 10 promotes autophagy-mediated cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: E2592–E2601.
366. Balakumaran BS, Porrello A, Hsu DS, Glover W, Foye A, Leung JY, et al. MYC Activity mitigates response to rapamycin in prostate cancer through eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1-mediated inhibition of autophagy. *Cancer Res.* 2009; 69: 7803–7810.
367. Takahashi Y, Hori T, Cooper TK, Liao J, Desai N, Serfass JM, et al. Bcl-1 haploinsufficiency promotes chromosomal instability and accelerates Myc-driven lymphomagenesis via suppression of mitophagy. *Blood.* 2013; 121: 1622–1632.
368. Chen N, Zhou Q. Constructing tissue microarrays without prefabricating recipient blocks. A novel approach. *Am J Clin Pathol.* 2005; 124: 103-107.

369. Rubin MA, Dunn R, Strawderman M, Pienta KJ. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol*. 2002; 26: 312-319.
370. Schlafli AM, Berezowska S, Adams O, Langer R, Tschan MP. Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry. *Eur J Histochem*. 2015; 59: 2481. doi: 10.4081/ejh.2015.2481.
371. Zimling ZG, Rechityer, Rasmussen M, Petersen BL. Peripheral neuroblastic tumors in estern Denmark 1972-2002. *APMIS*. 2007; 115: 66-74.
372. Altungoz O, Aygun N, Tumer S, Ozer E, Olgun N, Sakizli M. Correlation of modified Shimada classification with MYCN and 1p status detected by fluorescence in situ hybridization in neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007; 172: 113-119.
373. Das G, Shrivage BV, Baehrecke EH. Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4: a008813. doi:10.1101/cshperspect.a008813.
374. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006; 10: 51-64.
375. Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, et al. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res*. 2007; 67: 9677-9684.
376. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*. 2000; 19: 5720-5728.
377. Zimmerman KA, Yancopoulos GD, Collum RG, Smith RK, Kohl NE, Denis KA, et al. Differential expression of myc family genes during murin development. *Nature*. 1986; 319: 780-783.
378. Reddy CD, Patti R, Gattapalli A, Maris JM, Yanamandra N, Rachamalla A, et al. Anticancer effects of novel 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 hybrid analog QW1624F2-2 in human neuroblastoma. *J Cell Biochem*. 2006; 97: 198-206.
379. Han S, Wada RK, Sidell N. Differentiation of human neuroblastoma by phenylacetat is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cancer Res*. 2001; 61: 3998-4002.

380. Megison ML, Stewart JE, Nabers HC, Gillory LA, Beierle EA. FAK inhibition decreases cell invasion, migration and metastasis in MYCN amplified neuroblastoma. *Clin Exp Metastasis*. 2013; 30: 555-568.
381. Golubovskaya VM, Finch R, Kweh F, Massoll NA, Campbell-Thompson M, Wallace MR, Cance WG. P53 regulates FAK expression in human tumor cells. *Mol Carcinog*. 2008; 47: 373-382.
382. Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386: 671-674.
383. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86: 353-364.
384. Baudino TA, McKay C, Pendeville-Samain H, Nilsson JA, Maclean KH, White EL, et al. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev*. 2002; 16: 2530-2543.

SKRAĆENICE

NB	Neuroblastom
GNB	Ganglioneuroblastom
GN	Ganglioneurom
NT	Neuroblastni tumori
INDC	Internacionalni dijagnostički kriterijumi za neuroblastom (International Neuroblastoma Diagnostic Criteria)
VMA	Vanilmandelična kiselina
HVA	Homovanilinska kiselina
NSE	Neuron-specifična enolaza
LDH	Laktat dehidrogenaza
POG	Pedijatrijska onkološka grupa (Pediatric Oncology Group)
INSS	Međunarodni sistem za određivanje stadijuma neuroblastoma (International Neuroblastoma Staging System)
INRG	Međunarodna grupa za procenu rizika od neuroblastoma (International Neuroblastoma Risk Group)
INRGSS	Međunarodni sistem za određivanje stadijuma grupe za procenu rizika od neuroblastoma (International Neuroblastoma Risk Group Staging System)
INPC	Internacionalna patološka klasifikacija neuroblastoma (International Neuroblastoma Pathology Classification)
UD	Nediferentovani
PD	Slabo diferentovani
D	Diferencirajući
FH	Histološki dobra prognoza (favorable histology)
UH	Histološki loša prognoza (unfavorable histology)
iGNB	Intermikсни ganglioneuroblastom
nGNB	Nodularni ganglioneuroblastom
HSR	Homogeno obojeni hromozomski regioni (homogeneously staining regions)
DM	Dvostruki minutni hromozomi (double minutes)
TSG	Tumor supresorski gen

CCG	Dečja kancer grupa (Children's Cancer Group)
CGH	Komparativna genomska hibridizacija
COG	Grupa za dečju onkologiju (Children Oncology Group)
PAS	Preautofagozomalna struktura
ER	Endoplazmatski retikulum
mTOR	Serin/treonin protein kinaza koja predstavlja mesto za vezivanje rapamicina (mammalian target of rapamycin)
MAP1-LC3	Mikrotubul-asocirani protein 1 laki lanac 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3)
LOH	Gubitak heterozigotnosti (loss of heterozygosity)
UPR	Odgovor na prisustvo pogrešno savijenih proteina (unfolded protein response)
HE	Hematoksilin-eozin
MKI	Mitotsko-karioretski indeks
TMA	Tkivni mikroniz (tissue microarray)
FISH	Fluorescentna in situ hibridizacija
TEM	Transmisiona elektronska mikroskopija
TMCH	Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze
IHH	Imunohistohemija

BIOGRAFIJA

Dr Gordana Samardžija (devojačko Lukić) rođena je 08.01.1969. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju.

Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 1996. godine sa prosečnom ocenom 8,90, a specijalistički ispit iz Patološke anatomije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu položila je sa ocenom odličan 2006. godine.

Magistarsku tezu pod nazivom “Značaj nove međunarodne patološke klasifikacije, *MYCN* amplifikacije i *Ip* delecije u prognozi neuroblastnih tumora” (mentor prof. dr Ljiljana Luković, komentor dr sc. med Slaviša Đuričić) odbranila je 2011. godine.

U periodu 1995-2000. godine radila je kao stručni saradnik u prodaji medicinske opreme u firmama Media Zemun i Biotec International.

Tokom 2001. godine zaposlena je u KCS, Institut za ginekologiju i akušerstvo kao lekar na specijalizaciji iz Patološke anatomije u Službi patologije.

Od 2002. godine radi kao stalno zaposleni lekar u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić”, u Odeljenju za kliničku patologiju, na radnom mestu lekar specijalista patolog, a od 2015. godine na radnom mestu šefa Odseka za protočnu citometriju i imunologiju.

Član je Srpskog lekarskog društva, Udruženja patologa i citologa Srbije i Evropskog udruženja patologa (ESP).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Gordana Lj Samardžija

broj upisa _____

Izjavljujem

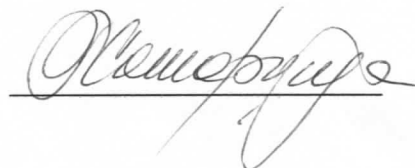
da je doktorska disertacija pod naslovom

„КОРЕЛАЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ МУС И МУСН ПРОТЕИНА И АУТОФАГИЈЕ У НЕУРОБЛАСТНИМ ТУМОРИМА ДЕЧЈЕГ ДОБА“

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.05.2016



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Gordana Lj Samardžija

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada “Korelacija ekspresije MYC i MYCN proteina i autofagije u neuroblastnim tumorima dečjeg doba”

Mentor Prof. dr Dragana Vujić

Komentor VNS dr Slaviša Đuričić

Potpisana Gordana Lj Samardžija

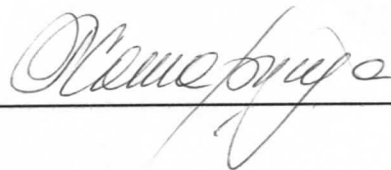
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.05.2016.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Svetozar Marković" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju po naslovom:

"Korelacija ekspresije MYC i MYCN proteina i autofagije u neuroblastnim tumorima dečjeg doba"

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 27.05.2016.

Potpis doktoranda

