

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Aleksandra Wieczorek

Ocena wpływu białka Id2 na rokowanie w zwojaku zarodkowym
u dzieci

Praca doktorska

Promotor: dr hab. med. Walentyna Balwierz

Pracę wykonano
w Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum
Kierownik jednostki dr hab. med. Walentyna Balwierz

Kraków, 2008

Pani Profesor Walentynie Balwierz
wyrażam ogromną wdzięczność i podziękowanie
za inspirację, cenne uwagi merytoryczne,
poświęcony czas i wsparcie w czasie realizacji
i pisania pracy

SPIS TREŚCI

1. Wstęp.....	8
1.1.Charakterystyka nowotworu i przebieg kliniczny	8
1.2.Charakterystyka kliniczna	8
1.3.Kryteria diagnostyczne	11
1.4.Metody leczenia	12
1.5.Budowa histopatologiczna guza	13
1.6.Zaburzenia genetyczne.....	15
1.6.1.Zawartość DNA w guzie	17
1.6.2.Zaburzenia chromosomalne	17
1.6.3.Amplifikacja MYCN.....	21
1.7.Zaburzenia apoptozy	23
1.8.Inne zaburzenia biologiczne w neuroblastoma	24
1.8.1.Receptory dla neurotrofin	24
1.8.2.Zaburzenia genów supresorowych	24
1.9.Rola białka Id2 w neuroblastoma	26
1.10.Białko oporności wielolekowej	36
1.11.Inne markery o potencjalnym znaczeniu prognostycznym	36
1.12.Biochemiczne czynniki prognostyczne.....	37
1.12.1.Enolaza neurospecyficzna	37
1.12.2.Ferrytyna	37
1.12.3.Dehydrogenaza mleczanowa	37
1.12.4.Poziom katecholamin i ich metabolitów w surowicy	37
2. Cel i uzasadnienie pracy	38
2.1.Cel pracy	38
2.2.Uzasadnienie pracy	38
3. Pacjenci i metody.....	39
3.1.Charakterystyka pacjentów	39
3.2.Leczenie	42
3.3.Retrospektywna ocena parametrów biochemicznych.....	45
3.4.Ocena histopatologiczna	45
3.5.Ocena ekspresji białka Id2	46
3.6.Retrospektywne badanie cytogenetyczne metodą immunofluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i>	46
3.7.Analiza statystyczna	48
3.7.1.Metoda statystyczna	48
3.7.2.Charakterystyka przeprowadzonych analiz.....	48
4. Wyniki	50
4.1.Wyniki własnych badań laboratoryjnych	50
4.2.Analiza wpływu wybranych czynników prognostycznych na występowanie zgonów i niepowodzeń leczenia oraz na czas przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od choroby	52
4.3.Analiza wpływu intensywności ekspresji białka Id2 i odsetka komórek NBL z obecną amplifikacją białka Id2 na występowanie zgonów oraz niepowodzeń leczenia i przeżycie całkowite, oraz przeżycie wolne od choroby	92
4.4.Analiza korelacji odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 z czasem przeżyć całkowitych i czasem wolnym od niepowodzenia leczenia oraz wybranymi czynnikami prognostycznymi i markerami choroby	105

4.5. Analiza różnic w występowaniu zgonów z NBL, wznowy lub progresji choroby w zależności od odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 i intensywności ekspresji tego białka.....	108
4.5.1. Ocena wpływu odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 na zgony i niepowodzenia leczenia	108
4.5.2. Czas całkowitego przeżycia i czas wolny od niepowodzeń leczenia, a intensywność ekspresji białka Id2	110
4.5.3. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2, a obecna amplifikacja genu MYCN	115
4.6 Model regresji proporcjonalnego hazardu Coxa	117
5. Omówienie i dyskusja	139
6. Wnioski	151
7. Streszczenie	152
8. Abstract	154
9. Piśmiennictwo	156
10. Spis tabel	163
11. Spis rysunków	166
12. Fotografie	170
12.1. Budowa histopatologiczna	170
12.2. Ocena amplifikacji onkogenu MYCN metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ.....	172
12.3. Ocena immunohistochemiczna w kierunku obecności ekspresji białka Id2.....	175
13. Aneks 1. Wyniki analiz statystycznych.....	179

INDEKS SKRÓTÓW

1p	Krótkie ramię chromosomu 1
11q	Długie ramię chromosomu 11
13-cis-RA	Kwas 13-cis retinowy
17q	Długie ramię chromosomu 17
2N	Diploidalny Indeks DNA
4N	Tetraploidalny Indeks DNA
Bax	Białko z rodziny bcl
Bcl-2	Nazwa białka
BDNF	Neotropowy Czynn timer Pochodzenia Nerwowego (<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)
CADO	Akronim schematu chemioterapii (cyklofosfamid, adriamycyna, winkrystyna)
CCRI	<i>Children's Cancer Research Institute</i>
CDK	Kinaza zależna od cyklin (<i>Cyclin Dependent Kinase</i>)
CGH	Metoda komparatywnej hybrydyzacji genowej (<i>Comparative Genomic Hybrydyzation</i>)
COJEC	Chemioterapia indukcyjna w protokole HR-NBL-1-ESIOP
DAPI	Barwnik jądra stosowany w immunofluorescencji
DDX1	Nazwa genu
DFS	Przeżycia wolne od choroby (<i>Disease Free Survival</i>)
DNA	Kwas dezoksyrybonukleinowy (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EFS	Przeżycia wolne od niekorzystnych zdarzeń (<i>Event Free Survival</i>)
Fas	Białko przez błonowe
FISH	Immunofluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (<i>Immunofluorescence in situ Hybrydyzation</i>)
GD2	Disialogangliozyd obecny na komórkach neuroblastoma
HE	Hematoksylina - eozyna
HLH	Struktura helisa – pętla – helisa (<i>Helix-Loop-Helix</i>)
HR-NBL-1-ESIOP	Akronim pierwszego europejskiego protokołu leczenia neuroblastoma wysokiego ryzyka

HVA	Kwas homowanilinowy (<i>Homovanilic Acid</i>)
Id	Nazwa białka (<i>Inhibitor of Differentiation/DNA binding</i>)
INPC	Międzynarodowa Klasyfikacja Patologiczna Neuroblastoma (<i>International Neuroblastoma Pathological Criteria</i>)
INSS	Międzynarodowa Klasyfikacja Oceny Stopnia Zaawansowania Neuroblastoma (<i>International Neuroblastoma Staging System</i>)
LDH	Dehydrogenaza mleczanowa (<i>Lactate dehydrogenaze</i>)
LOH	Utrata heterozygotyczności (<i>Loss of heterozygosity</i>)
Max	Nazwa białka
MDM2	Nazwa genu
MIBG	Metoksyjodobenzylguanidyna; substancja znakowana jodem radioaktywnym używana w diagnostyce i leczeniu neuroblastoma
MKI	Indeks kariomitotyczny (<i>Mitosis-Karyorrhexis Index</i>)
MR	Odpowiedź mieszana (<i>Mixed Response</i>)
mRNA	Informacyjny kwas rybonukleinowy (<i>Messenger Rybonucleic Acid</i>)
MRP	Białko oporności wielolekowej (<i>Multidrug Resistance Protein</i>)
MYCN	Nazwa onkogenu
MycN	Białko kodowane przez gen MYCN
NaSCN	Cjanek sodu
NBL	Zwojak zarodkowy współczulny, neuroblastoma
NGF	Nerwowy czynnik wzrostu (<i>Nerve Growth Factor</i>)
NMA	Amplifikacja MYCN (<i>N-MYC Amplification</i>)
NR	Brak odpowiedzi na leczenie (<i>No Response</i>)
NSE	Enolaza neurospecyficzna (<i>Neuron-specific Enolase</i>)
NT3	Neurotropina 3
OS	Przeżycie całkowite (<i>Overall Survival</i>)
p	Symbol krótkiego ramienia chromosomu
p53	Nazwa białka (<i>protein 53</i>)
PD	Progresja choroby (<i>Progressive Disease</i>)
PR	Częściowa remisja (<i>Partial Response</i>)

pRb	Białko Rb (<i>Rb protein</i>)
q	Symbol długiego ramienia chromosomu
RB	Gen kodujący białko pRb
RBL	Retinoblastoma
RC	Remisja całkowita (<i>Complete Response</i>)
SKNSH	Linia komórkowa NBL
SH-SY5Y	Linia komórkowa NBL
TNF	Czynnik martwicy nowotworów (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TNFR	Receptor dla TNF
TOKIO	Schemat chemioterapii
TP53	Gen kodujący białko p53
TRAIL	Receptor (<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligano</i>)
TRK	Gen receptora dla neurtropin
Trk	Receptor dla neurotropin (<i>tyrosine kinase receptor</i>)
TVD	Akronim schematu chemioterapii (topotekan, winkrystyna, doksorubicyna)
VEGF	Czynnik wzrostu śródbłonnków (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VGPR	Bardzo dobra odpowiedź częściowa (<i>Very Good Partial Response</i>)
VIP	Wazoaktywny peptyd jelitowy (<i>Vasoactive Intenstinal Peptide</i>)
VMA	Kwas wanilinomigdałowy (<i>Vanillymandelic Acid</i>)
VP-Carbo	Akronim schematu chemioterapii (etopozyd, karboplatyna)

1. Wstęp

Zwojak zarodkowy współczulny (neuroblastoma, NBL) jest nowotworem należącym do grupy nowotworów embrionalnych. Komórką prekursorową NBL jest niezróżnicowana komórka pochodząca z embrionalnej cewy nerwowej, z której w warunkach fizjologicznych powstaje rdzeń nadnerczy i sympatyczny układ nerwowy. [4,5,13]

1.1. Charakterystyka nowotworu i przebieg kliniczny

Neuroblastoma stanowi 6% - 10% nowotworów wieku dziecięcego. Częstość występowania wynosi 8 przypadków na 1 milion dzieci poniżej 15. r.ż. U 95% pacjentów diagnoza zostaje postawiona przed ukończeniem 5. r.ż. Mediana wieku w momencie rozpoznania wynosi 22 miesiące, a 97 - 99% przypadków zdiagnozowanych jest przed ukończeniem 10. r.ż. Przebieg kliniczny NBL charakteryzuje się dużą zmiennością, m. in. w zależności od wieku dziecka, obecności przerzutów, lokalizacji i cech biologicznych guza. Nowotwór ten często jest klasyfikowany do grupy guzów neuroblastycznych (obejmujących neuroblastoma, ganglioneuroblastoma i ganglioneuroma), o różnej etiologii genetycznej. [4, 5,13,18,55,67]

U pacjentów powyżej 1. r.ż. w ponad 75% przypadków występuje postać rozsiana (stopień 4 wg INSS - Tabela 1); wtedy guzy często mają agresywny charakter i są odporne na chemioterapię. Ocenia się, że NBL jest przyczyną 15% zgonów spowodowanych chorobą nowotworową u dzieci. U niemowląt stwierdza się niższe stopnie zaawansowania NBL (1., 2. i 4s.), z reguły wrażliwe na chemioterapię i w tej grupie dzieci duża liczba guzów wykazuje spontaniczną regresję. Natomiast u dzieci starszych w przypadku korzystnej charakterystyki biologicznej NBL dojrzewa do ganglioneuroma. Pacjenci z chorobą zlokalizowaną z reguły mają dobre rokowanie, chociaż u części z nich również występuje wznowa i zgon z powodu NBL. Regresja, uważana za charakterystyczny obraz choroby w stopniu 4s., nie występuje w każdym przypadku i także w tym stopniu zaawansowania może wystąpić progresja choroby. NBL w stadiach zaawansowanych z reguły związana jest ze złą prognozą. Progresja może być gwałtowna, powodująca szybki zgon albo powolna, trwająca nawet wiele lat. Obecnie uważa się, że niezbędnymi czynnikami genetycznymi umożliwiającymi spontaniczne dojrzewanie NBL są triploidia i brak zaburzeń krótkiego ramienia chromosomu 1. [4,5,8,16,55,67]

1.2. Charakterystyka kliniczna

Guz pierwotny w NBL może być umiejscowiony wszędzie tam, gdzie w trakcie rozwoju embrionalnego znajdują się komórki autonomicznego układu nerwowego. Większość zmian pierwotnych lokalizuje się w jamie brzusznej (65%), częstość występowania guzów nadnercza jest nieco wyższa u dzieci starszych (40%) niż u niemowląt (25%). U pacjentów poniżej 1. r.ż. częściej stwierdza się guzy o lokalizacji pierwotnej w klatce piersiowej i na szyi. U około 1% przypadków NBL nie udaje się znaleźć guza pierwotnego. [4,5,8,13,18,55]

Przerzuty szerzą się drogą naczyń limfatycznych i krwionośnych. U około 35% dzieci z guzami zlokalizowanymi stwierdza się zmiany NBL w okolicznych węzłach chłonnych. Przerzuty do węzłów

chłonnych poza okolicę, w której występuje guz kwalifikuje się do 4. stopnia zaawansowania, ale jeśli nie ma żadnych innych odległych zmian, to pacjenci mogą mieć dobre rokowanie. Na drodze hematogennej powstają przerzuty do szpiku kostnego, kości, wątroby i skóry. Rzadko rozpoznaje się pierwotne zmiany w płucach i ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), które często występują jako manifestacja wznowy lub choroby terminalnej. [4,5,8,13,18,55]

Objawy przedmiotowe i podmiotowe NBL zależą od lokalizacji guza pierwotnego i przerzutów. Guz w jamie brzusznej manifestuje się uczuciem pełności, dyskomfortu. W badaniu fizykalnym stwierdza się twardy, nieprzesuwalny opór w jamie brzusznej. Gdy guz wywodzi się z narządu Zuckerlandla, mogą być obecne objawy ze strony pęcherza moczowego i jelit, jako wynik ucisku masy guza. Rozległe zajęcie wątroby, częste zwłaszcza u niemowląt w stopniu 4s., objawia się niekiedy niewydolnością oddechową. Czasem mogą występować objawy zaburzeń drenażu żylnego i limfatycznego, w postaci obrzęków kończyn dolnych, moszny lub warg sromowych. Rzadko występuje nadciśnienie spowodowane wzrostem stężenia reniny, będące wynikiem ucisku naczyń nerkowych. Sporadycznie uwalniana jest epinefryna, co prowadzi do nadciśnienia tętniczego, tachykardii, napadów zaczerwienień i pocenia. Mogą wystąpić spontaniczne krwawienia do guza, co powoduje nagłe jego powiększenie i ból brzucha. Guzy zlokalizowane w tylnym śródpiersiu zazwyczaj są diagnozowane przypadkowo w badaniu radiologicznym wykonanym z innych przyczyn. Natomiast zmiany zlokalizowane w śródpiersiu górnym i na szyi mogą objawiać się zespołem Hornera. W NBL duże guzy w śródpiersiu rzadko są przyczyną zespołu żyły głównej górnej. Guz zlokalizowany w okolicy okołokręgosłupowej może penetrować do kanału kręgowego i powodować neurologiczne objawy uciskowe. [4,5,8,13,18,55]

Często stwierdza się objawy zależne od miejsca występowania przerzutów. Wytrzeszcz gałki ocznej i podbiegnięcia krwawe wokół oczu wynikają z infiltracji kości oczodołu. Zmiany w kościach i szpiku kostnym powodują ból, utykanie i wzmożoną drażliwość u dzieci młodszych. Dodatkowo mogą wystąpić objawy niewydolności szpiku kostnego, manifestujące się niedokrwistością, leukopenią i małopłytkowością. Zajęcie skóry obserwuje się prawie wyłącznie u niemowląt i objawia się występowaniem niebolesnych, niebieskawych podskórnych guzków. [4,5,8,13,18,55]

Objawy ogólne obejmują głównie złe samopoczucie, drażliwość, zaburzenia wzrostu, bóle oraz gorączkę, która występuje głównie przy przerzutach do kości. [4,5,8,13,18,55]

Z NBL związane są również zespoły paraneoplastyczne, w tym obserwowany u około 4% pacjentów zespół opsoklonii – mioklonii. Dzieci z tym zespołem mają dobre rokowanie pod względem NBL, jeżeli tylko nie stwierdza się obecności amplifikacji genu MYCN. Jednakże u większości tych pacjentów pozostają deficyty neurologiczne, związane z obecnością przeciwciał reagujących z tkanką nerwową. [4,5,8,13,18,55]

U dzieci z NBL może występować również oporna na leczenie biegunka sekrecyjna prowadząca do hipokaliemii i odwodnienia, związana z wydzielaniem wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP). Większość guzów wydzielających VIP jest dojrzała histologicznie (ganglioneuroblastoma lub ganglioneuroma), rokowanie w tej grupie pacjentów jest zazwyczaj dobre. [4,5,8,13,18,55]

Do klinicznych czynników prognostycznych należą:

- Wiek
- Stopień zaawansowania
- Lokalizacja guza pierwotnego
- Lokalizacja przerzutów. [4,5,8,13,18,55,66]

Ocenę stopnia zaawansowania po raz pierwszy zaproponowała prof. A. Evans w 1974. Wstępnie opracowane przez nią kryteria podlegają systematycznej modyfikacji. [26] Obecnie stosowaną klasyfikację stopnia zaawansowania NBL według międzynarodowych kryteriów INSS przedstawiono poniżej. (Tabela 1)

Tabela 1. Stopień zaawansowania neuroblastoma według kryteriów INSS [18]

Stopień	Opis
1	Guz zlokalizowany, makroskopowo całkowicie usunięty, z lub bez rezydualnej choroby mikroskopowej; reprezentatywne węzły chłonne z tej samej strony negatywne mikroskopowo (węzły przylegające do guza i usunięte wraz z nim mogą być pozytywne)
2A	Guz zlokalizowany z niecałkowitą resekcją makroskopową; reprezentatywne węzły chłonne z tej samej strony nieprzylegające do guza negatywne mikroskopowo
2B	Guz zlokalizowany z lub bez radykalnej resekcji makroskopowej, reprezentatywne węzły chłonne z tej samej strony nieprzylegające do guza pozytywne mikroskopowo. Powiększone węzły chłonne po stronie przeciwnej negatywne mikroskopowo
3	Nieresekcyjny jednostronny guz przekraczający linię środkową ciała z lub bez zajęcia regionalnych węzłów chłonnych lub zlokalizowany guz jednostronny z zajęciem przeciwległych węzłów chłonnych lub guz linii środkowej szerzący się w obu kierunkach poprzez infiltrację (nieresekcyjny) lub zajęcie węzłów chłonnych
4	Każdy guz pierwotny z zajęciem odległych węzłów chłonnych, kości, szpiku kostnego, wątroby, skóry lub innych narządów (z wyjątkiem zdefiniowanego jako 4S)
4s	Zlokalizowany guz pierwotny (tak jak zdefiniowano dla stopni 1., 2A i 2B) z rozsiewem ograniczonym do skóry, wątroby lub szpiku kostnego (naciek stanowiący poniżej 10% komórek mononuklearnych), u dzieci do 1. r.ż.

Obecnie opracowywane są nowe kryteria diagnostyczne oparte na przedoperacyjnej ocenie stopnia zaawansowania nowotworu, które mogą być zastosowane również u pacjentów nie wymagających leczenia chirurgicznego. W oparciu o te kryteria oraz obecność czynników biologicznych i wiek, pacjenci przypisywani będą do określonych grup ryzyka (od bardzo niskiego do wysokiego). [5]

1.3. Kryteria diagnostyczne

Diagnoza NBL może zostać postawiona, jeśli:

- są jednoznaczne wyniki badania histopatologicznego w mikroskopie świetlnym z lub bez potwierdzenia w badaniu immunohistochemicznym z lub bez zwiększonego stężenia metabolitów katecholamin w moczu lub surowicy krwi

lub

- w biopsji albo trepanobiopsji szpiku kostnego obecne są komórki NBL oraz stwierdza się zwiększone stężenie metabolitów katecholamin w moczu lub surowicy krwi.

Podwyższone stężenie katecholamin i ich metabolitów w moczu przy zastosowaniu wystarczająco czułych metod może być wykryte u 90-95% pacjentów. Badanie to pozwala na potwierdzenie diagnozy i monitorowanie leczenia. Ocenione muszą być zawsze co najmniej dwa metabolity katecholamin. Za diagnostycznie podwyższone uznaje się stężenie przekraczające trzykrotnie normę dla wieku. W przypadku niejednoznacznego obrazu patologicznego, o rozpoznaniu decyduje wynik badania genetycznego. Pomimo tego, że zdiagnozowanie NBL jest możliwe bez pobrania tkanki guza w przypadku stwierdzenia komórek NBL w szpiku kostnym i podwyższonego stężenia katecholamin, pobranie materiału z guza pierwotnego jest niezbędne ze względu na znaczenie rokownicze typu histopatologicznego NBL i możliwość pełnej oceny biologicznej guza. [4,8,13,18,55]

W jednej z ostatnio zaproponowanych klasyfikacji wyodrębniono 3 grupy prognostyczne na podstawie obecności nieprawidłowości 1p i amplifikacji MYCN oraz ploidii. [17] W Tabeli 2 przedstawiono charakterystykę poszczególnych grup pacjentów (Tabela 2):

- Grupa niskiego ryzyka.

Zdecydowana większość pacjentów może być wyleczona tylko chirurgicznie i/lub obserwowana, bez konieczności zastosowania leczenia skojarzonego. Do grupy tej zaliczane są niemowlęta poniżej 12. miesiąca życia (w nowej klasyfikacji granica wieku ma zostać przesunięta do 18. miesiąca życia), u których guz jest zlokalizowany lub stwierdza się stopień 4s., jeżeli nie występuje amplifikacja onkogenu MYCN i kliniczne objawy wynikające z ucisku guza na narządy. Guzy niskiego ryzyka charakteryzują się ponadto triploidalną zawartością DNA i brakiem zaburzeń krótkiego ramienia chromosomu 1.

- Grupa pośredniego ryzyka.

Grupa nie jest do końca dobrze zdefiniowana, obejmuje m.in. dzieci z dużymi guzami w jamie brzusznej, bez obecności przerzutów. Większość pacjentów może zostać wyleczona przy zastosowaniu chemioterapii i zabiegu operacyjnego. Guzy te charakteryzują się diploidalną lub tetraploidalną ilością DNA, ale nie mają amplifikacji MYCN, może natomiast występować delecja 1p.

- Grupa wysokiego ryzyka.

Pacjenci najczęściej zdiagnozowani po ukończeniu 1. r.ż. Zazwyczaj stwierdza się przerzuty, u większości występuje wczesna progresja lub wznova choroby pomimo intensywnego leczenia. Guzy są z reguły diploidalne, obecna delecja krótkiego ramienia chromosomu 1. i amplifikacja genu MYCN. Do grupy tej zaliczane są również niemowlęta z obecnością amplifikacji genu MYCN. [13,17].

Tabela 2. Charakterystyka grup ryzyka w neuroblastoma [17]

Cecha	Typ 1 – grupa niskiego ryzyka	Typ 2 – grupa pośredniego ryzyka	Typ 3 - grupa wysokiego ryzyka
MYCN	Prawidłowe	Prawidłowe	Amplifikacja
Ploidia DNA	Hiperdiploidia Blisko triploidia	Blisko diploidia Blisko tetraploidia	Blisko diploidia Blisko tetraploidia
17q gain	Rzadko	Często	Często
11q, 14q LOH	Rzadko	Często	Rzadko
1p LOH	Rzadko	Rzadko	Często
Ekspresja TRKA	Wysoka	Niska lub brak	Niska lub brak
Ekspresja TRKB	Niepełna forma receptora	Niska lub brak	Wysoka (pełna forma receptora)
Ekspresja TRAC	Wysoka	Niska lub brak	Niska lub brak
Wiek	Zazwyczaj poniżej 1. r.ż	Zazwyczaj poniżej 1. r.ż.	Zazwyczaj 1.-5. r.ż.
Stopień zaawansowania	Zazwyczaj 1., 2., 4s	Zazwyczaj 3., 4.	Zazwyczaj 3., 4.
3-letnie przeżycie (%)	95	Okolo 50	Okolo 25

1.4. Metody leczenia

Leczenie NBL zależy od stopnia zaawansowania choroby, wieku dziecka i czynników biologicznych. Z reguły w guzach zlokalizowanych, przy braku niekorzystnych markerów biologicznych, wystarczające jest chirurgiczne usunięcie zmiany. W przypadku guzów zlokalizowanych nieoperacyjnych u dzieci powyżej 1. r.ż. oraz u niemowląt z chorobą zlokalizowaną lub rozsianą, ale bez obecności amplifikacji onkogenu MYCN, z reguły stosuje się chemioterapię systemową, a następnie resekcję guza pierwotnego. U dzieci powyżej 1. r.ż. w 4. stopniu zaawansowania oraz niemowląt z amplifikacją genu MYCN i pacjentów z guzami zlokalizowanymi w stopniu 2. i 3. z amplifikacją MYCN stosuje się leczenie skojarzone, obejmujące intensywną chemioterapię indukcyjną, resekcję guza pierwotnego, megachemioterapię z autologicznym przeszczepieniem obwodowych komórek krwiotwórczych, radioterapię okolicy guza pierwotnego oraz kwas

13-cis-retinowy, jako terapię minimalnej choroby resztkowej. Z powodu niesatysfakcjonujących wyników leczenia pacjentów z NBL grupy wysokiego ryzyka, do protokołów leczniczych wprowadza się dodatkowe komponenty, takie jak MIBG-terapia przerzutów w przypadku braku ich regresji po chemioterapii indukcyjnej, terapia wysokimi dawkami MIBG (z lub bez chemioterapii) z autologicznym przeszczepieniem komórek krwiotwórczych oraz immunoterapia (przeciwciała anty-GD2 lub interleukina 2). [4,8,13,18,55,94]

Kryteria odpowiedzi na leczenie są różnie definiowane; kryteria przyjęte w Europie przedstawiono w tabeli (Tabela 3).

Tabela 3. Kryteria odpowiedzi na leczenie [94]

Odpowiedź	Guz pierwotny	Przerzuty	Markery
Odpowiedź całkowita (CR)	Bez guza	Bez guza	HVA/VMA prawidłowe
Bardzo dobra odpowiedź częściowa (VGPR)	Redukcja >90% ale <100%	Bez guza (jak wyżej, z wyjątkiem kości); bez nowych zmian w kościach, regresja wszystkich istniejących ognisk kostnych	HVA/VMA obniżone o >90% w odniesieniu do wartości wyjściowych
Odpowiedź częściowa (PR)	Redukcja 50-90%	Bez nowych zmian; 50-90% redukcja wszystkich ognisk możliwych do oceny; 0 - 1 ognisk w szpiku z komórkami guza; regresja zmian kostnych wg kryteriów VGPR	HVA/VMA obniżone 50%-90% w odniesieniu do wartości wyjściowych
Odpowiedź mieszana (MR)		Bez nowych zmian; >50% redukcja jednej ze zmian mierzalnych (guz pierwotny i przerzuty) z <50% redukcją innych; <25% wzrost dowolnej zmiany mierzalnej	
Brak odpowiedzi (NR)		Bez nowych zmian; <50% redukcja, lub <25% wzrost dowolnej istniejącej zmiany	
Progresja choroby (PD)		Jakakolwiek nowa zmiana; wzrost jednej z istniejących zmian o >25%; obecność komórek nowotworowych w poprzednio negatywnym szpiku kostnym; bez uprzedniego uzyskania CR	
Wznowa choroby		Pojawienie się jakiegokolwiek nowej zmiany lub komórek nowotworowych w szpiku kostnym u pacjenta, który uzyskał CR	

1.5. Budowa histopatologiczna guza

NBL prawdopodobnie wywodzi się z prymitywnej, pluripotencjalnej komórki sympatycznej (sympatogonia), która pochodzi z cewy nerwowej. Histologiczne podtypy tego nowotworu wydają się korelować z prawidłowym różnicowaniem sympatycznego układu nerwowego. [4,18]

Spektrum różnicowania odzwierciedlają 3 podtypy histologiczne NBL: neuroblastoma, ganglioneuroblastoma oraz ganglioneuroma. Typowy NBL składa się z małych jednakowej wielkości komórek zawierających gęste, hyperchromatyczne jądro i niewielką ilość cytoplazmy. Obecność wyrostków nerwowych lub neuropili jest patognomoniczna dla wszystkich NBL, z wyjątkiem postaci najbardziej prymitywnych. Pseudorozety Homera-Wrighta obecne są w 15-50% przypadków; składają się z neuroblastów otoczonych eozynofilowymi neuropilami.

W pełni zróżnicowaną i łagodną postacią NBL jest ganglioneuroma. Składa się z dojrzałych komórek zwojowych, neuropili i komórek Schwanna. Ganglioneuroblastoma jest postacią heterogenną, z obrazem histologicznym zawierającym wszystkie typy różnicowania pomiędzy NBL a ganglioneuroma. Obraz histopatologiczny ganglioneuroblastoma jest zróżnicowany. W guzie dominować mogą elementy neuroblastyczne, z nielicznymi komórkami dojrzewającymi, jak również guz może składać się głównie z ganglioneuroma z niewielkimi ogniskami neuroblastów. Ganglioneuroblastoma może mieć budowę guzkową lub mieszaną (*intermixed*). Postać mieszana związana jest z mniej agresywnym przebiegiem klinicznym. Guzy zawierające mniej niż 50% dojrzewających lub dojrzałych komórek zwojowych określa się terminem dojrzewający NBL, zaś guzy bardziej dojrzałe ganglioneuroblastoma. W badaniu histopatologicznym powinno badać się wycinki z różnych okolic ze względu na częstą heterogenną budowę guza.

W celu odróżnienia NBL od innych nowotworów z grupy nowotworów o małych, niebieskich, okrągłych komórkach, często oprócz barwienia HE konieczne są barwienia immunohistochemiczne. NBL barwi się przy użyciu przeciwciał monoklonalnych łączących się z białkami neurofilamentów, synaptofizyny i NSE. Najczęściej obecnie stosowana klasyfikacja histopatologiczna opracowana przez Shimadę, oparta jest na ocenie obecności lub braku zrębu zbudowanego z komórek Schwanna, stopnia zróżnicowania oraz indeksu kariomitotycznego (MKI). Budowa histopatologiczna, analizowana w zależności od wieku pacjenta, jest ważnym czynnikiem rokowniczym, zwłaszcza u niemowląt. Na podstawie klasyfikacji Shimady, z uwzględnieniem obecności zwapnień, stworzono międzynarodową klasyfikację patologiczną INPC (*International Neuroblastoma Pathological Classification*) (Tabela 4). [20,78,79]

Tabela 4. Klasyfikacja histopatologiczna guzów neuroblastycznych wg INPC [20,79]

Grupa wiekowa	Charakterystyka	Grupa prognostyczna INPC
Neuroblastoma		
Ubogi w zrąb z komórek Schwanna		
Korzystna		
<1,5. r.ż.	Guz słabo zróżnicowany lub różnicujący się, niski lub pośredni indeks MKI	Korzystna
1,5.–5. r.ż.	Guz różnicujący się i niski MKI	
Niekorzystna		

<1,5. r.ż.	Guz niezróżnicowany, wysoki MKI	Niekorzystna
1,5.-5. r.ż.	Guz niezróżnicowany lub słabo zróżnicowany Wysoki lub pośredni MKI	
>5. r.ż.	Wszystkie guzy	
Ganglioneuroblastoma, nodular		
Niezależnie od wieku	Składa się z części bogatych w zrąb z komórek Schwanna / z dominującym zrębem z komórek Schwanna z guzkami ubogimi w zrąb z komórek Schwanna	Niekorzystna
Ganglioneuroblastoma intermixed		
Niezależnie od wieku	Bogaty w zrąb komórek Schwanna	Korzystna
Ganglioneuroma dojrzewający, dojrzały		
Niezależnie od wieku	Dominujący zrąb z komórek Schwanna	Korzystna

1.6. Zaburzenia genetyczne

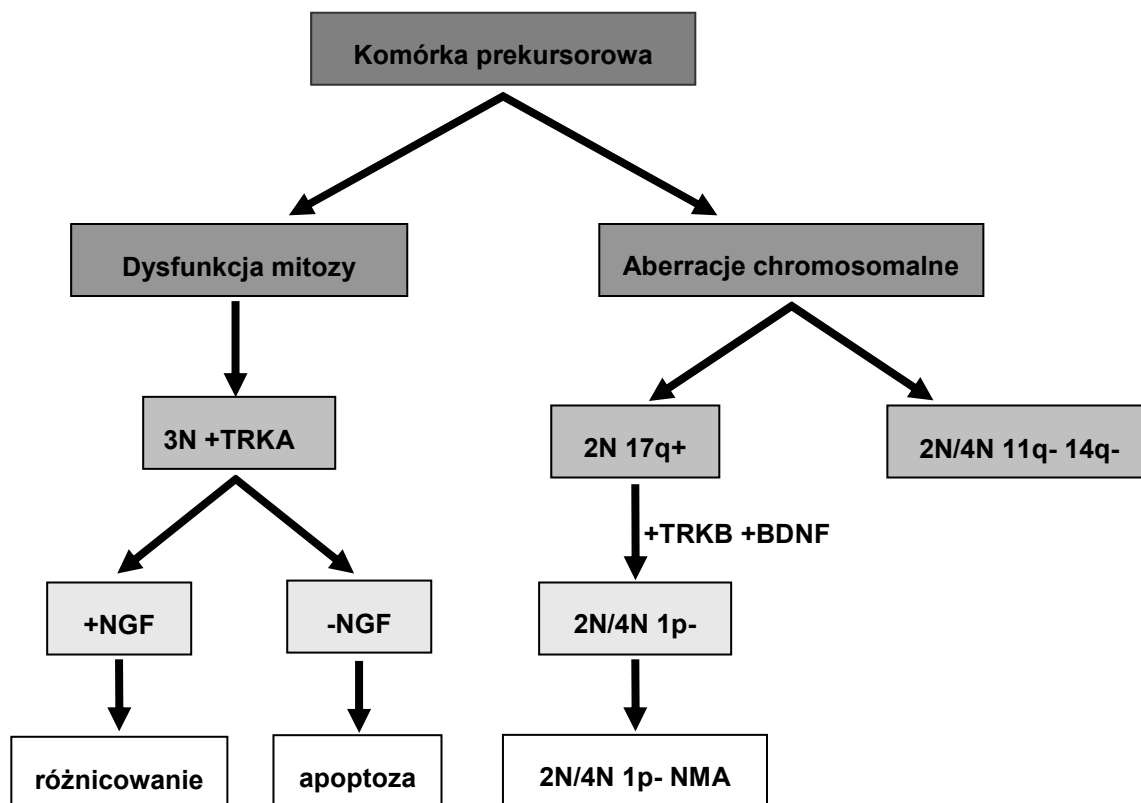
Charakterystyczną cechą NBL jest występowanie różnorodnych zaburzeń genetycznych nabytych przez komórki guza, z których część stanowi ważny czynnik prognostyczny, niezależny od cech klinicznych choroby. Obecność zaburzeń genetycznych, zwłaszcza amplifikacji onkogenu MYCN, jest obecnie podstawą do stratyfikacji pacjentów do grup ryzyka. [3]

Chociaż w NBL obserwuje się wiele różnych, heterogennych zaburzeń genetycznych, zdarzenie inicjujące powstanie tego nowotworu jest nieznane. Wydaje się, że istnieją, co najmniej dwie ścieżki rozwoju NBL, zależne między innymi od czasu, w którym dochodzi do rozpoczęcia onkogenezy. Jednakże, pomimo intensywnych badań, znaczenie opisywanych zaburzeń w inicjacji i progresji NBL pozostaje nieznane. [4,8,13,18,55]

Model rozwoju różnych postaci NBL przedstawiono na rysunku (Rysunek 1). [3,18] Zgodnie z tym modelem, we wszystkich postaciach NBL występuje ta sama komórka prekursorowa, która może wykazywać mutację wspólną dla wszystkich typów NBL. Pierwszy typ rozwoju nowotworu charakteryzuje się występowaniem dysfunkcji mitozy, co prowadzi do powstania kariotypu hyperdiploidalnego lub prawie triploidalnego, z zaburzeniami w postaci nadmiaru całych chromosomów, ale z nielicznymi lub bez rearanżacji cytogenetycznych. Zazwyczaj guzy te wykazują dużą ekspresję receptora TrkA. Dzięki obecności tego receptora komórki NBL są wrażliwe na działanie neurotropowego czynnika wzrostu (NGF) i w zależności od jego obecności podlegają apoptozie lub różnicowaniu. W pierwszym typie rozwoju NBL nie ma z reguły zaburzeń genetycznych, specyficznych dla NBL, jak np. amplifikacja MYCN. Do tej kategorii należy większość guzów rozpoznawanych u niemowląt w ramach biochemicznych badań przesiewowych. Drugi typ charakteryzuje się generalnie blisko diploidalną lub tetraploidalną liczbą chromosomów, ale występuje w nim wiele aberracji chromosomowych. W tym modelu rozwoju guza nie stwierdzono do tej pory stałego zaburzenia genetycznego. Stosunkowo często występuje nadmiar materiału genetycznego długiego ramienia chromosomu 17. W drugim typie rozwoju NBL opisywane są 2 podtypy, z szybko lub wolno

postępującą chorobą, z reguły doprowadzającą do zgonu pacjenta. Prawdopodobnie nie istnieje wzajemna konwersja poszczególnych typów. [4,8,13,17,18,22,55]

Rysunek 1. Model sekwencji zaburzeń genetycznych prowadzących do rozwoju różnych postaci NBL [3,18]



W wielu innych nowotworach (np rak jelita grubego) znany jest mechanizm onkogenezy, w którym następuje stopniowa progresja od zmian przednowotworowych do nowotworowych zmian złośliwych poprzez kumulację zmian genetycznych. Identyfikacja zmian przednowotworowych (NBL *in situ*) w nadnerczach płodu, łącznie z wysokim odsetkiem występowania klinicznie niemych postaci NBL, wykrywanych w czasie przesiewowych badań biochemicznych, sugeruje, że podobny proces może mieć miejsce w NBL. W kilku badaniach wykazano, że mikroskopowe guzki neuroblastyczne znajdują się w nadnerczach wszystkich badanych płodów, szczególnie między 17. a 20. tygodniem ciąży, a następnie ulegają powolnej regresji do momentu urodzenia. Powyższe zmiany były również stwierdzane u niemowląt do 3. m.ż. w badaniu *post mortem*. Prawdopodobnie neuroblastyczne guzki są pozostałością prawidłowego rozwoju nadnerczy. Zmiany te w większości przypadków nie dają objawów klinicznych. Zdolność do regresji spontanicznej potwierdzają również badania przesiewowe prowadzone u niemowląt. Delecja 14q może mieć kluczowe znaczenie w przemianach do złośliwej postaci NBL. Zaburzenie to często jest związane z zaawansowaną chorobą, ale nie ma istotnego niezależnego znaczenia rokowniczego. Kolejnym etapem prowadzącym do wzrostu inwazyjności guza może być delecja 11q. [13,17,18,55,67]

1.6.1. Zawartość DNA w guzie

Indeks DNA jest czynnikiem prognostycznym, zwłaszcza w grupie pacjentów poniżej 1. r.ż.

Występowanie diploidii i tetraploidii zazwyczaj związane jest z wiekiem (częściej u pacjentów powyżej 1. r.ż.), zaawansowanym stopniem klinicznym i innymi niekorzystnymi czynnikami, takimi jak amplifikacja MYCN, delecja 1p, podwyższone stężenie NSE, ferrytyny i LDH. Szacuje się, że 30-40% guzów NBL to guzy diploidalne. [8,53]

W guzach diploidalnych, bądź tetraploidalnych mutacje pojawiają się na różnym etapie rozwoju układu nerwowego. Charakterystyczne dla tego typu guzów są zaburzenia długiego ramienia chromosomu 17. i ekspresja TRKB. W grupie tej można wyróżnić grupę pośredniego ryzyka bez amplifikacji MYCN (często zaburzenia 11q) oraz grupę wysokiego ryzyka z amplifikacją MYCN. [13,17,53,55,77]

W analizie jednoczynnikowej uwzględniającej wyłącznie czynniki genetyczne diploidia i tetraploidia były najważniejszym czynnikiem prognostycznym w analizie przeżyć wolnych od niekorzystnych zdarzeń (EFS). [42]

Guzy hyperdiploidalne wykazują tendencję do ekspresji TRKA i brak innych aberracji chromosomalnych. Zazwyczaj ulegają one spontanicznej regresji lub różnicowaniu. Choroba zazwyczaj występuje w 1. lub 4s. stopniu zaawansowania. U niemowląt z diploidalnym DNA występuje z reguły choroba bardziej agresywna. U dzieci poniżej 1. r.ż. hyperdiploidia zazwyczaj związana jest z nadmiarem całych chromosomów, podczas gdy u dzieci starszych częściej stwierdza się zmiany strukturalne. [18,58,91]

Triploidalna zawartość DNA w guzie charakterystyczna jest głównie dla niemowląt, niższych stadiów zaawansowania choroby i stanowi korzystny czynnik rokowniczy, o ile nie występują inne zdefiniowane niekorzystne czynniki prognostyczne. [13 53,55,91]

W przypadku triploidii, całkowite przeżycie (OS) wynosiło 96%, a w przypadku diploidii lub tetraploidii bez obecności innych niekorzystnych czynników prognostycznych - 63%. Obecność amplifikacji MYCN i/lub delecji 1p niwelowała korzystny wpływ trisomii (57% 4-letnich OS); natomiast obecność dodatkowych czynników niekorzystnej prognozy, innych niż diploidia i tetraploidia, nie pogarszała w sposób istotny rokowania. [8,70]

Tetraploidia jest istotnym czynnikiem prognostycznym u niemowląt w stopniach: 1. do 3. i 4s., ale nie w stopniu 4. W modelu wieloczynnikowym najsilniejszym czynnikiem negatywnym był poziom NSE, następnie diploidia lub tetraploidia oraz wiek (wpływ na OS). Wpływ tetraploidii na odsetek OS potwierdzono również w analizie wieloczynnikowej. [8,70]

Nie określono górnych i dolnych limitów określających poszczególne indeksy DNA. [8]

1.6.2. Zaburzenia chromosomalne

Występowanie zaburzeń chromosomalnych opisywane jest nawet u 92% pacjentów, przy czym większość guzów w niższych stadiach zaawansowania wykazuje utratę lub występowanie dodatkowych kopii całych chromosomów. [13,17,18,55,91]

Najczęściej obserwowane są somatycznie nabyte nieprawidłowości, takie jak: utrata materiału genetycznego (1p, 2q, 3p, 4p, 9p, 11q, 14q, 18q i inne) oraz jego nadmiar (MYCN, 17q). Rzadko natomiast obserwowane są rearanżacje konstytucjonalne, występujące w przypadku zaburzeń genów predysponujących do powstania innych nowotworów wieku dziecięcego, jak retinoblastoma lub guz Wilmsa. [13,17,18,55,91]

Do najczęściej opisywanych zaburzeń genetycznych w NBL należą:

- Delecja 1p36 (19-36% pacjentów)
- Delecja 11q23 (40-45%)
- Delecja 14q32 (20-25%)
- Amplifikacja MYCN (20-25%)
- Delecja 3p1 (4-24%)
- Delecje (utrata heterozygotyczności) 4p, 9p, 18q (15-20%). [13,17,18,55,91]

Sporadycznie (3 opisanych pacjentów) obserwowano delecję konstytucjonalną 1p36.3 u niemowląt z ciężkimi zaburzeniami rozwojowymi układu nerwowego. [13]

Stwierdzono i opisano wiele innych konstytucjonalnych zbalansowanych translokacji u pacjentów z NBL, jednakże nie było wśród nich zmian powtarzających się.

Rzadko opisywane są schorzenia mające związek z występowaniem NBL. Zalicza się do nich chorobę Hirschprunga, chorobę „kłątwa Ondyna” (hypowentylacja centralna), prawdopodobnie również zespoły Turnera i Beckwitha-Wiedemanna. Występowanie schorzeń współistniejących z NBL sugeruje, że część przypadków NBL może być wyjaśniona globalnymi zaburzeniami rozwojowymi układu nerwowego. Jednakże nie stwierdzono stałego występowania NBL w żadnej z jednostek chorobowych. Określenie występowania ewentualnej stałej asocjacji NBL ze schorzeniami genetycznymi o znanym podłożu, mogłoby przyczynić się do zidentyfikowania genów predysponujących do wystąpienia NBL. [13]

Opisywana jest również dziedziczna postać NBL, chociaż jest ona ekstremalnie rzadka. Dane francuskie wskazują na 1,4% nowo zdiagnozowanych pacjentów z NBL z pozytywnym wywiadem rodzinnym w kierunku tego nowotworu. [13] W 1972 r. Knudson wykazał, że rodzinna postać NBL może być dziedziczona w sposób autosomalny dominujący, pacjenci byli diagnozowani wcześniej i często stwierdzano u nich wiele guzów pierwotnych, co jest charakterystyczną cechą wrodzonej predyspozycji do występowania nowotworów. Prawdopodobnie, analogicznie do zaburzeń genu RB w rodzinnej postaci retinoblastoma (RBL), również w tym przypadku występuje mutacja obu alleli genu odpowiedzialnego za rozwój nowotworu w mechanizmie „podwójnego uderzenia”, jednakże w odróżnieniu od RBL, w przypadku NBL zmutowany gen nie wykazuje całkowitej penetracji. Obecnie wydaje się, że niepełna penetracja genu może być wynikiem spontanicznej remisji guza, który nigdy nie został wykryty klinicznie. Ponadto klinicznie jawny guz NBL, w odróżnieniu od RBL, w większości

przypadków prowadzi do zgonu pacjenta. Z tego powodu ocena modelu dziedziczenia NBL jest niemożliwa. [13,18]

1.6.2.1 Delecja krótkiego ramienia chromosomu 1. (1p)

Delecja 1p stwierdzana jest w 70-80% guzów diploidalnych. Badania molekularne wykazują utratę heterozygotyczności w tym regionie u 35% pacjentów. Początkowo uznawano, że gen odpowiedzialny za występowanie rodzinnej postaci NBL może znajdować się na krótkim ramieniu chromosomu 1. (1p36) ze względu na opisywane zaburzenia konstytucjonalne tej okolicy, ale nie udało się wykazać jego stałego związku z dziedziczną postacią NBL, ani ściśle związanych z tym zaburzeniem fenotypów. [13,17,18,55,91]

Klasyczne badania nad genami supresorowymi nowotworów wykazały, że chromosom 1. zawiera gen supresorowy istotny w rozwoju NBL (zlokalizowany od 1p32 do telomeru). Klonowanie tego genu nie powiodło się, gdyż prawdopodobnie nie jest to gen klasyczny i mogą występować mutacje w allelach alternatywnych. Zaburzenie to koreluje z występowaniem guzów nieresekcyjnych, obecnością przerzutów i innych markerów niekorzystnej prognozy (m.in. amplifikacja MYCN) i jest związane z gorszym rokowaniem (istotna statystycznie korelacja z wiekiem powyżej 1. r.ż., 4. stopniem zaawansowania wg INSS, niekorzystną budową histopatologiczną, podwyższonym poziomem ferrytyny i amplifikacją MYCN). Obecność delecji 1p36 ma wpływ na gorsze wyniki leczenia (obniżenie odsetka przeżyć wolnych od niekorzystnych zdarzeń /EFS/), natomiast wpływ na OS nie jest jednoznaczny. Delecja 1p jest niezależnym czynnikiem prognostycznym ryzyka wystąpienia wznowy, zwłaszcza u pacjentów z niższych grup ryzyka, bez amplifikacji MYCN. W części badań nie wykazano jednak jego niezależnego znaczenia prognostycznego, zwłaszcza w grupie pacjentów wysokiego ryzyka. [13,55,56,58]

Badanie metodą FISH wykazało, że powtarzającym się zaburzeniem zarówno w liniach komórkowych NBL, jak i guzach pierwotnych, jest nie zrównoważona translokacja der(1)t(1p;17q). Jeżeli w guzie występuje zarówno delecja 1p, jak i nadmiar 17q, wynik leczenia jest równie zły jak wtedy, gdy zaburzenia te występują oddzielnie, bądź łącznie, ale nie w wyniku wzajemnej translokacji. [55]

Wprowadzenie prawidłowego krótkiego ramienia chromosomu 1. do linii komórkowych z delecją prowadzi do indukcji różnicowania lub śmierci komórek, co doprowadziło do powstania hipotezy, że znajduje się na nim gen supresorowy NBL, inaktywowany w około 1/3 przypadków NBL. Jednakże gen ten nie został zidentyfikowany, ze względu na zmienny punkt złamania i możliwość istnienia więcej niż jednego genu supresorowego. [16,19,58]

1.6.2.2 Delecja długiego ramienia chromosomu 11.

Delecja długiego ramienia chromosomu 11. może być związana z monosomią (ubytek całego chromosomu 11.) lub z utrzymaniem heterozygotyczności ramienia krótkiego. W większości przypadków nie koreluje z żadnym klinicznie istotnym czynnikiem ryzyka. Stwierdza się natomiast silną negatywną korelację z amplifikacją MYCN. W NBL niebalansowana rearanżacja, przynosząca rezultat w postaci utraty 11q23, ale bez amplifikacji MYCN, definiuje pacjentów o wyższym ryzyku i koreluje pozytywnie z wiekiem powyżej 1. r.ż., 4. stopniem zaawansowania i niekorzystną budową

histopatologiczną oraz z niższym odsetkiem EFS i OS, także u pacjentów z niezaawansowaną chorobą. Jednakże wyniki badań nad znaczeniem delecji 11q są sprzeczne, prawdopodobnie ze względu na uwzględnianie w badaniach nie tylko utraty heterozygotyczności, ale też utraty całego chromosomu 11. w guzach triploidalnych, co może wyjaśniać brak korelacji tego zaburzenia ze stopniem zaawansowania w części badań. Wykazano, że obecność delecji 11q jest niezależnym czynnikiem predykcyjnym progresji, niezależnie od stopnia zaawansowania klinicznego. [13,57,67,91]

Wydaje się, że utrata heterozygotyczności długiego ramienia chromosomu 11. i amplifikacja MYCN mogą definiować 2 biologicznie różne grupy pacjentów, w których powstanie NBL ma inną etiologię molekularną. Możliwe jest, że guzy z delecją 11q wykazują bardzo agresywny wzrost, ale z długim okresem utajenia klinicznego. Dlatego, jeśli są wykrywane wcześnie, przy prawidłowym leczeniu mogą mieć relatywnie dobre rokowanie. Natomiast amplifikacja MYCN może od początku łączyć się z gwałtownie rozwijającą się, agresywną chorobą, trudną do wykrycia przed pojawieniem się przerzutów. [57,67]

1.6.2.3 Nadmiar materiału genetycznego długiego ramienia chromosomu 17. (17q gain)

Nadmiar materiału genetycznego długiego ramienia chromosomu 17. opisano po raz pierwszy na podstawie oceny prążków G w 1984 r. (Gilbert i wsp.) [31]. W badaniach porównawczej hybrydyzacji genowej (CGH) wykazano, że jest to najczęstsze zaburzenie genetyczne w pierwotnym NBL. W CGH częstość występowania tego zaburzenia wynosi 50-75%. Guzy prawie triploidalne wykazują częściej zwiększoną liczbę kopii całego chromosomu 17. w stosunku do podstawowej liczby chromosomów w komórce (4-5 kopii), podczas gdy niebalansowany, częściowy nadmiar dystalnego odcinka 17q związany jest z występowaniem innych markerów złej prognozy. Prawie we wszystkich liniach komórkowych stwierdza się translokacje obejmujące długie ramię chromosomu 17. Translokacje te są zwykle niezrównoważone i wiążą się z utratą materiału genetycznego chromosomu partnerskiego. Najczęściej partnerem translokacji jest 1p, następnie 11q, co może prowadzić, jednocześnie z nadmiarem 17q, do utraty funkcji genów supresorowych na tych chromosomach oraz do powstania nadmiaru kopii genów kontrolujących wzrost, różnicowanie lub apoptozę na chromosomie 17. Nie wiadomo jednak, czy faktycznie nadmiar genów na 17q odpowiada za agresywny fenotyp guza, czy też towarzyszy tylko obecności innych czynników rokowniczo niekorzystnych („*innocent bystander*”). W guzach z amplifikacją MYCN często obserwowana jest translokacja t(1;17), podczas gdy w guzach bez tej amplifikacji częściej stwierdza się translokację z chromosomu 17. na chromosomy 3. i 11. Dlatego znaczenie prognostyczne 17q może zależeć, przynajmniej częściowo, od chromosomu związanego z translokacją z chromosomem 17. Część autorów nadmiar długiego ramienia chromosomu 17. uważa za niezależny czynnik niekorzystnej prognozy, zwłaszcza w grupie pacjentów bez delecji 1p i amplifikacji MYCN, ale wyniki badań nie są jednoznaczne. [13,15,22,49,55,57,75,77,91]

1.6.3. Amplifikacja MYCN

Amplifikacja onkogenu MYCN, po raz pierwszy opisana w 1985 r. przez Seeger i wsp. [77], występuje u 20-25% pacjentów i związana jest z delecją krótkiego ramienia chromosomu 1. (w większości nowotworów z amplifikacją MYCN stwierdza się również delecję 1p). Fizjologicznie gen MYCN ulega ekspresji w komórkach zwojowych około 8,5 tygodnia życia płodowego. Obecność amplifikacji genu w NBL wiąże się ze wzrostem poziomu mRNA i białka MycN w komórce, co może odgrywać istotną rolę w proliferacji komórek, jednakże nie udowodniono korelacji ekspresji białka MycN z rokowaniem. Amplifikacja MYCN stanowi silny niezależny niekorzystny czynnik prognostyczny. Wiąże się zawsze z niekorzystnym rokowaniem, zwłaszcza w niskich stopniach zaawansowania, natomiast brak amplifikacji w stopniach wyższych, wiązał się z wyższym odsetkiem uzyskanych remisji. Amplifikacja genu MYCN najprawdopodobniej nie występuje w przypadku braku delecji 1p, nadmiaru 17q lub obu tych zaburzeń. Może to sugerować, że amplifikacja genu MYCN jest zdarzeniem późniejszym w sekwencji zdarzeń, prowadzących do aberracji genetycznych leżących u podstaw rozwoju poszczególnych postaci NBL. Jeżeli w danym guzie występuje amplifikacja genu MYCN, zawsze jest obecna już w momencie diagnozy, dlatego to zaburzenie wydaje się być właściwością biologiczną części guzów. [12,13,18,77,86]

MYCN jest jedynym znanym onkogenem aktywowanym w sposób stały w NBL. Przeprowadzone badania wykazują, że nieprawidłowe funkcjonowanie genu MYCN może być jedną z przyczyn rozwoju NBL. Liczba kopii genu MYCN (bez względu na to, czy amplifikowana, czy prawidłowa) nie zmienia się w trakcie rozwoju guza i jest stała w poszczególnych okolicach guza oraz w guzie pierwotnym i przerzutach, a także w przypadku wznowy. W przypadku oceny amplifikacji genu MYCN w badaniu FISH, obserwuje się heterogenność amplifikacji MYCN na poziomie komórek w jednym guzie (tzn. w tym samym guzie mogą występować zarówno komórki z amplifikacją, jak i bez amplifikacji tego genu). W badaniach SB i PCR, gdzie obecność amplifikacji stwierdza się na poziomie DNA wyizolowanego z wielu komórek, nie można stwierdzić różnic między komórkami, a obecność lub brak amplifikacji jest stałą cechą. Prawdopodobnie wynika to z możliwości przybierania przez amplifikowany materiał formy struktur „double minutes”, które jako struktura centryczna, mają tendencję do znikania w czasie mitozy lub nierównomiernego podziału między komórki potomne. Wykazany został również proces usuwania materiału genetycznego amplifikowanego onkogenu z komórek linii komórkowych NBL i guzów pierwotnych. [13,18,77]

Prawdopodobnie początkowo NBL składa się z komórek heterogennych, z których w niewielkim odsetku występują określone zaburzenia genetyczne. Część komórek ulega apoptozie, natomiast pozostałe mogą tworzyć środowisko promujące amplifikację MYCN, prowadząc do powstania populacji komórek opornych na leki, bardziej agresywnych niż wyjściowo. Alternatywnie, amplifikacja MYCN może prowadzić do zaburzeń innej ścieżki apoptozy niż pozostałe zaburzenia genetyczne, przez co komórki guza są bardziej odporne na indukcję apoptozy. [12,13,18,77,86]

Częstość występowania MYCN zależy od budowy histologicznej guza i stopnia zaawansowania i w sposób istotny koreluje z odsetkiem OS (Tabela 5).

Tabela 5. Korelacja obecności amplifikacji MYCN ze stopniem zaawansowania i odsetkiem przeżyć całkowitych [9]

	Odsetek amplifikacji	Odsetek przeżyć
Ganglioneuroma	0	100
1. – 2. stopień zaawansowania wg INSS	4	90
4s stopień zaawansowania wg INSS	8	80
3. – 4. stopień zaawansowania wg INSS	32 (10 – 20% w stopniu 3)	30
Łącznie	22	50

Białko kodowane przez onkogen MYCN jest fosfoproteiną jądrową o masie cząsteczkowej 62 kDa, białkiem zasadowym o budowie helisa-pętla z zamkiem leucynowym. Białko to jest czynnikiem transkrypcyjnym, ulegającym ekspresji we wczesnej fazie G1 cyklu komórkowego. Funkcjonuje w heterodimerach z białkiem Max. Homodimery Max są czynnikiem represyjnym transkrypcji, natomiast heterodimery Max-Myc aktywują transkrypcję. Dlatego nadmiar białka MycN prowadzi do ciągłej aktywacji transkrypcji. Ekspresja genu jest regulowana rozwojowo i występuje tylko w rozwijającej się neuroektodermie. Jego funkcja jest wyłączana w momencie narodzin. Z amplifikacją może, ale nie musi, związana być nadmierna ekspresja białka. Poziom ekspresji MYCN nie jest istotnie związany z żadnym innym znanym czynnikiem prognostycznym, a jego znaczenie jest kontrowersyjne. Według części autorów wysoki poziom ekspresji, niezależnie od amplifikacji, u pacjentów powyżej 1. r.ż. i z wyższym stopniem zaawansowania koreluje ze złą prognozą, ale u części pacjentów bez amplifikacji i ekspresji MYCN prognoza też jest zła. Według innych autorów poziom ekspresji MYCN nie był związany z rokowaniem. Zarówno pacjenci z amplifikacją, jak i bez amplifikacji, wykazują różny poziom ekspresji genu MYCN. Nadmierny poziom białka lub mRNA w niektórych liniach komórkowych może być spowodowany raczej zaburzeniem ich degradacji niż nadmierną transkrypcją białka. Wyniki doniesień nie są jednak jednoznaczne. [10,17,21,23,84,85]

Amplifikacja genu MYCN dotyczy regionu 500-1000kb. Geny zlokalizowane w okolicy MYCN teoretycznie mogą przyczyniać się do fenotypu guza. Jednakże żaden z genów nie jest amplifikowany z MYCN w sposób stały i prawdopodobnie tylko MYCN jest odpowiedzialny za złośliwy przebieg NBL. W 40-50% koamplifikacji ulega gen DDX1, który może również przyczyniać się do złośliwej natury tych guzów. [17]

Podwyższona ekspresja MYCN może zwiększać potencjał wzrostowy komórek *in vitro* i *in vivo*. Jednakże rodzina onkogenów MYC jest również silnym czynnikiem indukującym apoptozę w warunkach, gdy ich ekspresja ulega deregulacji na ścieżce sygnałów mitogennych. Kilku badaczy stwierdziło korelację między poziomem MYCN i apoptozy *in vitro*. MYCN kontroluje ekspresję genów kodujących białka, których rolą jest proliferacja, regulacja cyklu komórkowego, apoptozy i utrzymanie stabilności genomu MYCN, hamuje również działanie białka Bcl-2, natomiast aktywuje Bax, przez co uwrażliwia komórki na apoptozę poprzez ścieżkę wewnętrzną. Jako cel transkrypcyjny MYCN w NBL

został zidentyfikowany również gen MDM2, będący negatywnym regulatorem białka p53. MYCN może destabilizować funkcję p53, przez co podnosi się próg stymulacji zatrzymania wzrostu i apoptozy. MYCN prawdopodobnie może zaburzać również prawidłowe różnicowanie komórek, także poprzez działanie na MDM2, promując progresję cyklu komórkowego w etapie krytycznym dla różnicowania. Dlatego MYCN powinien być rozważany jako potencjalny czynnik odgrywający istotną rolę zarówno w proliferacji, jak i w apoptozie komórek NBL *in vivo*, w zależności od występowania innych, nieznanych jeszcze dziś czynników. Jednym z proponowanych mechanizmów niekorzystnego prognostycznie działania amplifikacji MYCN jest defekt w ścieżce apoptozy towarzyszący amplifikacji MYCN, odpowiedzialny za zahamowanie apoptozy stymulowanej przez MYCN w warunkach fizjologicznych. Konieczne są dalsze badania nad rolą białek związanych z MYCN w regulacji proliferacji komórek i spontanicznej regresji w NBL. [13,18,55,81,84]

1.7. Zaburzenia apoptozy

Nieprawidłowości w regulacji apoptozy odpowiadają za rozwój nowotworów i oporność na terapię. Kaspaza 8, białko o charakterze proteazy cysteinowej, jest kluczową molekułą w ramieniu efektorowym apoptozy przebiegającej na ścieżce sygnalizacji zewnątrzkomórkowej, aktywowanej przez TRAIL, będący silnym czynnikiem indukującym apoptozę i wykazującym aktywność przeciwnowotworową *in vivo*. Zidentyfikowano 2 receptory agonistyczne: TRAIL-R1 (DR4) oraz TRAIL-R2 (DR5), uczestniczące w przekazywaniu sygnałów apoptozy oraz dwa receptory antagonistyczne nieprzekazujące sygnałów apoptozy: TRAIL-R3 (DcR1) i TRAIL-R4 (DcR2), chroniących prawidłowe komórki przed apoptozą. Inne receptory, które indukują apoptozę przez kaspazę 8 obejmują Fas, TNFR1 i DR3.

Kaspaza 8 może aktywować transkrypcję; natomiast przy nadmiernej ekspresji może wprowadzać komórkę na drogę apoptozy, działając jako czynnik inicjujący, pełni więc podwójną funkcję w komórce. Dodatkowo stwierdzono interakcję między tą ścieżką, a odrębną formą apoptozy (zależną od mitochondriów), która angażuje kaspazę 9, Apaf-1 i cytochrom c, co prowadzi do powstania „pętli amplifikacji”.

Gen kodujący kaspazę 8 zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 2 (2q23). Jego homozygotyczna delekcja obserwowana jest jedynie w niewielkim odsetku NBL, natomiast w większości guzów pierwotnych z amplifikacją MYCN następuje jego dezaktywacja funkcjonalna, tj. „wyciszenie” ekspresji przez hipermetylację. Komórki pozbawione kaspazy 8 są odporne na apoptozę indukowaną chemioterapią. Badania przeprowadzone na liniach komórkowych NBL (w większości z amplifikacją MYCN) wykazały brak ekspresji kaspazy 8 w komórkach. W guzach pierwotnych wykazano korelację metylacji genu kaspazy 8 z amplifikacją MYCN. Sugeruje to, że amplifikacja może być związana funkcjonalnie z całkowitą metylacją obu alleli genu kaspazy 8. [24,55,83,86]

1.8. Inne zaburzenia biologiczne w neuroblastoma

1.8.1. Receptory dla neurotropin

Tabela 6. Znaczenie prognostyczne receptorów neurotropin w neuroblastoma

Receptor	Ligand	Znaczenie rokownicze
TrkA	NGF	Korzystne
TrkB	BDNF	Niekorzystne
TrkC	NT3	Korzystne (?)

Jedną z przyczyn złośliwej transformacji komórek neuroblastycznych może być zaburzona odpowiedź na prawidłowe sygnały, w warunkach fizjologicznych powodujące różnicowanie morfologiczne. Czynniki te nie są do końca poznane, ale prawdopodobnie obejmują jedną lub kilka ścieżek receptorów neurotropowych, w tym dla czynnika wzrostu NGF. Precyzyjna rola receptorów pozostaje nieznana. Większość linii komórkowych NBL jest niezależna od czynników wzrostu *in vitro* i nie odpowiada na ich zastosowanie. NGF należy do rodziny homologicznych czynników neurotropowych, które obejmują BDNF, neurotropinę 3 i neurotropinę 4/5. Receptorami dla neurotropin jest rodzina Trk, w tym: TrkA dla NGF, TrkB dla BDNF i TrkC dla neurotropiny 3. Ekspresja TrkA korelowała odwrotnie z obecnością amplifikacji MYCN. Związana była natomiast z niższym wiekiem pacjenta, niższym stopniem zaawansowania i lepszym rokowaniem. Komórki NBL z wysoką ekspresją TrkA ulegają różnicowaniu w obecności NGF *in vitro*, natomiast bez obecności NGF komórki ulegają apoptozie. Aktywacja tej ścieżki może częściowo wyjaśniać zdolność NBL do różnicowania i regresji. Jednakże opisano również formę TrkA nie odpowiadającą na stymulację NGF w klinicznie agresywnych NBL.

Niepełna postać receptora TrkB („*truncated*”), bez aktywności kinazy tyrozynowej, ulega ekspresji głównie w guzach bardziej zróżnicowanych, podczas gdy ekspresja całej cząsteczki występuje głównie w komórkach z amplifikacją MYCN. Dlatego ścieżka ta może służyć jako autokrynną lub parakrynną formą promującą przeżycie komórek w guzach z amplifikacją MYCN. Funkcja receptorów bez aktywności kinazy tyrozynowej nie jest do końca jasna. Prawdopodobnie mają one zdolność sekwestracji BDNF i usuwania go z przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

Ekspresja TrkC zazwyczaj towarzyszy ekspresji TrkA i prawdopodobnie nie posiada samodzielnego znaczenia prognostycznego (Tabela 6). [18,76]

1.8.2. Zaburzenia genów supresorowych

1.8.2.1 Rola genów supresorowych TP53 i RB1 w rozwoju neuroblastoma

Geny supresorowe TP53 i RB1 często podlegają mutacji w procesie nowotworzenia. Fizjologicznie białko p53 chroni przed niestabilnością genomową i ekspresją onkogenów poprzez indukcję zatrzymania cyklu komórkowego. Białko pRb reguluje apoptozę w procesie rozwoju, a jego deregulacja prowadzi do zaburzeń wzrostu komórek i apoptozy.

Znane geny supresorowe, jak p16^{INK4a}, RB, TP53 i p14^{ARF} zazwyczaj nie ulegają delecji/mutacji w NBL, chociaż opisywane są zaburzenia lokalizacji jądrowej p16^{INK4a} i p53 oraz brak regulacji punktu kontroli G1/S. Dotychczas nie wyizolowano innych genów supresorowych w NBL.

TP53 ulega deregulacji w około 50% wszystkich nowotworów ludzkich. Gen TP53 odpowiada za punkt kontrolny wzrostu komórki, który ma na celu ochronę przed rearanżacjami genowymi lub akumulacją mutacji i hamuje transformację komórkową spowodowaną przez aktywację onkogenów lub utratę ścieżek supresji rozwoju nowotworów. Poziom białka p53 jest zazwyczaj niski ze względu na krótki okres jego półtrwania, jednakże zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowe czynniki mogą indukować jego stabilizację i aktywację na drodze różnych mechanizmów. Czynniki uszkodzające DNA, jak promieniowanie gamma i chemioterapia, stabilizują i aktywują p53 poprzez jego modyfikację kowalencyjną. Redukcja stabilizacji i aktywacji p53 może być powodowana również przez mutację czynników aktywujących p53. Białko p53 może być również stabilizowane i aktywowane poprzez deregulację onkogenezy komórkowej. Nadmierna ekspresja niektórych onkogenów indukuje ekspresję p14/19^{ARF}, które przez inaktywację MDM2 blokuje degradację p53. Aktywowane białko p53 może indukować zatrzymanie cyklu komórkowego lub apoptozę. Po uszkodzeniu DNA p53 blokuje progresję cyklu do czasu naprawy DNA; lub jeżeli nie jest to możliwe, prowadzi do apoptozy. Indukcja p53 może być zależna od rodzaju komórki, typu i siły bodźca aktywującego. Komórki, w których następuje nadmierna ekspresja onkogenów, lub które utraciły ścieżki supresorowe, często mają wysoką ekspresję p53, która jednak nie jest wystarczająca do zatrzymania cyklu komórkowego. Dlatego również komórki nowotworu są z reguły bardziej wrażliwe na czynniki uszkodzające DNA niż tkanki prawidłowe.

Ścieżki obejmujące pRb obejmują inhibitory kinazy zależnej od cyklin (CDK) z rodziny INK4, które są negatywnymi regulatorami proliferacji komórek oraz pozytywnie działające cykliny typu D, które tworzą aktywne kompleksy w związku z CDK4 lub CDK6. CDK prowadzą do fosforylacji białka pRb, co ogranicza jego aktywność. Aktywność CDK (a przez to i pRb) jest regulowana przez zewnętrzne czynniki mitogenne i antymitogenne. Uważa się, że inaktywacja ścieżki pRb jest niezbędna w tworzeniu nowotworu, która czyni komórki niewrażliwymi na sygnały antymitogenne.

Zarodkowe mutacje RB1 są związane z RBL u dzieci i predyspozycją do osteosarcoma. Somatyczne mutacje RB1 przyczyniają się do rozwoju innych ludzkich nowotworów, w tym raka płuc, nerki i pęcherza moczowego. Nie wiadomo jednakże, dlaczego mutacje zarodkowe prowadzą do węższego spektrum nowotworów niż somatyczne. W większości komórek utrata pRb prowadzi do apoptozy komórek. Dlatego zazwyczaj wymagane jest występowanie innych zmian genetycznych do zapobiegania apoptozie w komórkach z brakiem pRb. Komórki siatkówki i osteoblasty mogą „tolerować” utratę genu RB bez innych zmian genetycznych – prawdopodobnie dzięki sygnałom z otaczających je komórek, jednakże nie zidentyfikowano potencjalnych substancji działających w tym mechanizmie.

Istnieje silna korelacja między utratą pRb i brakiem funkcji p53 w guzach ludzkich. Sugeruje się, że utrata pRb przynosi rezultat w postaci apoptozy zależnej od p53. Jeżeli jednak główne czynniki regulujące apoptozę i/lub zatrzymanie cyklu komórkowego są zmutowane (ARF, p53) lub ulegają

nadmiernej ekspresji (MDM2), utrata funkcji genu RB przynosi wynik w postaci nadmiernej proliferacji komórek. W przypadku braku takich zmian, utrata pRb przynosi wynik w postaci zatrzymania wzrostu komórek i/lub apoptozy. [18,38,55,86] Innym białkiem związanym z genem RB jest białko Id2.

1.9. Rola białka Id2 w neuroblastoma

Białka Id (inhibitory wiązania DNA i/lub różnicowania) są to białka występujące fizjologicznie w okresie rozwoju. Ich rola polega na fizycznym oddziaływaniu z innymi białkami o budowie helisa-pętla-helisa (HLH), działającymi jako czynniki regulujące różnicowanie komórek.

W skład rodziny Id należą 4 białka: Id1 – Id4. W procesie powstawania nowotworów mogą one pełnić wiele istotnych ról, jak zahamowanie różnicowania, zwiększenie proliferacji, inwazyjności i angiogenezy. Pełnienie tych funkcji możliwe jest poprzez plejotropowy efekt działania tych białek, angażujący działanie wielu różnych ścieżek molekularnych. Jako jedyne z tej rodziny, białko Id2, oprócz dobrze udowodnionej zdolności wiązania białek bHLH, posiada również zdolność fizycznej interakcji z białkiem Rb i regulacji jego aktywności poprzez wiązanie go w nieaktywnej, hipofosforylowanej postaci, co zapobiega jego działaniu antyproliferacyjnemu. Dzięki temu jego funkcja pozwala na jednoczesne oddziaływanie zarówno na kontrolę różnicowania komórek, jak i na progresję cyklu komórkowego. Jednoczasowa kontrola obu tych mechanizmów ma kluczowe znaczenie w fizjologicznym rozwoju układu nerwowego, a potencjalnie także w procesie nowotworzenia. [6,32,48,52,60,93]

Białka zasadowe o budowie HLH (bHLH) należą do grupy czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję wielu genów, odpowiadających za różnicowanie komórek oraz nabywanie przez nie funkcji specyficznych dla danej tkanki. Ekspresja białek bHLH klasy II jest specyficzna dla danych tkanek. Tworzą one dimery z innymi, powszechnie występującymi w komórkach czynnikami transkrypcji, tak zwanymi białkami E, zaliczanymi do białek HLH klasy I. Do białek E należą E12 i E47, będące dwoma wariantami splicingu genu E2A, HEB i E2-2. [7,46,51,59]

Heterodimery, w skład których wchodzi białko E z białkiem specyficznym dla tkanki, wiążą się z kanonicznymi sekwencjami DNA (tzw. *E-box*) w genach docelowych, zawierających sekwencję CANNTG. Prowadzi to do aktywacji genów specyficznych dla tkanek i różnicowania komórek. Aby białko mogło przyłączyć się do DNA, w strukturze białka konieczna jest obecność czynnej domeny HLH. [46,51,59]

Aktywność białek bHLH jest regulowana w sposób negatywny poprzez strukturalne wiązanie z białkami z rodziny Id. Białka Id posiadają domenę o budowie helisa-pętla-helisa, poprzez które mogą tworzyć dimery z innymi białkami zawierającymi tę strukturę, brak im natomiast domeny zasadowej, koniecznej dla wiązania się z DNA. W efekcie zablokowane jest tworzenie funkcjonalnych dimerów białek E (regulatorów transkrypcji) ze specyficznymi dla tkanek białkami bHLH (regulującymi różnicowanie), prowadząc do zahamowania różnicowania komórek i wejścia komórek w fazę S cyklu komórkowego. Same białka Id nie wiążą się bezpośrednio z DNA, a ich wpływ na ekspresję genów polega na zablokowaniu czynników transkrypcyjnych. [6,39,40,46,51,64,93]

W oparciu o eksperymenty *in vivo* i *in vitro*, zaproponowano 2 różne mechanizmy, poprzez które białka Id mogą przyczyniać się do progresji cyklu komórkowego. [51]

Jednym z proponowanych mechanizmów jest obniżenie ekspresji zależnego od cyklin inhibitora kinaz na poziomie transkrypcji. Według tej teorii, białka Id wchodzi w interakcje z białkami bHLH regulującymi ekspresję p16^{Ink4a}, p27^{Kip1} i p21^{Cip1}. [11,32,44,46,51,88]

Drugim proponowanym mechanizmem jest interakcja białka Id2 (lecz nie innych białek z tej rodziny) z białkiem supresorowym nowotworów pRb. Jego wiązanie z białkiem pRb fizjologicznie jest zależne od fazy cyklu komórkowego. Działanie białek pRb i Id2 w komórce odbywa się na zasadzie antagonizmu funkcjonalnego, natomiast ich wzajemne oddziaływanie polega na bezpośredniej fizycznej interakcji. Wykazano, że białko Id2 wiąże się z niefosforylowaną postacią białka pRb poprzez związanie regionu HLH białka Id2 z domeną „kieszonkową” białka pRb, przez co może zapobiegać jego aktywności hamującej wzrost. W warunkach prawidłowych, hypofosforylowana postać białka pRb znajduje się w dużym nadmiarze w stosunku do białka Id2 i hamuje jego działanie. W przypadku znacznego stechiometrycznego nadmiaru białka Id2 w stosunku do białka pRb, funkcja antyproliferacyjna pRb zostaje zahamowana. Do zatrzymania cyklu komórkowego na ścieżce działania białka pRb konieczne są również liczne inne białka (bHLH, Ets, Pax i inne), których aktywność także jest hamowana przez aktywność białek Id. [32,46,51,88]

Model wyjaśniający rolę białka Id2 w fizjologicznej progresji cyklu komórkowego został po raz pierwszy zaproponowany przez Lasorella i wsp. [44,46] W badaniach *in vitro* wykazano zdolność białka Id2 do wiązania się z białkami związanymi z pRb, p107 i p130. Są to białka supresorowe, charakteryzujące się występowaniem wspólnej sekwencji homologicznej, do której wiążą się między innymi białko E2F i cykliny, białka regulujące przebieg cyklu komórkowego. Interakcja między tymi białkami a rodziną białek pRb przynosi rezultat w postaci czasowej ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcji, konieczne, w zależności od okoliczności, do progresji cyklu komórkowego lub rozpoczęcia różnicowania. Aktywacja cyklin zależnych od kinaz powoduje fosforylację białka pRb i inaktywację jego funkcji. Ponadto, zwiększenie fosforylacji białka pRb powoduje uwolnienie związanych z nim białek Id2, wiążących się wyłącznie z postacią hypofosforylowaną. W wyniku tych zdarzeń, następuje stymulacja ekspresji genu cykliny E i zahamowana zostaje represja białka E2F. Niezależnie od fosforylacji, przez wiązanie i inaktywację białka pRb, także białko Id2 może zwiększać transkrypcję E2F poprzez zniesienie wpływu hamującego pRb i zahamowanie sygnałów antyproliferacyjnych, co pozwala na progresję cyklu komórkowego. [11,44]

Funkcja białka Id2 może być wymagana do sekwencyjnej inaktywacji różnych białek biorących udział w kontroli cyklu komórkowego na ścieżce pRb, które w postaci aktywnej powodują zatrzymanie cyklu komórkowego poprzez regulowaną czasowo asocjację z czynnikami transkrypcji E2F. W prezentowanym modelu, pierwszy wykrywalny wzrost ekspresji białka Id2 przynosił rezultat w postaci asocjacji między p130 a E2F, co powodowało usunięcie bloku utrzymującego komórkę w fazie G0. Ponowny wzrost ekspresji białka Id2 obserwowano w fazie G1, dzięki czemu następowało uwolnienie białka E2F z asocjacji z białkami rodziny pRb i dalszą progresję cyklu komórkowego. Na podstawie zaproponowanego modelu wynika, że proliferacja komórek wymaga wygaszenia

aktywności pRb przez cykliny zależne od kinaz na drodze fosforylacji. Zaproponowano model, w którym Id2 i pRb, ulegając jednoczasowej ekspresji, prowadzą do sytuacji, w której niefosforylowana, aktywna forma pRb jest funkcjonalnie inaktywowana poprzez fizyczną asocjację z Id2. Założono, że w warunkach podwyższonej ekspresji Id2 (po stymulacji czynnikami wzrostu komórek zatrzymanych w fazie G0-G1 lub w komórkach guza) zwiększona ilość niefosforylowanego białka pRb, wynikająca z aktywności cyklin, będzie niewystarczająca do zatrzymania cyklu komórkowego z powodu całkowitego zablokowania pRb przez Id2. Inaktywacja cyklin także będzie niewystarczająca do przełamania tego bloku, ponieważ również one są zablokowane przez Id2. [11,44]

Związki w komórce między pRb i Id2 oraz pRb i E2F są jednak słabo poznane. Możliwe, że Id2 i E2F wiązane są w tym samym czasie przez białka pRb. W modelu tym Id2 i E2F zaangażowane mogłyby być w różne mechanizmy kontroli cyklu komórkowego, kontrolowane przez pRb. Nadmiar białka pRb byłby tutaj głównym mechanizmem zabezpieczającym prawidłową kontrolę cyklu komórkowego. Przemawia za tym duża ilość kompleksów hypofosforylowanego pRb z Id2 stwierdzana w czasie fazy S. Drugim możliwym rozwiązaniem jest konkurencja Id2 i E2F o wiązanie z pRb, wtedy część efektu wynikałaby z aktywności E2F. Modele te nie wykluczają się nawzajem. Stechiometryczny nadmiar białka Id2 w stosunku do pRb przynosiłby wynik zarówno w postaci powstania sygnałów antyproliferacyjnych, jak i uwolnienia hamowania białka E2F przez pRb. Dodatkowo, białka Id hamują działanie pRb poprzez zahamowanie p16^{Ink4a}. Innym proponowanym mechanizmem jest fosforylacja białek Id, zwiększająca ich aktywność i umożliwiającą progresję cyklu komórkowego. [38,46,48,51,61,95]

Opisano również hamowanie przez białko Id2 aktywacji białka p57^{Kip2} poprzez wiązanie białka E47. Białko p57^{Kip2} jest inhibitorem kinaz zależnym od cyklin, niezbędnym w czasie prawidłowego rozwoju. Jego ekspresja powoduje ostateczne wyjście neuronów z cyklu komórkowego. Jest to kolejny dowód zarówno na istnienie regulacji białek bHLH przez białka Id, jak i wpływu na progresję cyklu komórkowego przez regulację białek z nim związanych. [73] Chociaż rodzaj, ilość i działanie cyklin jest porównywalne we wszystkich komórkach, to jednak są one regulowane w różny sposób w zależności od fenotypu komórki i rodzaju działającego bodźca, co znacznie utrudnia jednoznaczną interpretację dostępnych wyników badań, a także wyciągnięcie wniosków prawdziwych dla wszystkich komórek we wszystkich okolicznościach. [44]

Na współdziałanie białka pRb i Id2 w prawidłowej embriogenezie wskazują eksperymenty polegające na wyeliminowaniu genów kodujących oba białka w zarodkach mysich. Podwójna delecja RB⁻/RB⁻ w czasie embriogenezy u myszy jest letalna. Dodatkowa utrata obu alleli genu ID2 wpływa na obniżenie śmiertelności tych embrionów w sposób zależny od dawki. Efekt ten wskazuje na ściśle współdziałanie obu białek w warunkach fizjologicznego rozwoju, a także istnienie możliwości ominięcia punktu kontroli progresji cyklu komórkowego regulowanego przez pRb przy wysokim poziomie białka Id2. Zarówno utrata funkcji białka pRb, jak i nadmierna aktywność białka Id2 przynoszą taki sam rezultat w postaci nadmiernej proliferacji komórek, utraty różnicowania i apoptozy. [46] Pośrednio w inaktywacji białka pRb uczestniczą również białka Id1 i Id3. Powodują one obniżenie ekspresji inhibitorów kinaz zależnych od cyklin, np. p16, prowadząc do nadmiernej fosforylacji białka pRb

i zahamowania jego funkcji. Hyperfosforylacja powoduje również zahamowanie sekwestracji białka Id2 przez pRb. [71] Innymi białkami, których poziom może być regulowany przez białka Id są MIDA1, Pax2, Pax5, Pax 8, i Elk-1. [96]

Na wczesnych etapach rozwoju embrionalnego, wszystkie białka z rodziny Id ulegają ekspresji w wielu tkankach i narządach. Czas i poziom ekspresji zależny jest od narządu/tkanki i od stopnia ich rozwoju. [96] Ekspresja białka Id2 stwierdzana jest głównie w okresie prenatalnym. W okresie postnatalnym ekspresja białka Id2 opisywana jest w niektórych postmitotycznych neuronach centralnego systemu nerwowego oraz w jądrze męskim (w komórkach Sertoliego). W centralnym układzie nerwowym w okresie postnatalnym ekspresja białka Id2 stwierdzana jest w neuronach postmitotycznych w strefie pośredniej, komórkach Purkiniego w mózdzku oraz w korze mózgu w strefach II/III i V. [88,96]. Ekspresja Id2, podobnie jak MYCN, nie jest stwierdzana w prawidłowym nadnerczu w okresie postnatalnym. [43] Możliwość takiej ekspresji została opisana tylko w jednym z badań i nie została potwierdzona. [44,47,74] Istnieje jednak teoria, że białko Id2 i inne białka z tej rodziny są obecne również w komórkach zróżnicowanych, ale ich poziom jest poniżej poziomu detekcji standardowymi metodami, gdyż podlegają one ścisłej negatywnej regulacji. [48]

Białka Id konieczne są do utrzymania niedojrzałości komórek progenitorowych i kontynuowania ich proliferacji do osiągnięcia konkretnego, ustalonego punktu w rozwoju. W przypadku ich braku, białka bHLH rozpoczynają przedwcześnie swoje działanie i końcowe różnicowanie komórek ma miejsce wcześniej niż powinno. Regulacja taka ma miejsce m.in. w przypadku rozwoju układu nerwowego. W układzie immunologicznym białka Id regulują powstanie danego typu komórki, jednocześnie hamując tworzenie innych z tego samego prekursora (białka bHLH powodują różnicowanie w kierunku limfocyta T, zahamowanie ich aktywności przez białka Id – w kierunku komórki NK). Tak więc nawet w przypadku tej samej komórki progenitorowej białko Id może być zarówno inhibitorem, jak i stymulatorem różnicowania. Z drugiej strony, w przypadku komórek Sertoliego, ekspresja białka Id jest niezbędna do zapewnienia przetrwania komórki już po zakończeniu podziałów. [48,89,95,96]

W badaniach prowadzonych na liniach komórkowych fibroblastów wykazano, że niski poziom Id1 i Id2 ulega zwiększeniu w odpowiedzi na działanie czynników mitogennych. Kiedy odpowiedź ta jest zablokowana poprzez oligonukleotydy antysensowne skierowane przeciw Id1 i Id2, komórki nie wchodzi w fazę S cyklu komórkowego. Jednakże sam wzrost ekspresji białek Id nie był wystarczający do zapobiegania apoptozie. Generalnie badania *in vitro* wskazują, że w proliferujących liniach komórkowych zawsze dochodzi do zwiększenia ekspresji minimum jednego z białek Id. [37,62,63]

Spośród wszystkich białek Id, w rozwoju układu nerwowego najważniejszą funkcję pełni białko Id2. Jego ekspresja w ektodermie jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju komórki progenitorowej w kierunku układu nerwowego i zahamowania dojrzewania komórek w kierunku epidermalnym. Wpływ Id1 i Id3 na neurogenezę polega jedynie na wpływie pośrednim poprzez hamowanie angiogenezy. Białko Id4 pełni ważną funkcję w rozwoju oligodendrocytów. Ponadto białka Id1 i Id3 biorą udział w miogenezie i adipogenezie. Są one również odpowiedzialne za determinację komórek nabłonkowych w kierunku naczyniowym. Id1 i Id2 uczestniczą w rozwoju limfocytów T i B. Opisano również znaczenie białek z rodziny Id w kontroli różnicowania innych komórek układu

immunologicznego (komórki NK, tworzenie kępek Peyera), gruczołu sutkowego (Id2 bierze również udział w prawidłowym dojrzewaniu sutka w okresie ciąży) i spermatogenezie. [7,25,29,35,47,48,88,96]

Białko pRb pełni również ważną rolę w rozwoju układu nerwowego. W tworzeniu zróżnicowanych komórek układu nerwowego kluczowym elementem kontroli różnicowania jest fakt, że rozpoczęcie różnicowania komórek związane jest z ostatecznym zakończeniem proliferacji komórek i nieodwracalnym zahamowaniem progresji cyklu komórkowego. Udowodniono, że ekspresja genów odpowiedzialnych za różnicowanie komórek w kierunku układu nerwowego zależna jest od obecności białek bHLH. W przypadku hamowania ich aktywności transkrypcyjnej poprzez wiązanie przez białko Id2, geny te nie ulegają transkrypcji w komórce progenitorowej. W warunkach fizjologicznych, przy zachowaniu prawidłowego stosunku białka Id2 i pRb oraz prawdopodobnie również ich prawidłowej dla danego etapu dojrzewania fosforylacji, nadmierna ekspresja Id2 i zahamowanie różnicowania komórki progenitorowej prowadzi do apoptozy poprzez działanie białka pRb. Prawidłowe funkcjonowanie białka pRb jest niezbędne dla zahamowania aktywności białka Id2 w odpowiednim momencie rozwoju, w celu zapobiegania ekotopowej proliferacji i apoptozie prawidłowych komórek oraz zapewnienia prawidłowego różnicowania. Gdy komórka progenitorowa osiągnie stadium postmitotycznej komórki nerwowej, białko Id2 przestaje hamować ekspresję genów specyficznych dla komórki, co potwierdza fakt, że ten mechanizm regulacji jest kluczowy w określonym punkcie czasowym. [27,32,38,46,47,50,51,88]

W czasie rozwoju układu nerwowego, białko pRb nie jest wymagane do indukcji różnicowania neuronów ani do migracji progenitorów komórek nerwowych ze strefy komorowej do postmitotycznych okolic mózgu, jest jednak niezbędne do wyjścia komórek z cyklu komórkowego i uniknięcia apoptozy. W przypadku braku pRb w komórce lub jego nieprawidłowej funkcji, neurony ulegają ektopicznej proliferacji i apoptozie. Efekt ten może być zniesiony przez ablację genu ID2 *in vivo* i ponownie uruchomiony przez ponowne wprowadzenie genu i wzrost ekspresji białka Id2 w komórkach progenitorowych. Zakłada się, że utrata białka Id2 z proliferujących okolic CSN, która ma miejsce na wczesnym etapie neurogenezy, inicjuje ekspresję genów neuronalnych i różnicowanie komórki progenitorowej. Białko pRb w embriogenezie jest niezbędne dla kontrolowania funkcji Id2, wycofania w odpowiednim czasie komórki z cyklu komórkowego, zapewnienia prawidłowego różnicowania komórek w kierunku układu nerwowego i ich bezpiecznego przeżycia po wyjściu z cyklu komórkowego. [43]

Na kontrolę poziomu białka Id2 w czasie różnicowania układu nerwowego wpływa również białko ENH, które powoduje sekwestrację Id2 i przemieszczenie go z jądra komórkowego do cytoplazmy, prowadząc do jego dezaktywacji. Jednoczasową ekspresję Id2 i ENH wykazano w komórkach zwojowych ganglioneuroblastoma, co może świadczyć o zwiększeniu możliwości różnicowania komórek w przypadku zablokowania funkcji Id2. [45]

Wpływ białek o budowie HLH na dojrzewanie komórek neuroblastoma poprzez regulację ekspresji białka p21 udowodniono w eksperymentach przeprowadzanych na liniach komórkowych z zastosowaniem kwasu 13-cis-retinowego (13-cis-RA).

Kwas retinowy odgrywa istotną rolę w rozwoju układu nerwowego poprzez indukcję mechanizmów promujących zatrzymanie cyklu komórkowego i różnicowanie komórek. Komórki linii komórkowej neuroblastoma SH-SY5Y poddane działaniu 13-cis-RA przechodzą proces różnicowania neuronalnego. Komórki zostają zatrzymane w fazie G1, następuje akumulacja hypofosforylowanego białka pRb, zwiększona zostaje ekspresja receptora neurotropin TrkB i innych markerów neuronalnych oraz nasila się proces tworzenia wypustek nerwowych. Akumulacja hypofosforylowanej postaci białka pRb przy niezmiennym poziomie cyklin C i D wskazuje na możliwość bezpośredniego zahamowania kompleksu kinaz z cyklinami zależnymi od kinaz C i D, poprzez zwiększenie ekspresji białka p21^{Cip1}, działającego jako inhibitor cyklu komórkowego, zatrzymujący go w fazie G1. Jego zwiększona ekspresja odpowiada za funkcjonalną aktywację białka p53, z kolei białko p53 stabilizuje mRNA p21. W aktywacji transkrypcji p21 pośredniczą natomiast białka HLH poprzez interakcję z sekwencją E-box promotora genu kodującego białko p21. Jednocześnie ze wzrostem ekspresji p21 rośnie ekspresja genu kodującego receptor TrkB, którego promotor również zawiera sekwencję E-box. Tak więc białka HLH, poprzez wpływ na poziom białka p21 i receptora TrkB odgrywają istotną rolę w koordynacji między zatrzymaniem cyklu komórkowego i różnicowaniem neuronalnym. [11,51]

13-cis-RA powoduje również gwałtowne obniżenie się poziomu białek Myc w komórkach SH-SY5Y. Białka Myc zaangażowane są w mechanizm transkrypcyjnej aktywacji białka Id2, tak więc zablokowanie ich ekspresji prowadzi do obniżenia się ilości białka Id2 w komórce w odpowiedzi na działanie 13-cis-RA. W ten sposób białka Id2 tworzą ścieżkę łączącą sygnały inicjujące różnicowanie aktywowane przez 13-cis-RA z aktywnością białek bHLH, uczestniczących w różnicowaniu komórek, a ponadto obniżenie ich zawartości w komórce umożliwia prawidłowe działanie białka pRb. Nadmierna ekspresja Id2 w komórkach SH-SY5Y leczonych RA zapobiegała aktywacji promotora p21 i powodowała nieprawidłowe wejście komórki w fazę S cyklu komórkowego. [51]

Proces ten w linii komórkowej NBL prowadzi to do powstanie homogennej populacji zróżnicowanych komórek, których przeżycie zależne jest od obecności czynnika wzrostu (BDNF). Na podstawie przedstawionego mechanizmu można wnioskować, że zablokowanie funkcji białka Id2 w odpowiednim etapie rozwoju ma ważne znaczenie dla prawidłowego dojrzewania komórek. Białko Id2 działa na drodze dwóch różnych mechanizmów, co pozwala na skoordynowaną w czasie kontrolę zahamowania progresji cyklu komórkowego i rozpoczęcie różnicowania, co ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego rozwoju komórek nerwowych. [51,88]

W warunkach fizjologicznych tworzenie neuronów zależy ściśle od etapu rozwoju, na którym zadziała 13-cis-RA i uruchomione zostaną związane z tym mechanizmy komórkowe. Sugeruje to, że sygnały różnicowania są specyficznym interpretowane jako funkcja czasu w okresie rozwoju. [51]

W innym badaniu wykazano również obniżenie ekspresji i obniżenie poziomu białek Id1, Id2 i Id3 podczas różnicowania linii komórkowej NBL przez kwas retinowy. Poziom białek obniżał się równolegle z zahamowaniem ekspresji genów. RA miał również wpływ na ekspresję innych białek z rodziny HLH – powodował zahamowanie ekspresji białek specyficznych dla neuroblastów, natomiast wzrost ekspresji białek promujących różnicowanie. Wynika stąd, że różnicowanie indukowane przez

kwasy 13-cis-retinowe mogą polegać na wpływie na regulację ekspresji różnych białek o budowie HLH. [54]

Rolę białek Id2 w dojrzewaniu NBL, także indukowanym pochodnymi kwasu retinowego, udowodniono również w badaniu Gumireddy i wsp. Linie komórkowe NBL zostały poddane działaniu pochodnych witaminy D₃, co prowadziło do obniżenia ekspresji białek Myc i Id2, zwiększenia ekspresji receptora dla kwasu retinowego i p21^{Cip1}. Obserwowano również zmniejszenie ekspresji cykliny D1, co z kolei przynosiło rezultat w postaci zwiększenia ilości aktywnego, hypofosforylowanego białka pRb. [34]

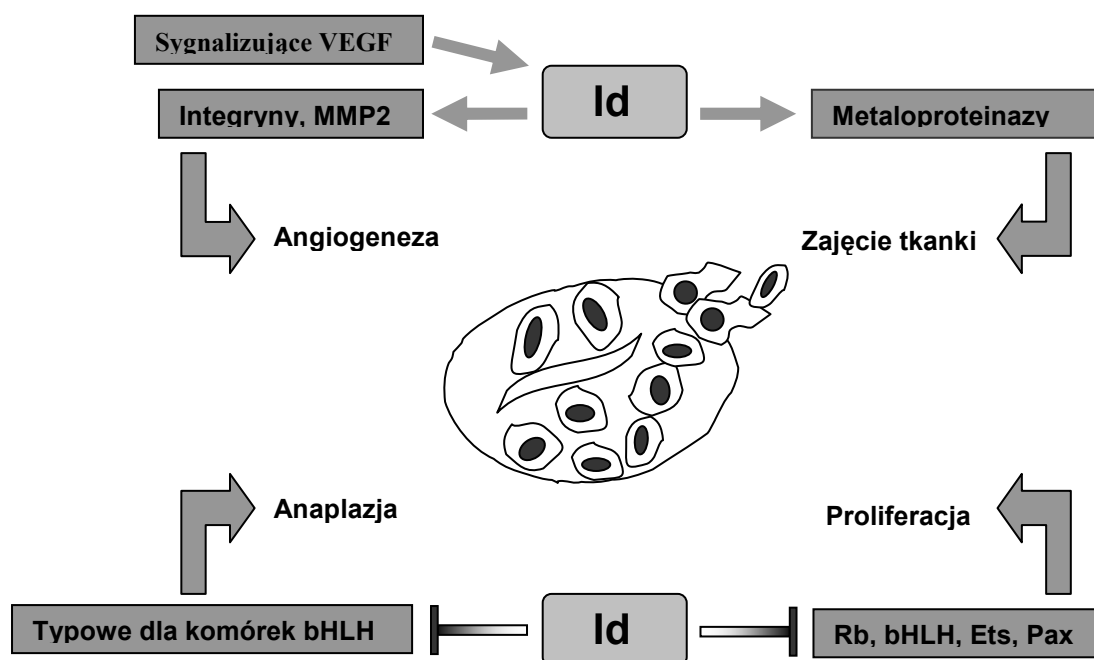
Deregulacja działania białek Id2 i związany z tym pleiotropowy efekt na wiele ścieżek molekularnych może prowadzić do nowotworowej transformacji komórki. Istnieją dwie fundamentalne funkcje białek Id, dzięki którym możliwe jest ich działanie jako czynników onkogennych. Po pierwsze, interakcja białka Id2 z białkiem pRb, pełniącym kluczową rolę w regulacji progresji cyklu komórkowego. Po drugie, białka Id1 i Id3 biorą udział w angiogenezie, przez co również mogą przyczyniać się do rozwoju nowotworów. [48,63]

Deregulacja białka Id2 pozwala teoretycznie zarówno na zahamowanie różnicowania, jak i stałą aktywację proliferacji, niezależną od obecności czynników wzrostu. Istnieją również doniesienia wskazujące, że białka Id mogą pełnić pewne funkcje białek „immortalizujących”, ale takie działanie opisano dotychczas tylko dla Id1 i Id3. Dla genów ID1 i ID3 kodujących te białka opisano odpowiednie mutacje występujące w komórkach czerniaka i raka płuc. Dotychczas nie przeprowadzono badań potwierdzających lub negujących rolę genu ID2 jako onkogenu. Zgodnie z definicją, onkogen jest bowiem genem, w którym muszą zajść zmiany umożliwiające transformację komórek prawidłowych do nowotworowych. Białko Id2 nie może więc na dzień dzisiejszy być traktowane jako produkt klasycznego onkogenu, gdyż zmiany genów kodujących te białka nie zostały do tej pory opisane w nowotworach. Ich udział w onkogenezie wiąże się natomiast z ich regulacją przez inne onkogeny, np. Myc i wtórnym wzrostem białek Id w komórce. W przypadku całkowitego braku białek Id2 w komórce następuje znaczne obniżenie ich zdolności proliferacyjnej. Prawdopodobne jest, że istnieje krytyczny próg poziomu Id2, który określa możliwość proliferacji komórek. Nadmierna ekspresja sprawia, że komórki stają się niewrażliwe na zewnątrzkomórkowe sygnały antymitogenne, jak np. pozbawienie surowicy komórek w hodowli oraz na zahamowanie kontaktowe, co znacznie zwiększa ich potencjał onkogenny. [43,47,48,62,63,71]

W jednym z badań wykazano również pozytywny wpływ ekspresji białka Id2 na ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), co zwiększa waskularyzację nowotworu i przyczynia się do jego bardziej agresywnego przebiegu. Zwiększony poziom VEGF miałby działać na komórki nabłonkowe różnicując się w kierunku naczyniowym dzięki działaniu białek Id1 i Id3. [7,47]

Teoretycznie więc, obok mutacji genetycznych i epigenetycznego blokowania ekspresji genów poprzez metylację DNA, nadmierna ekspresja białek Id mogłaby prowadzić do dziedzicznej inaktywacji genów na drodze zmian epigenetycznych. Zjawisko to nazwano „mimikrą onkogeną”, gdyż białka Id wiążą się z białkami E, które w przypadku klasycznej onkogenezy są blokowane przez onkogeny. [71] Białko Id2 mogłoby więc uczestniczyć w trzech kluczowych etapach onkogenezy: inicjacji, proliferacji komórek guza i angiogenezie (Rysunek 2). [47]

Rysunek 2. Potencjalny udział białka Id2 w onkogenezie [42]



Oprócz białka Id2 w NBL, oceniano także funkcję białka Id1 w raku trzustki i raku sutka. We wszystkich przypadkach, zastosowanie oligonukleotydów blokujących działanie tych białek przynosiło rezultat w postaci zahamowania proliferacji komórek. Doprowadziło to do powstania hipotezy, że proliferacja komórek nowotworowych, przynajmniej w części, zależna jest od obecności białek Id. Innymi nowotworami, w których różne białka Id ulegają deregulacji, to rak prostaty, sutka, jajnika, jelita grubego, wątroby, endometrium, tarczycy, przełyku, jamy ustnej, czerniak, guz Ewinga i nasieniak. [41,48,69,71]

Interesującą teorią jest również potencjalna rola białek Id w utrzymaniu fenotypu pierwotnych komórek nowotworowych (komórek pnia, *tumor stem cells*), których istnienie jest ostatnio postulowane. Wykazano, że wzmożona ekspresja białka Id w osteoblastach jest niezbędna do zapewnienia odnawialności puli komórkowej i zachowania ich pluripotencjalnego charakteru. Udział białek Id może być również konieczny do zachowania pluripotencjalnego charakteru embrionalnych komórek pnia. Doświadczenia wskazują na możliwość przywrócenia komórek nowotworowych do stadium komórki pnia przez białka Id, umożliwiając długoterminowy wzrost lub progresję guza. W takim przypadku, występowanie Id nawet w pojedynczych komórkach guza mogłoby potwierdzać ich kluczową rolę w rozwoju nowotworów. [2,28]

W badaniach linii komórkowych NBL stwierdzono występowanie wysokich poziomów białka Id2 w komórkach z amplifikacją MYCN. Prowadzi to do epigenetycznego ominięcia supresorowej funkcji pRb przy jednoczesnym braku zmian genetycznych białka pRb. Cechy charakterystyczne dla komórek z nadmierną aktywnością białek z rodziny Myc, zdolność do wejścia komórki w cykl komórkowy bez obecności czynników wzrostu oraz zdolność kooperacji z białkiem Ras

w celu transformacji nowotworowej komórek wydają się być zależne od funkcji białka Id2. Badania nad korelacją ekspresji białek Mycn i Id2 przeprowadzono także u zarodków mysich w 15. dniu trwania ciąży, kiedy dla dalszego prawidłowego rozwoju układu nerwowego konieczna jest prawidłowa funkcja pRb. Wykazano, że Mycn i Id2 ulegały ekspresji w tych samych komórkach, natomiast pRb zmieniał formę z hiperfosforylowanej w 10. dniu trwania ciąży na hipofosforylowaną w dniu 15. [43,46]

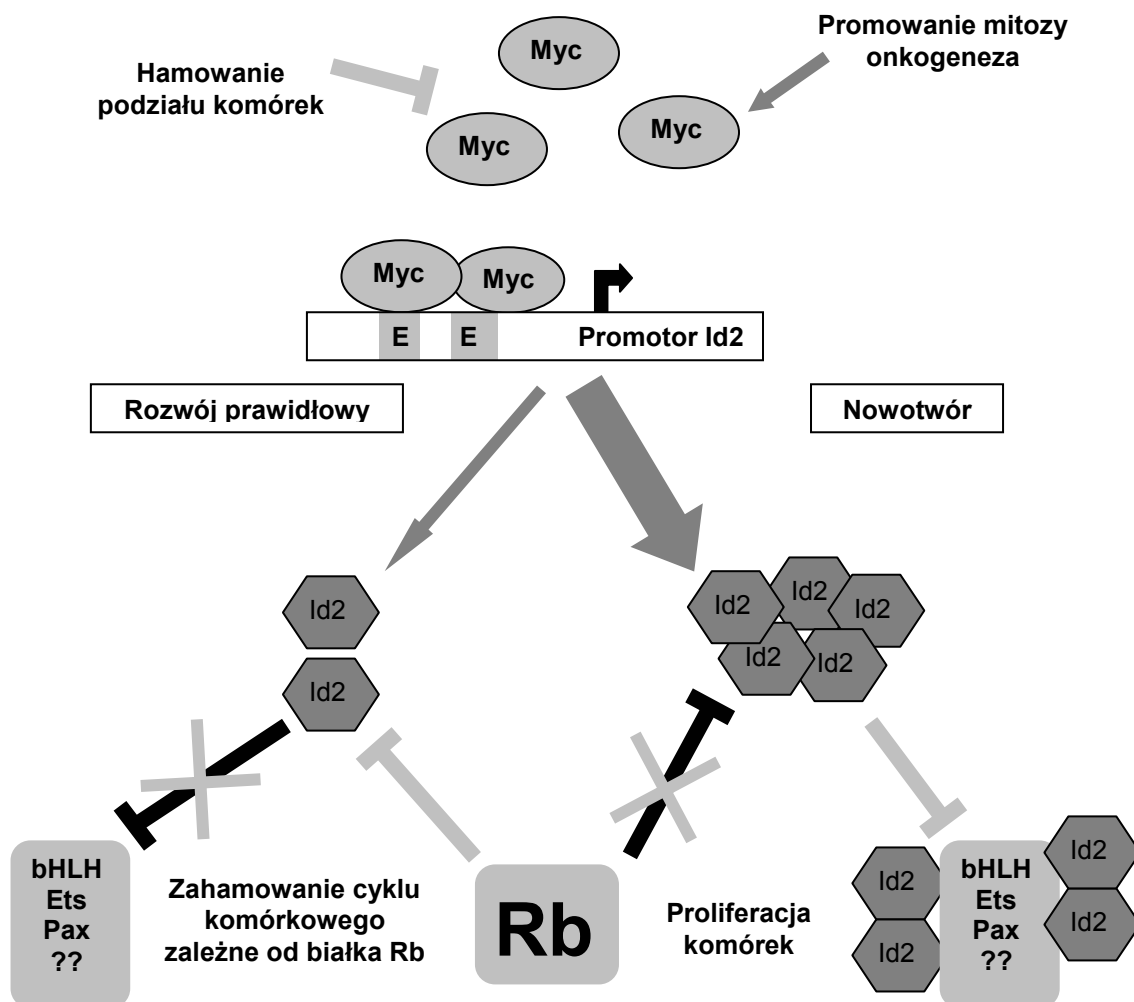
Stwierdzono, że MYC wpływa również na poziom ekspresji Id1 i Id3. Wykazano indukcję ekspresji Id1 przez MYC w liniach komórkowych raka sutka oraz Id3 w modelu zwierzęcym rozwoju układu nerwowego u bezkręgowców. Aktywacja wielu białek z rodziny Id przez MYC może wyjaśniać, dlaczego ekspresja białka Id2 nie zawsze towarzyszy wzrostowi poziomowi MYC. [71]

W NBL opisywana jest również nadmierna ekspresja białek Id1 i Id3 w naczyniach krwionośnych, odgrywających fizjologicznie rolę w angiogenezie, zwłaszcza w zakresie centralnego systemu nerwowego. W przypadku zablokowania białek Id, naczynia tracą zdolność tworzenia rozgałęzień. W przypadku nowotworów, Id1 i Id3 ulegają ekspresji w naczyniach krwionośnych guzów i odpowiadają za przekształcenie naczyniowe komórek nabłonkowych. Ich obecność stwierdza się głównie w guzach najbardziej złośliwych. [7,47,48] W liniach komórkowych NBL, zahamowanie wzrostu jest indukowane przez ekspresję białka E. Id2, często ulegające nadmiernej ekspresji w komórkach NBL, działa jako naturalny inhibitor białek E. W eksperymentach na linii komórkowej SK-N-SH, nadmierna ekspresja Id2 była wydarzeniem wystarczającym do wejścia komórek w fazę S cyklu komórkowego. [46]

Wykazano również, że w liniach komórkowych NBL progresja komórek do fazy S jest promowana przez białko Id2, a hamowana przez E47. Białko E47 działa poprzez aktywację kinazy zależnej od cyklin, $p57^{Kip2}$, niezbędnej do prawidłowego rozwoju embrionalnego. Wprowadzenie białka E47 do komórek NBL powodowało gwałtowny wzrost ekspresji $p57^{Kip2}$, a następnie zatrzymanie cyklu komórkowego poprzez zablokowanie wejścia w fazę S oraz powstanie genotypowych i biochemicznych cech różnicowania neuronalnego. Zahamowanie zależnej od białka E47 ekspresji $p57^{Kip2}$ przez nieprawidłowe białko Id2 może przyczyniać się do rozwoju nowotworów układu nerwowego. [73]

Lasorella i wsp. stwierdzili, że nadmierna ekspresja Id2 w komórkach NBL odpowiada za transformację nowotworową komórek prekursorowych, a jego stała ekspresja jest wymagana dla utrzymania złośliwego charakteru komórek NBL. Oddziaływanie białka Id2 na białko pRb mogłoby tłumaczyć brak zaburzeń pRb w NBL i ominięcie bloku progresji cyklu komórkowego. Warunkiem prawidłowego funkcjonowania pRb *in vitro* jest negatywna regulacja białka Id2. Ponadto, opisywany wpływ białek produktów onkogenów z rodziny MYC na ekspresję białek Id2, wiążących się bezpośrednio i aktywujących promotor Id2, mógłby odpowiadać za wzmożoną ekspresję białka Id2 w korelacji ze zwiększoną ekspresją MYCN w NBL (Rysunek 3). [43]

Rysunek 3. Potencjalna zależność pomiędzy białkami Myc, Id2 i Rb w regulacji cyklu komórkowego [42]



Istnieje hipoteza, że do rozwoju nowotworu konieczne jest zahamowanie działania białka Rb. Dlatego też w nowotworach, w których dotychczas nie wykryto zaburzeń ścieżki apoptozy mediowanej przez pRb, w takich jak NBL, należy wziąć pod uwagę możliwość ominięcia proapoptotycznego działania białka pRb, co umożliwia między innymi nadmierna ekspresja białka Id2. Ponadto, w związku z tym, że prawidłowa ekspresja białka Id2 jest niezbędna dla regulacji proliferacji i różnicowania układu nerwowego wydaje się, że komórki nowotworów wywodzących się z układu nerwowego mogą być szczególnie wrażliwe na nieprawidłową ekspresję białka Id2. W NBL stosunkowo często obserwowaną zmianą jest amplifikacja onkogenu MYCN, która mogłaby odpowiadać za zwiększoną ekspresję białka Id2, gdyż opisano wpływ aktywacji białek Myc na poziom Id2. [32,46,51,88] Wykazano, że w liniach komórkowych NBL obecna jest nadmierna ekspresja białka Id2, zwłaszcza w przypadku obecności amplifikacji MYCN. [44,46,47]

Ze względu na wielokierunkowe działanie Id2 w rozwoju i utrzymaniu złośliwego fenotypu nowotworu powstaje pytanie, czy to białko może być nowym czynnikiem prognostycznym w NBL. Dlatego podjęto badania w tym temacie.

1.10. Białko oporności wielolekowej

Ekspresja białka oporności wielolekowej (*Multidrug Resistance Protein*, MRP) na komórkach NBL koreluje z obecnością ekspresji i amplifikacji MYCN. Oporność wielolekowa definiowana jest jako krzyżowa oporność na wiele leków, niezwiązanych strukturalnie i farmakologicznie. Często związana jest z nadmierną ekspresją jednego lub więcej białek transportowych, do których zaliczane jest MRP. Stanowi czynnik rokowniczy niezależny od MYCN, w sposób istotny wpływając na EFS i OS. [68]

1.11. Inne markery o potencjalnym znaczeniu prognostycznym

- Chromogranina A jest kwaśnym białkiem, które znajduje się w neurosekrecyjnych ziarnistościach komórek neuroendokrynnych, a jego zawartość jest regulowana rozwojowo. Obecne jest w surowicy pacjentów z NBL, dlatego może służyć jako czuły wskaźnik aktywności choroby i odpowiedzi na leczenie. [18]
- Neuropeptyd Y jest białkiem neurosekrecyjnym, którego ekspresja jest regulowana rozwojowo i ograniczona do komórek nerwowych. [18]
- Innymi hormonami peptydowymi są SS i wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP). Ekspresja receptorów SS na komórkach NBL jest związana z bardziej zróżnicowaną budową histologiczną, niższym stopniem zaawansowania i lepszymi wynikami leczenia. VIP związany jest z występowaniem zespołów paraneoplastycznych w NBL, ale także z większym zróżnicowaniem komórek. [18]
- CD44 - glikoproteina powierzchniowa zaangażowana w adhezję komórek. Nie ma korelacji ze stopniem zaawansowania, ale stwierdza się lepsze rokowanie w przypadku ekspresji CD44, niezależnie od stopnia zaawansowania. [77]
- NME1 – białko powodujące supresję powstawania przerzutów. [13]
- Telomeraza – wysoki poziom telomerazy łączy się z niekorzystnymi czynnikami klinicznymi, genetycznymi i złą prognozą. [13]
- Nm23 – gen zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 17. W NBL ekspresja tego genu jest zwiększona w guzach agresywnych. [13]
- Survivina – gen tego białka zlokalizowany jest na 17q25. Podwyższone stężenie białka koreluje z niekorzystnymi czynnikami klinicznymi. Survivina odpowiada za zahamowanie apoptozy w liniach komórkowych w odpowiedzi na kwas retinowy. [13]

1.12. Biochemiczne czynniki prognostyczne

1.12.1. Enolaza neurospecyficzna

Enolaza neurospecyficzna (NSE) jest jednym z 5 izoenzymów enzymu glikolitycznego, enolazy. Enzym ten jest uwalniany do płynu mózgowo – rdzeniowego w przypadku uszkodzenia tkanki nerwowej. Nowotwory wywodzące się z tkanki nerwowej lub neuroendokrynej mogą uwalniać NSE do krwi.

Uważa się, że NSE jest markerem prognostycznym u pacjentów zarówno w stadiach zlokalizowanych, jak i rozsianych, przy czym wyższy poziom markera wskazuje na gorsze rokowanie, zwłaszcza w postaciach rozsianych. Podwyższone stężenie NSE w trakcie leczenia bądź po jego zakończeniu może świadczyć o progresji choroby. [8,18]

1.12.2. Ferrytyna

Ferrytyna w warunkach fizjologicznych jest białkiem wiążącym żelazo. W nieco zmienionej postaci może być czynnie uwalniana przez tkanki NBL.

Podwyższone stężenie ferrytyny świadczy o aktywnie rosnącym NBL, jest powszechnie uznawane za niekorzystny czynnik prognostyczny. [36]

1.12.3. Dehydrogenaza mleczanowa

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jest enzymem powszechnie występującym w organizmie, a wzrost jej poziomu świadczy o zwiększonej destrukcji tkanek.

Stężenie dehydrogenazy mleczanowej jest markerem niespecyficznym, charakterystycznym dla szybkiego wzrostu i rozpadu komórek. Podwyższenie stężenia LDH w surowicy świadczy o dużej masie guza i jest również czynnikiem niekorzystnej prognozy. [18,80]

1.12.4. Poziom katecholamin i ich metabolitów w surowicy

Aminokwasami, z których powstają katecholaminy są fenyloalanina i tyrozyna, a ich prekursorem jest dopamina. W komórkach NBL stwierdza się brak enzymu konwertującego norepinefrynę do epinefryny, który jest obecny w komórkach chromatofilnych nadnerczy i feochromocytoza; dopamina jest więc przekształcana głównie w kwas homowanilinowy, a norepinefryna i epinefryna w kwas wanilinomigdałowy. Oznaczenie stężenia katecholamin pozwala na ocenę aktywności guza i monitorowanie leczenia. Podwyższone stężenie katecholamin nie stanowi niezależnego czynnika prognostycznego. [13,17,18]

2. Cel i uzasadnienie pracy

2.1. Cel pracy

Celem pracy jest:

1. ocena ekspresji białka Id2 w komórkach neuroblastoma pochodzących z guzów przechowywanych w blockach parafinowych pobranych od pacjenta
2. ocena znaczenia prognostycznego ekspresji białka Id2
3. retrospektywna ocena częstości występowania znanych czynników prognostycznych i markerów choroby u pacjentów leczonych z powodu neuroblastoma w Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej PAIP w Krakowie w latach 1991-2005:
 - biochemicznych: ferrytyna, LDH i NSE w osoczu, stężenie amin katecholowych i ich metabolitów w moczu
 - genetycznych: amplifikacja MYCN, delecja 1p, gain 17q
 - histopatologicznych
 - wieku dziecka w momencie zachorowania
 - stopnia zaawansowania choroby
4. ocena wpływu badanych czynników na wyniki leczenia
5. ocena korelacji ekspresji białka Id2 z innymi czynnikami prognostycznymi.

2.2. Uzasadnienie pracy

Zwojak zarodkowy współczulny jest jednym z najczęstszych oraz najbardziej intensywnie badanych nowotworów i chociaż znanych jest już wiele czynników prognostycznych, precyzyjne określenie rokowania w tej chorobie nadal nie jest możliwe. Pomimo intensywnego leczenia, wyleczalność, zwłaszcza w grupie wysokiego ryzyka, pozostaje bardzo niska (ok. 30%), niezależnie od prób wprowadzania nowych, eksperymentalnych metod terapii.

Specyficzne zachowanie NBL, od spontanicznej regresji do bardzo złośliwego przebiegu, a także występowanie zwłaszcza u nastolatków progresji o powolnym przebiegu sprawia, że ten nowotwór wydaje się być dobrym modelem do poznania ogólnych mechanizmów onkogenezy.

Ocena ekspresji białka Id2 może pozwolić na ustalenie nowych, istotnych czynników prognostycznych, a także, ze względu na jego specyficzną wielokierunkową funkcję w komórce, przyczynić się do poznania mechanizmów odpowiadających za powstanie i progresję NBL. Ponadto, ze względu na kluczową rolę białka Id2 w proliferacji i różnicowaniu komórek, zahamowanie funkcji Id2 może stanowić potencjalny cel terapeutyczny, pozwalający na jednoczesny wpływ na kilka istotnych mechanizmów odpowiadających za utrzymanie złośliwego fenotypu nowotworu.

3. Pacjenci i metody

3.1. Charakterystyka pacjentów

Badaniem objęto 60 spośród 100 pacjentów leczonych w Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii Collegium Medicum UJ w Krakowie w latach 1991-2005, u których był zachowany materiał guza, utrwalony w parafinie. Dane kliniczne opracowano na podstawie dostępnej dokumentacji medycznej. U wszystkich analizowanych dzieci diagnoza została postawiona na podstawie badania histopatologicznego tkanki guza lub oceny cytologicznej przerzutów NBL w szpiku kostnym oraz stwierdzenia podwyższonego poziomu katecholamin i/lub ich metabolitów w moczu. W celu oceny rozległości choroby u wszystkich pacjentów wykonano badania obrazowe (tomografia komputerowa, USG) okolicy guza pierwotnego i okolic, w których potencjalnie mogą występować przerzuty oraz biopsję i trepanobiopsję szpiku kostnego. W celu oceny zajęcia kości wykonywano scyntygrafię z użyciem technetu lub scyntygrafię całego ciała z zastosowaniem MIBG. Charakterystykę pacjentów przedstawiono w tabeli (Tabela 7).

W całej badanej grupie było 34 chłopców (57%) i 26 dziewcząt (43%). Wiek pacjentów w chwili rozpoznania choroby wahał się od 10 dni do 14 lat (mediana 24,5 miesiąca). W grupie wiekowej do 1. r.ż. i powyżej 10. r.ż. było odpowiednio: 19 (31,7%) i 41 (68,3%) dzieci. W żadnym przypadku nie stwierdzono 1. stopnia zaawansowania choroby. Najliczniejszą grupę – 31 (51,7%) stanowili pacjenci w 4. stopniu zaawansowania. U wszystkich dzieci wykonano (prospektywnie lub retrospektywnie) badania cytogenetyczne w kierunku amplifikacji genu MYCN, delecji 1p i nadmiaru 17q. Amplifikację genu MYCN stwierdzono łącznie u 12 (20%) dzieci. W dwóch przypadkach nie uzyskano wyniku. Delecję 1p i nadmiar 17q stwierdzono odpowiednio u: 14 (23,3%) i 15 (25%) pacjentów, a wyników nie uzyskano odpowiednio w: 29 (48,4%) i 38 (63,3%) przypadkach. W guzach 4 chorych stwierdzono równoczesne występowanie zarówno amplifikacji genu MYCN, jak i delecji 1p i nadmiaru 17q. U wszystkich dzieci (prospektywnie lub retrospektywnie) podjęto próbę oceny budowy histopatologicznej guza. Korzystną i niekorzystną budowę histopatologiczną wykazano odpowiednio u: 13 (26,7%) i 36 (60%). W 8 przypadkach ocena nie była możliwa. W całej badanej grupie LDH oznaczono u 56 pacjentów. Zakres stężenia tego markera wynosił 207-22 5000 (średnia 2581) U/l. U 26 dzieci stężenie LDH przekraczało wartość 3 x norma dla wieku. Ferrytynę w czasie diagnozowania oznaczono u 32 chorych (zakres 13,9-1558, średnia 253,5 µg/l), w tym u 29 (48,3%) stężenie przekraczało wartość 3 x norma dla wieku. NSE oznaczono wstępnie tylko u 11 pacjentów (zakres 12,0-380,7, średnia 376,4 ng/ml), w tym u 7 (11,7%) stężenie było wyższe od wartości 3x norma dla wieku. Dopamina była zbadana u 40 chorych, w tym 16 miało wartość przekraczającą 3x norma dla wieku. VMA i HVA oznaczono odpowiednio u: 49 i 41 pacjentów, w tym stężenie powyżej 3 x norma dla wieku było przekroczone odpowiednio w: 33 i 26 przypadkach.

Tabela 7. Charakterystyka pacjentów z neuroblastoma (n=60)

Badany parametr			Liczba pacjentów (%) lub wartość badanego parametru
Płeć	Chłopcy		34 (57,0)
	Dziewczęta		26 (43,0)
Wiek (miesiące)	Zakres		0,3 – 169
	Mediana		24,5
	Liczba pacjentów powyżej 1. r.ż.		41 (68,3)
	Liczba pacjentów poniżej 1. r.ż.		19 (31,7)
	Liczba pacjentów poniżej 2. r.ż.		30 (50)
Stopień zaawansowania	1		0 (0,0)
	2		6 (10,0)
	3		17 (28,3)
	4		31 (51,7)
	4s		6 (10,0)
Amplifikacja MYCN	Obecna	Ocena przy diagnozie	8 (13,3)
		Ocena retrospektywna	4 (6,7)
	Nieobecna	Ocena przy diagnozie	22 (36,7)
		Ocena retrospektywna	24 (40,0)
	Brak wyniku		2 (3,3)
Delecja 1p	Obecna		14 (23,3)
	Nieobecna		17 (28,3)
	Brak wyniku		29 (48,4)
Nadmiar 17q	Obecny		15 (25,0)
	Nieobecny		7 (11,7)
	Brak wyniku		38 (63,3)

Budowa histologiczna wg klasyfikacji INPC	Korzystna	Ocena przy diagnozie	3 (5,0)
		Ocena retrospektywna	13 (21,7)
	Niekorzystna	Ocena przy diagnozie	11 (18,3)
		Ocena retrospektywna	25 (41,7)
	Brak wyniku		8 (13,3)
LDH	Zakres (U/l)		207,0 – 22 500
	Średnia (U/l)		2581,0
	Oznaczono stężenie n=57 (95%)	Podwyższone stężenie	42 (73,7)
		LDH powyżej 3x norma dla wieku	26 (45,6)
		Prawidłowe stężenie	15 (26,3)
	Nie oceniono		3 (5,0)
Ferrytyna	Zakres (µg/l)		13,9 - 1558
	Średnia (µg/l)		253,5
	Oznaczono stężenie n=42 (70%)	Podwyższone stężenie	30 (71,4)
		Ferrytyna powyżej 3x norma dla wieku	29 (69,0)
		Prawidłowe stężenie	12 (28,6)
	Nie oceniono		18 (30)
NSE	Zakres (ng/ml)		12,0 – 380,7
	Średnia (ng/ml)		376,4
	Oznaczono stężenie n=11 (18,3%)	Podwyższone stężenie	9 (81,8)
		NSE powyżej 3x norma dla wieku	8 (72,7)

		Prawidłowe stężenie	2 (18,2)
	Nie oceniono		49 (81,7)
Dopamina	Oznaczono stężenie n=40 (82,5%)	Podwyższone stężenie	33 (82,5)
		Dopamina powyżej 3x norma dla wieku	16 (40,0)
		Prawidłowe stężenie	7 (17,5)
	Nie oceniono		20 (33,3)
VMA	Oznaczono stężenie n=49 (81,7%)	Podwyższone stężenie	40 (81,6)
		VMA powyżej 3x norma dla wieku	33 (67,3)
		Prawidłowe stężenie	9 (18,4)
	Nie oceniono		11 (18,3)
HVA	Oznaczono stężenie n=41 (68,3%)	Podwyższone stężenie	33 (80,5)
		HVA powyżej 3x norma dla wieku	26 (63,4)
		Prawidłowe stężenie	8 (19,5)
	Nie oceniono		19 (31,7)

3.2. Leczenie

Intensywność terapii w NBL zależy od wieku dziecka, stopnia zaawansowania i cech biologicznych choroby. [4,5,94]

- **Dzieci poniżej 1. r.ż.**

Postępowanie terapeutyczne u noworodków i niemowląt zależy od stopnia zaawansowania choroby, możliwości leczenia chirurgicznego oraz od tego, czy jest obecna amplifikacja genu MYCN.

W 1. stopniu zaawansowania choroby bez i z amplifikacją genu MYCN zaleca się usunięcie guza jako jedyną metodę leczenia. W przypadku bezobjawowego guza nadnercza stwierdzonego prenatalnie lub u niemowlęcia do 90. dnia życia, zaleca się postępowanie ograniczone do obserwacji uwzględniającej również kontrolne badania obrazowe i biochemiczne. Jeżeli wystąpią niepokojące objawy (np.

zwiększenie objętości guza, zwiększenie stężenia katecholamin) lub guz utrzymuje się jeszcze po ukończeniu 2. r.ż., to rekomenduje się leczenie chirurgiczne.

U niemowląt w 2. i 3. stopniu zaawansowania, u których stwierdzi się operacyjny guz bez obecności amplifikacji genu MYCN, chirurgiczne usunięcie zmiany zwykle jest wystarczające dla skutecznej kontroli choroby. W przypadku nieoperacyjnego guza w 2. lub 3. stopniu zaawansowania zaleca się dwulekową chemioterapię CO (cyklofosfamid, winkrystyna). Gdy po 2 cyklach uzyska się dobrą lub zadowalającą odpowiedź na leczenie, to wykonuje się resekcję guza, a potem ewentualnie kontynuuje się tę samą chemioterapię. Natomiast w przypadku niezadowalającej odpowiedzi na zastosowaną terapię lub progresji choroby, należy wprowadzić bardziej intensywną chemioterapię VP-Carbo (etopozyd, karboplatyna) lub CADO (cyklofosfamid, doksorubicyna, winkrystyna) i dopiero później podjąć próbę usunięcia pozostałości guza.

W 4s. i w 4. stopniu zaawansowania z nieobecną amplifikacją genu MYCN bez zajęcia kości, opłucnej, płuc lub OUN sposób leczenia niemowląt zależy od stopnia wydolności funkcji narządów takich, jak: płuca, nerki, przewód pokarmowy, wątroba oraz drożności żyły prężnej dolnej (punktowa skala Philadelphia). W przypadku braku dysfunkcji narządów i amplifikacji genu MYCN zaleca się wyłącznie obserwację, a włączenie leczenia dopiero w przypadku progresji choroby. U niemowląt z NBL w 4. stopniu zaawansowania z zajęciem kości, OUN, płuc lub opłucnej, leczenie rozpoczyna się od chemioterapii VP -Carbo. Ocenę odpowiedzi na leczenie przeprowadza się po drugim cyklu. Dalsze postępowanie zależy od uzyskanych wyników.

W przypadku guza klepsydrowatego, powodującego ucisk na rdzeń kręgowy i korzonki nerwowe, należy niezwłocznie włączyć chemioterapię z lub bez radioterapii. Chemioterapia powoduje regresję guza bez ryzyka wystąpienia powikłań po chirurgicznej interwencji. Laminektomia u niemowląt łączy się z ryzykiem wystąpienia deformacji kręgosłupa i powinna być wykonywana tylko u dzieci, u których wystąpiły nagłe objawy neurologiczne.

U niemowląt z NBL w 1. stopniu zaawansowania z obecną amplifikacją genu MYCN, zaleca się wyłącznie zabieg chirurgiczny. Natomiast od 2006 r. europejski program leczenia dzieci z NBL zakłada włączenie niemowląt w 2.-4. stopniu zaawansowania ze stwierdzoną amplifikacją MYCN do protokołu dla grupy wysokiego ryzyka stosowanego u dzieci powyżej 1. r.ż.

Do 2002 r. nie było w Polsce opracowanego protokołu do leczenia niemowląt z NBL. W związku z tym stosowano leczenie w oparciu o dostępne dane z literatury, dostosowane do stopnia zaawansowania i stanu klinicznego, modyfikowane w zależności od odpowiedzi na leczenie. Od 2002 r. wszystkie niemowlęta z grupy standardowego ryzyka leczone są według europejskiego protokołu Infant-NBL-99, natomiast od 2006 r. niemowlęta z grupy wysokiego ryzyka (4. stopień zaawansowania z amplifikacją MYCN) według protokołu HR-NBL-1/ESIOP.

- **Dzieci powyżej 1 r.ż.**

Leczenie dzieci powyżej 1. r.ż. jest także zróżnicowane. W 1. stopniu zaawansowania planuje się wyłącznie leczenie chirurgiczne. Postępowanie terapeutyczne w 2. i 3. stopniu zaawansowania zależy od tego, czy guz jest operacyjny oraz od obecności amplifikacji genu MYCN. Jeżeli guz jest operacyjny

i nie stwierdzono amplifikacji genu MYCN, można po całkowitym usunięciu guza zakończyć leczenie, a chemioterapię wprowadzić w przypadku wznowy choroby.

W grupie pacjentów z guzem nieoperacyjnym rekomenduje się stosowanie naprzemiennych cykli chemioterapii CADO i VP-Carbo. Jeżeli po 2 cyklach chemioterapii nie uzyska się poprawy lub wystąpi progresja guza, to należy zmienić rodzaj chemioterapii. W przypadku zadowalającej odpowiedzi przeprowadza się kolejne dwa cykle chemioterapii, a następnie ponownie ocenia się stan choroby i weryfikuje kwalifikację do zabiegu operacyjnego. Po resekcji guza i zastosowaniu 2 kolejnych cykli chemioterapii, przeprowadza się kontrolne badania w celu podjęcia decyzji o zakończeniu leczenia.

Do grupy NBL o wysokim stopniu ryzyka kwalifikuje się dzieci powyżej 1. r.ż. wtedy, gdy występuje:

- rozszkana choroba (4. stopień zaawansowania, 40-50% wszystkich pacjentów)

lub

- 2. lub 3. stopień zaawansowania z amplifikacją onkogenu MYCN (około 3% wszystkich NBL).

Obecnie zalecany w Europie protokół leczenia dzieci z NBL wysokiego ryzyka składa się z kilku etapów: krótko trwającej intensywnej chemioterapii indukcyjnej, pobrania macierzystych komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej (PBSC), próby całkowitej resekcji guza pierwotnego, terapii mieloablacyjnej z następowym przetoczeniem komórek krwiotwórczych (SCT), a potem napromieniania miejsca, w którym był zlokalizowany guz pierwotny, a następnie przeprowadzenia tzw. terapii choroby resztkowej samą izotretynoiną (pochodna witaminy A, kwas all-trans-retinowy, 13-cis RA) lub w połączeniu z immunoterapią (przeciwciała anty-GD2). Chemioterapia indukcyjna COJEC składa się z powtarzanych co 10 dni ośmiu jedno- i dwudobowych cykli A, B i C:

Cykl A - winkrystyna $1,5 \text{ mg/m}^2$ (dawka maksymalna 2 mg), karboplatyna ($1 \times 750 \text{ mg/m}^2$) i etopozyd ($2 \times 175 \text{ mg/m}^2$) – stosowany dwukrotnie

Cykl B - winkrystyna ($1 \times 1,5 \text{ mg/m}^2$) i cisplatyna (80 mg/m^2 w 24-godzinny wlew i.v.) – stosowany czterokrotnie

Cykl C - winkrystyna ($1 \times 1,5 \text{ mg/m}^2$), etopozyd ($2 \times 175 \text{ mg/m}^2$) i cyklofosfamid ($2 \times 1050 \text{ mg/m}^2$) – stosowany czterokrotnie

W przypadku niezadowalającej odpowiedzi na leczenie indukcyjne zaleca się przed pobraniem komórek krwiotwórczych i zabiegiem operacyjnym przeprowadzenie chemioterapii TVD (topotekan, winkrystyna i daunorubicyna).

Celem zabiegu jest możliwie całkowite usunięcie guza pierwotnego. Próba resekcji powinna być wykonana po skończeniu chemioterapii indukcyjnej, o ile nie ma progresji guza lub badania obrazowe nie wykazują, że całkowite wycięcie prawdopodobnie będzie związane z ryzykiem zgonu lub ze znacznym okaleczeniem.

Komórki krwiotwórcze podawane są dożylnie w warunkach określonych protokołem mieloablacyjnym.

U wszystkich pacjentów po megachemioterapii i przeszczepieniu komórek krwiotwórczych, a przed leczeniem eliminującym chorobę resztkową, powinno się przeprowadzać napromienianie. Całkowita

dawka 21 Gy podawana jest na obszar odpowiadający przedoperacyjnej rozległości guza pierwotnego. Nie planuje się rutynowego napromieniania odległych przerzutów i podawania dodatkowych dawek napromieniania („boost”) na przetrwałe zmiany chorobowe po zastosowaniu chemioterapii z użyciem wysokich dawek leków.

W leczeniu choroby resztkowej stosowana jest terapia powodująca różnicowanie komórek NBL i immunoterapia. Wszyscy pacjenci otrzymują sześć cykli 13-cis RA. Lek ten, podawany doustnie, powinien być stosowany w dawce $160 \text{ mg/m}^2/\text{dobę}$ przez 14 dni, co 4 tygodnie, po zakończeniu napromieniania, w około 90. dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. 13-cis RA działa bezpośrednio na komórki NBL indukując ich różnicowanie lub śmierć na drodze apoptozy.

Skojarzone leczenie 13-cis RA i przeciwciał anti-GD2 prawdopodobnie działa synergistycznie i może bardziej skutecznie zniszczyć pozostałe komórki NBL. W naszym kraju dotąd nie prowadzono leczenia z użyciem przeciwciał anti-GD2. [4,5,94]

W naszym ośrodku do 2002 r. dzieci powyżej 1. r.ż. z grupy wysokiego ryzyka leczone były zgodnie z protokołem japońskim (tzw. chemioterapia „TOKIO”) [5], a później w tej grupie chorych stosowano terapię wg protokołu HR-NBL-1/ESIO [94]. Dzieci ze zlokalizowanym guzem nieoperacyjnym, bez amplifikacji genu MYCN początkowo leczone były wg protokołu japońskiego, a od 2002 r. rozpoczęto stosowanie programów europejskich. Po zmniejszeniu się guza przeprowadzano zabieg operacyjny i/lub radioterapię.

3.3. Retrospektywna ocena parametrów biochemicznych

W analizie uwzględniono wyniki badań biochemicznych wykonanych w Zakładzie Biochemii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie (stężenie dehydrogenazy mleczanowej i ferrytyny w surowicy, stężenie amin katecholowych i ich pochodnych w moczu) oraz Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie (poziom enolazy neurospecyficznej w surowicy). W przypadku LDH, ferrytyny i NSE analizowano zarówno średnie stężenie tych parametrów, jak i liczbę pacjentów z wartościami przekraczającymi trzykrotnie wartość normy (ogólnie przyjęte kryterium wskazujące na znamienne podwyższenie stężenia markerów). W przypadku katecholamin i ich metabolitów w moczu analizowano wyłącznie liczbę pacjentów z trzykrotnym podwyższeniem stężenia. Ze względu na zmiany metody i sposobu prezentacji wyników w analizowanym okresie porównanie średnich stężeń katecholamin nie było możliwe.

3.4. Ocena histopatologiczna

Wszystkie wycinki guza ponownie poddano weryfikacji histopatologicznej i oceniono według Międzynarodowej Klasyfikacji Patologicznej Neuroblastoma (INPC). Weryfikacja została przeprowadzona przez dr med. Przemysława Kluge z Zakładu Patologii Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie (Rozdział 12.1). Zgodnie z klasyfikacją INPC, pacjentów podzielono na grupy o korzystnej i niekorzystnej budowie histopatologicznej guza. W 8 przypadkach ocena klasyfikacji INPC była niemożliwa ze względu na złą jakość materiału.

3.5. Ocena ekspresji białka Id2

Ocenę ekspresji białka Id2 wykonano metodą immunohistochemiczną w Zakładzie Patomorfologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie.

Barwienia wykonano z zastosowaniem króliczych przeciwciał anti-Id2 firmy Zymed Laboratories Inc. (przeznaczonych do stosowania w parafinie) na szkiełkach silanizowanych. Zgodnie z zaleceniami producenta, doświadczalnie ustalono optymalne rozcieńczenie przeciwciała pierwotnego na 1:100, a czas inkubacji na 45 minut. Zastosowano system detekcji oparty na peroksydazie EnVision+System-HRP® firmy DakoCytomation do stosowania z podstawowymi przeciwciałami króliczymi do oceny w mikroskopie świetlnym tkanek zatopionych w parafinie. Procedurę barwienia przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producentów.

Jako kontrolę pozytywną wykorzystano linię komórkową neuroblastoma SKNSH o znanej wysokiej ekspresji Id2. Linię komórkową otrzymano dzięki uprzejmości dr Katrien Swerts, Ghent University, Belgia. Jako drugą kontrolę pozytywną zastosowano tkankę prawidłowego jądra męskiego zatopioną w parafinie. Podwójny system kontroli podyktowany był zapewnieniem kontroli ekspresji białka w warunkach identycznych z ocenianymi (tkanka jądra, w odróżnieniu od linii komórkowej, podlegała identycznym procedurom deparafinizacji i odblokowania antygenu jak tkanka guza). W kontroli negatywnej nie dodawano przeciwciała pierwotnego.

Ekspresję białka Id2 oceniano w materiale guza uznanym za reprezentatywny, pobranym w czasie zabiegu operacyjnego (resekcja lub biopsja otwarta). Badano poziom ekspresji białka Id2 na podstawie odniesienia do poziomu ekspresji białka w kontroli. Ekspresję mniej intensywną niż w kontroli uznano za słabą, a ekspresję minimum na poziomie kontroli – za silną. Ponadto obliczono odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 w reprezentatywnym obszarze preparatu. Zależnie od tego, czy ekspresja białka Id2 była jednolita w całym preparacie, czy też heterogenna, odsetek pozytywnych komórek wyliczano w 3–10 polach widzenia, z uwzględnieniem co najmniej 100 komórek NBL. Ekspresja białka Id2 była oceniana w mikroskopie świetlnym, (powiększenie 10x, 20x i 40x).

3.6. Retrospektywne badanie cytogenetyczne metodą immunofluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*

U wszystkich pacjentów, którzy nie mieli wstępnie badań genetycznych, zwłaszcza oceny amplifikacji MYCN, wykonano badania metodą immunofluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* na materiale guza utrwalonego w parafinie. Oprócz badania w kierunku amplifikacji genu MYCN podjęto również próbę oceny delekcji 1p36 i nadmiaru materiału genetycznego 17q.

Do barwień immunofluorescencyjnych wykorzystano komercyjnie dostępne sondy firmy Qbiogene, przeznaczone również do badań genetycznych w tkance zatopionej w parafinie:

- N-myc/Alpha Satellite 2 (2p24) dla amplifikacji MYCN
- 1p26 Midi-Satellite (D1Z2) wraz z sondą referencyjną 1q dla delekcji 1p36

- HER-2/neu (ERBB2)/Alpha Satellite dla nadmiaru 17q.

Metoda zaproponowana przez producenta pomimo możliwości zastosowania sond komercyjnych na materiale utrwalonym w parafinie, wymagała pewnych modyfikacji. Wprowadzone zmiany metody wykonano w laboratorium *Children's Cancer Research Institute* (CCRI) w Wiedniu, Austria, pod kierunkiem prof. Petera Ambrosa (europejskie laboratorium referencyjne dla badań genetycznych w NBL u dzieci).

Metodyka oznaczeń po wprowadzonych modyfikacjach:

- Deparafinizacja: 30 minut w temperaturze 56°C na płycie, następnie ksylen – 30 minut i płukanie w metanolu (od 100% do 70%), następnie ponowne przedłużone odwadnianie w metanolu
- Trawienie w NaSCN w 80°C
- Ocena w mikroskopie świetlnym, trawienie pepsyną do uzyskania stopnia wytrawienia tkanek umożliwiającego założenie sondy
- Dalsza procedura zgodna z zaleceniami producenta.

Wszystkie sondy znakowane były fitocjaniną (pobudzenie 495 nm, emisja 520 nm, kolor zielony) lub rodaminą (pobudzenie 565 nm, emisja 590 nm, kolor czerwony). Jądra komórkowe barwione były DAPI.

Ocenę zaburzeń genetycznych wykonano w mikroskopie immunofluorescencyjnym firmy Zeiss. Analizę komputerową wykonano za pomocą oprogramowania Metasystems Isis®.

Zdjęcia wykonano za pomocą Metasystems Isis®, umożliwiające umieszczenie na fotografii wszystkich sygnałów z całego przekroju komórki (6 zdjęć co 0,1 µm).

Retrospektywną ocenę amplifikacji genu MYCN na materiale z bloczka parafinowego wykonano u 30 pacjentów. Uzyskanie wyników nie było możliwe w 2 przypadkach ze względu na znaczny stopień martwicy materiału. Retrospektywne badania w kierunku delecji 1p i nadmiaru materiału genetycznego 17q przeprowadzono odpowiednio u: 29 i 38 dzieci. Jednakże ze względu na trudności interpretacyjne wyników badań wykonywanych na materiale utrwalonym w parafinie, obarczonych ryzykiem utraty sygnałów związanych z możliwym przecięciem jądra komórkowego (ocena pojedynczych sygnałów na przekroju komórki, nie w całej komórce), w analizie uwzględniono wyłącznie wyniki badań wstępnie wykonanych w CCRI.

U większości pacjentów nie była możliwa ocena ploidii z powodu braku dostatecznej ilości materiału do wykonania retrospektywnych badań przy użyciu cytometrii przepływowej. Badanie to nie było również standardowo wykonywane w trakcie rutynowej diagnostyki.

3.7. Analiza statystyczna

3.7.1. Metoda statystyczna

Obliczenia statystyczne przeprowadzono za pomocą pakietu Statistica®.

Badane cechy poddano wstępnej analizie statystycznej. Do analiz porównawczych jednoczynnikowych wykorzystano testy: U Manna Whitneya, Chi-kwadrat i dokładny test Fishera. Zastosowano również wieloczynnikowe analizy statystyczne. Do wyodrębnienia czynników istotnie wpływających na występowanie niepowodzeń leczenia użyto regresji logistycznej. Natomiast do analizy wpływu badanych cech na przeżycie (całkowite, wolne od progresji i wznowy choroby) zastosowano model regresyjny Coxa (model proporcjonalnego hazardu Coxa).

Obliczenia przeprowadzane były przez wprowadzenie danych w postaci cech ciągłych lub dyskretnych (kodowane przedziały). Zastosowano metodę krokową włączania zmiennych do modelu regresyjnego. Dodatkowe analizy przeprowadzono dla parametrów, które miały istotny wpływ na czas przeżycia i występowanie niepowodzeń leczenia. W poszukiwaniu punktu największej zmiany w prawdopodobieństwie wystąpienia niepowodzenia terapii posłużono się krzywą logistyczną.

Krzywe przeżycia oszacowano metodą Kaplana–Meiera. Różnice między krzywymi oceniano z zastosowaniem testu log-rank.

Jako poziom istotności przyjęto wartość $p=0,05$. W przypadku różnic stwierdzanych przy wartości p między 0,05-0,1 wyniki interpretowano jako istnienie trendu w kierunku wzrostu lub obniżenia ryzyka wystąpienia ocenianego wydarzenia.

3.7.2. Charakterystyka przeprowadzonych analiz

Analizowano następujące punkty końcowe:

- Czas przeżycia całkowitego (OS, *overall survival*) obliczano od daty rozpoczęcia leczenia do daty zakończenia obserwacji lub zgonu. W analizie uwzględniono wyłącznie zgony bezpośrednio spowodowane NBL.
- Czas przeżycia wolnego od zdarzeń niekorzystnych (EFS, *event free survival*) obliczano od daty rozpoczęcia leczenia do daty zakończenia obserwacji lub wystąpienia niekorzystnego zdarzenia (wstępna progresja, wznowa, zgon z powodu NBL lub z powikłań)
- Czas przeżycia wolnego od choroby (DFS, *disease free survival*) obliczano od daty rozpoczęcia leczenia do daty zakończenia obserwacji lub wystąpienia wznowy (u pacjentów, którzy uzyskali wcześniej remisję całkowitą) lub progresji choroby (u pacjentów bez remisji choroby).

Ze względu na często występujące trudności z precyzyjnym ustaleniem czasu uzyskania remisji całkowitej (RC) nie analizowano czasu przeżycia wolnego od wznowy choroby (RFS, *relapse free survival*).

Kryteria oceny odpowiedzi na leczenie przedstawiono w tabeli (Tabela 3) (Rozdział 1.4).

Oprócz analiz czasów przeżycia w odniesieniu do intensywności ekspresji białka Id2 i odsetka komórek z obecną ekspresją tego białka, wykonano analizy przeżycia dla całej grupy pacjentów i w zależności od następujących uznanych czynników rokowniczych:

- Wiek
- Stopień zaawansowania choroby
- Obecność amplifikacji MYCN
- Obecność delecji 1p36
- Obecność nadmiaru długiego ramienia chromosomu 17
- Budowa histopatologiczna.

W celu zwiększenia wiarygodności oceny, preparaty tkanek guza umieszczone były na szkiełkach zakodowanych za pomocą numerów.

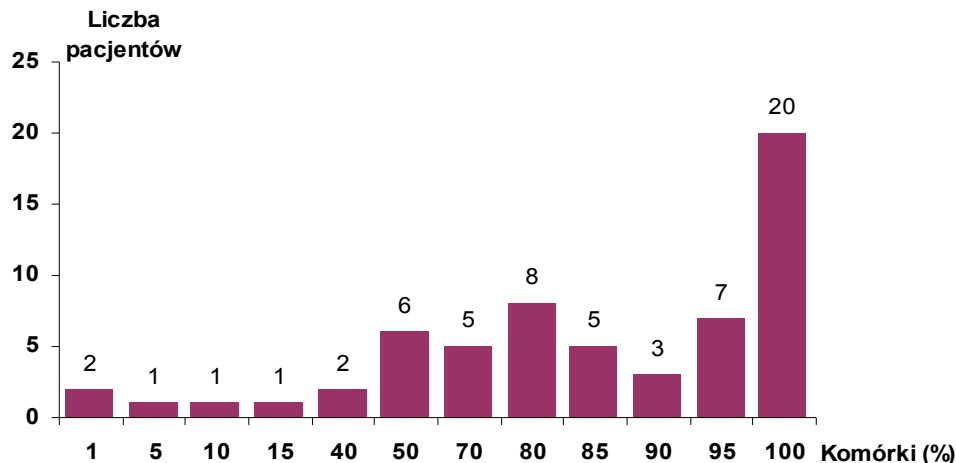
Obserwacje zakończono 31.03.2008 r.

4. Wyniki

4.1. Wyniki własnych badań laboratoryjnych

Ekspresję białka Id2 wykazano we wszystkich 60 analizowanych guzach. Intensywność ekspresji określono jako wysoką lub niską odpowiednio u: 50 i 10 pacjentów na podstawie nasilenia reakcji w odniesieniu do kontroli (Rysunek 53, Rysunek 54). Ponadto obliczano odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2. Przyjęto, że wynik pozytywny oznacza każdą ekspresję białka Id2, bez względu na odsetek komórek NBL z obecną ekspresją. Uwzględniając wyniki badań Lasorella i wsp. zaplanowano również analizy z punktem odcięcia na poziomie 25% komórek pozytywnych, ale ze względu na bardzo niską liczbę pacjentów z ekspresją białka Id2, obecną w mniej niż 25% komórek (n=5), nie wykonano analiz porównawczych. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 w analizowanych preparatach wahał się od 1–100% (średnia: 77,7%, mediana: 85%). Liczbę przypadków w odpowiednich podgrupach przedstawiono na rysunku (Rysunek 4). Najliczniejszą podgrupę - 27 (45%) pacjentów stanowili chorzy, u których stwierdzono ekspresję białka Id2 w ponad 90% komórek NBL. Natomiast grupy dotyczące niższych odsetków pozytywnych komórek NBL, obejmowały 1-8 dzieci, z tym, że w przedziale 16-39% nie było żadnego pacjenta. Reprezentatywną dokumentację zdjęciową preparatów wraz z opisem przedstawiono w Rozdziale 12.3.

Rysunek 4. Odsetek komórek z obecną ekspresją białka Id2 w całej grupie pacjentów



U 30 pacjentów wykonano retrospektywnie ocenę amplifikacji onkogenu MYCN metodą FISH na materiale z bloczka parafinowego. U 4 pacjentów stwierdzono obecność amplifikacji MYCN, u 24 pacjentów nie stwierdzono tej nieprawidłowości. Uzyskanie wyników nie było możliwe w 2 przypadkach ze względu na znaczny stopień martwicy materiału (Tabela 7). Wszystkie wyniki zweryfikowano w CCRI. Reprezentatywną dokumentację zdjęciową preparatów wraz z opisem przedstawiono w Rozdziale 12.2.

Retrospektywne badania w kierunku delekcji 1p i nadmiaru materiału genetycznego 17q przeprowadzono odpowiednio u: 29 i 38 dzieci. Jednakże ze względu na trudności interpretacyjne wyników badań wykonywanych na materiale utrwalonym w parafinie, obarczonych ryzykiem utraty

sygnałów związanych z możliwym przecięciem jądra komórkowego (ocena pojedynczych sygnałów na przekroju komórki, nie w całej komórce), w analizie uwzględniono wyłącznie wyniki badań wstępnie wykonanych w CCRI. Analiza wykonywana na przekrojach jąder komórkowych utrudnia jednoznaczną ocenę delecji i pojedynczych kopii dodatkowych ramion chromosomów.

4.2. Analiza wpływu wybranych czynników prognostycznych na występowanie zgonów i niepowodzeń leczenia oraz na czas przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od choroby

1. Wiek pacjenta

Przedstawiono wyniki badań nad częstością występowania zgonów i niepowodzeń terapii (wstępne progresje i wznowy choroby) oraz analizy odpowiednich krzywych przeżycia dla pacjentów powyżej i poniżej 1. r.ż.

Ocenie poddano 60 pacjentów, w tym 19 dzieci poniżej 1. r.ż. i 41 dzieci powyżej 1 r.ż.

• Zgony i przeżycie całkowite

W badanej grupie zmarło łącznie 29 pacjentów (Rysunek 5), w tym 23 z powodu NBL

W analizie z zastosowaniem regresji logistycznej (Tabela 8) wiek w sposób istotny statystycznie wpływał na występowanie zgonów spowodowanych bezpośrednio NBL ($p=0,01$). Na podstawie analizy krzywej regresji (Rysunek 73) nie udało się jednoznacznie ustalić wieku granicznego, przy którym w sposób znamieny wzrastałoby ryzyko wystąpienia zgonu w badanej grupie. Dlatego na podstawie danych z literatury przyjęto 12 miesięcy jako wiek, w którym w sposób znamieny wzrasta ryzyko zgonu spowodowanego NBL [8,17,25,32].

Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera wykazano statystycznie znamienne częstsze występowanie zgonów spowodowanych NBL u pacjentów powyżej 1. r.ż. ($p=0,01$).

W grupie 19 dzieci poniżej 1. r.ż. stwierdzono 4 zgony, w tym 3 (15,8%) z powodu NBL. W przypadku wystąpienia zgonu z powodu NBL czas przeżycia wynosił 2,5–9,5 (mediana 7,2) miesiąca. Jedno dziecko (5,3%) zmarło z powodu drugiego nowotworu, ostrej białaczki szpikowej (), 22,4 miesiąca od rozpoznania NBL. Żyje 15 pacjentów 28,4–177,3 (mediana 91,5) miesiąca od rozpoznania. Czas obserwacji dla całej grupy dzieci poniżej 1. r.ż. wynosił 2,5–177,3 (mediana 89,4) miesiąca. Krzywa OS dla zgonów z powodu NBL (Rysunek 6) osiągnęła *plateau* po 22 miesiącach od rozpoznania NBL.

W grupie 41 pacjentów powyżej 1. r.ż. było 25 zgonów, w tym 20 (48,8%) z powodu NBL. Czas przeżycia dla dzieci zmarłych z powodu NBL wynosił 8,4–63,9 (mediana 20,8) miesiąca. Pięcioro (12,2%) chorych zmarło z powodu powikłań w czasie 5,1–133 (mediana 21,4) miesięcy od rozpoznania choroby (Tabela 9). Żyje 16 pacjentów 31,4–149,8 (mediana 73,93) miesiąca od rozpoznania. Czas obserwacji dla całej grupy dzieci powyżej 1. r.ż. wynosił 5,0–133,2 (mediana 40,2) miesiąca. Krzywa OS dla zgonów z powodu NBL (Rysunek 6) osiągnęła *plateau* po 62 miesiącach.

Rysunek 5. Występowanie zgonów (niezależnie od przyczyny) u pacjentów z NBL w dwóch grupach wiekowych (poniżej i powyżej 1. r.ż.)

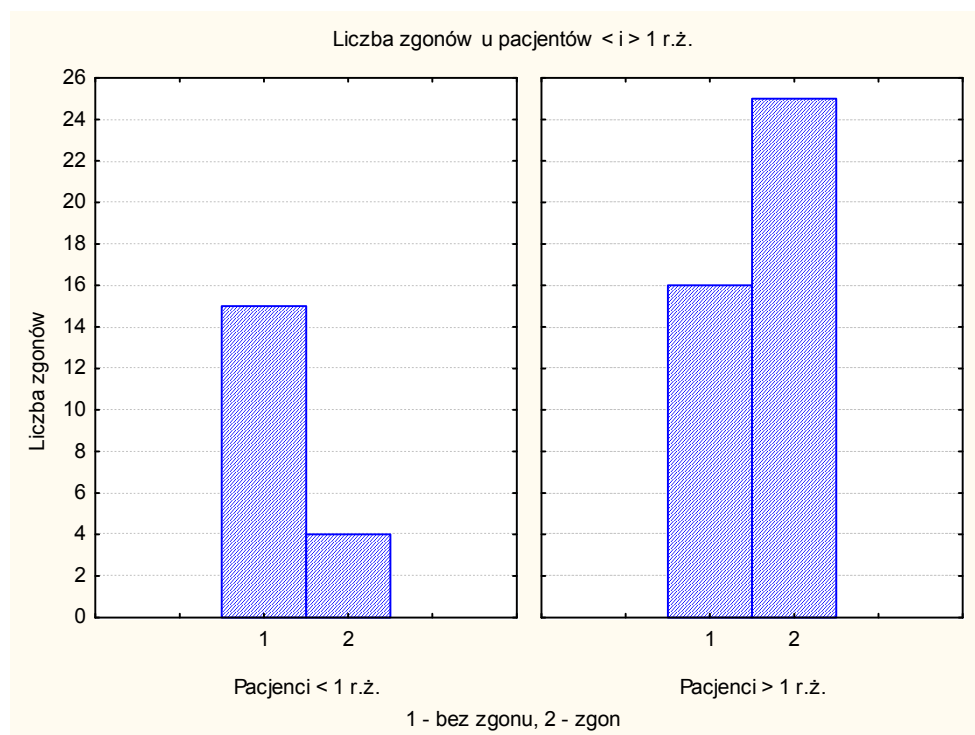


Tabela 8. Występowanie zgonów z powodu NBL w zależności od wieku pacjenta

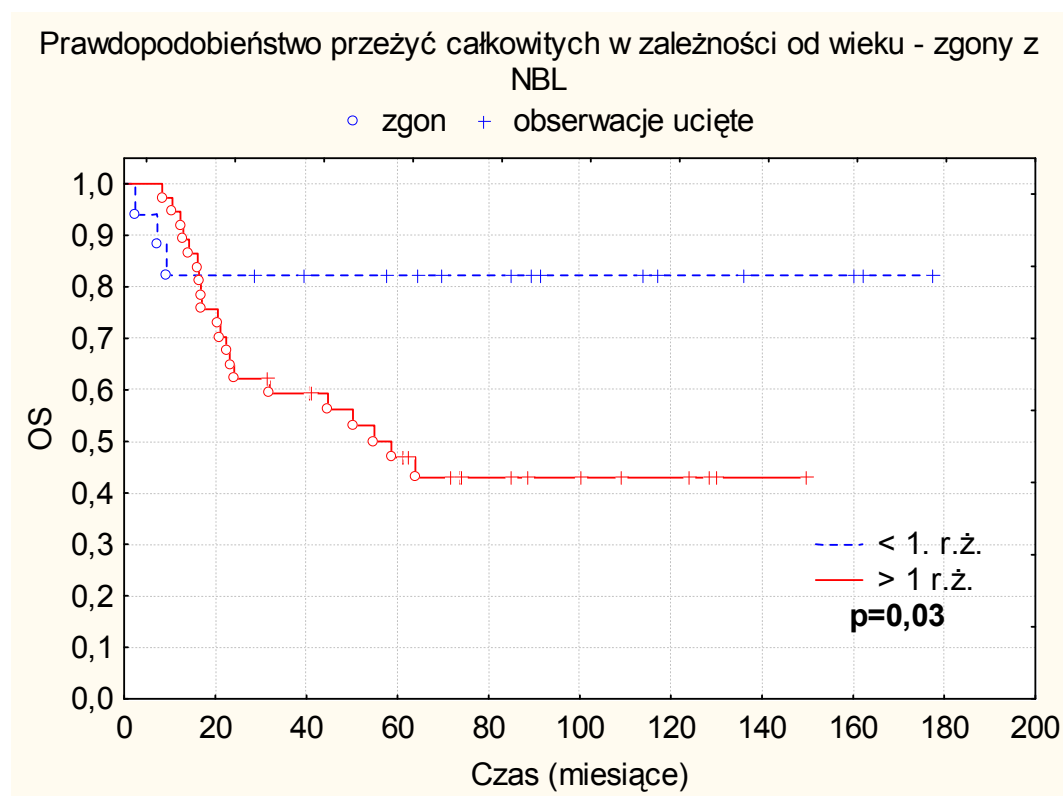
Badany parametr: wiek	Beta	SE (beta)	Chi ²	p
Zgon z powodu NBL	-0,03	0,01	5,98	0,01

Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS dla niemowląt wynosiło 0,82, a dla pacjentów powyżej 1. r.ż. odpowiednio 0,6 i 0,47 (Rysunek 6). Różnica między grupami była znamienna statystycznie ($p=0,03$).

Tabela 9. Przyczyny zgonów z powikłań u pacjentów poniżej i powyżej 1. r.ż.

Badany parametr	Liczba dzieci	Przyczyna zgonu	Stopień zaawansowania	Etap choroby (NBL) w czasie zgonu	Czas przeżycia (miesiące)
Wiek poniżej 1. r.ż	1	Drugi nowotwór (AML)	4s	I remisja całkowita	22,4
Wiek powyżej 1. r.ż	5	Krwawienie do OUN	4	I remisja częściowa	5,1
		Zakażenie (ospa wietrzna)	4	I remisja częściowa	27,9
		Niewydolność wielonarządowa w przebiegu chemioterapii	3	I remisja częściowa	10,3
		Niewydolność wielonarządowa w przebiegu chemioterapii	4	I remisja częściowa	21,4
		Niewydolność wielonarządowa jako powikłanie zabiegu	2	II remisja częściowa	133,2

Rysunek 6. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z powodu NBL) u dzieci NBL w zależności od wieku pacjentów (poniżej i powyżej 1. r.ż.)



- **Niepowodzenia leczenia i przeżycie wolne od choroby**

Niepowodzenie leczenia, wstępną progresję (n=12) lub wznowę (n=20) choroby obserwowano łącznie u 31 pacjentów.

W analizie regresji logistycznej (Tabela 10) wiek w sposób istotny statystycznie wpływał na występowanie niepowodzenia leczenia ($p=0,00008$). Na podstawie analizy krzywej regresji (Rysunek 74) nie udało się jednoznacznie w badanej grupie ustalić wieku granicznego, przy którym w sposób znamieny wzrastałoby ryzyko wystąpienia wznowy lub progresji choroby. Dlatego na podstawie danych z literatury [8,17,25,32] przyjęto 12 miesięcy jako wiek, w którym w sposób znamieny wzrasta ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia.

Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera wykazano statystycznie znamienne częstsze występowanie niepowodzenia leczenia u pacjentów powyżej 1 r.ż. ($p=0,001$).

W grupie 19 dzieci poniżej 1. r.ż. stwierdzono 4 niepowodzenia leczenia (w tym wznowę u 1). Czas do wystąpienia wznowy lub progresji wynosił 0,5–7 (mediana 3,6) miesięcy. Niepowodzenie leczenia nie wystąpiło u 15 pacjentów (czas obserwacji 22,4–122,3 /mediana 90,4/ miesiąca), przy czym jeden pacjent zmarł z powodu drugiego nowotworu 22 miesiące od rozpoczęcia leczenia NBL. Czas obserwacji dla całej grupy dzieci poniżej 1. r.ż. wynosił 0,5–122,3 (mediana 89,4) miesiąca. Krzywa DFS (Rysunek 7) osiągnęła *plateau* po 7 miesiącach od rozpoznania NBL.

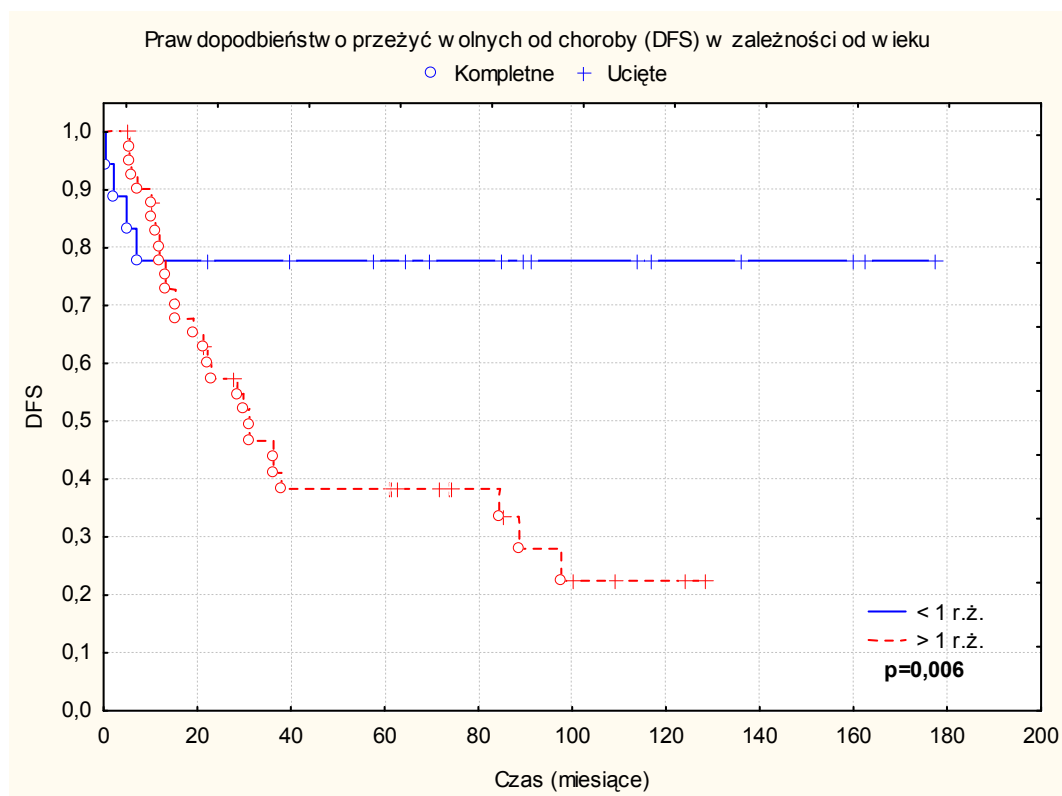
W grupie 41 pacjentów powyżej 1. r.ż. niepowodzenia leczenia wystąpiły u 27 pacjentów (w tym wznowy u 19). Czas do wystąpienia wznowy lub progresji wynosił 5,5–97,5 (mediana 20,3) miesiąca. Wznowa ani progresja nie wystąpiła u 14 pacjentów (czas obserwacji 5–124 /mediana 71,7/ miesięcy), ale 4 pacjentów zmarło z powodu powikłań 5–28 (mediana 10,9) miesięcy od rozpoczęcia leczenia NBL (Tabela 9). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci powyżej 1. r.ż. wynosił 5,0–124 (mediana 27,9) miesięcy. Krzywa DFS (Rysunek 7) osiągnęła *plateau* po 99 miesiącach od rozpoczęcie leczenia.

Tabela 10. Występowanie niepowodzenia leczenia w zależności od wieku pacjenta

Badany parametr	Beta	SE (beta)	Chi ²	p
Wiek	-0,06	0,02	11,3	0,00008

Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS dla niemowląt wynosiło 0,78, a dla pacjentów powyżej 1. r.ż. odpowiednio 0,46 i 0,38 (Rysunek 7). Różnica między grupami była znamienna statystycznie ($p=0,006$).

Rysunek 7. Krzywe przeżycia wolnego od choroby u dzieci z NBL w zależności od wieku pacjentów (poniżej i powyżej 1. r.ż.)



2. Stopień zaawansowania choroby

Przedstawiono wyniki badań nad częstością występowania zgonów i niepowodzeń terapii (wstępne progresje i wznowy choroby) oraz analizy odpowiednich krzywych przeżycia oddzielnie dla każdego stopnia zaawansowania oraz porównawczo dla stopnia 4. i pozostałych stopni zaawansowania (2., 3. i 4s).

Ocenie poddano 60 pacjentów, w tym 6, 17, 31 i 6, odpowiednio: w 2., 3., 4. i 4s stopniu zaawansowania.

• Zgony i przeżycia całkowite

Łącznie stwierdzono 29 zgonów, w tym 1, 5, 1 i 22 odpowiednio w: 2., 3., 4s i 4. stopniu zaawansowania. U pacjentów w 2. i 4s stopniu zaawansowania nie stwierdzono zgonów z powodu NBL, a w grupie dzieci w 3. i 4. stopniu zaawansowania z powodu NBL zmarło odpowiednio: 4 i 19 dzieci.

Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera wykazano statystycznie istotne częstsze występowanie zgonów spowodowanych NBL u pacjentów w 4. stopniu zaawansowania ($p=0,00001$) w porównaniu z niższymi stopniami zaawansowania choroby.

W grupie 31 pacjentów w 4. stopniu zaawansowania były 22 zgony, w tym 19 (61,3%) z powodu NBL. Czas przeżycia dla dzieci zmarłych z powodu NBL wynosił 2,5–63,9 (mediana 16,8) miesięcy. Troje (9,7%) dzieci zmarło z powodu powikłań w czasie 5,1–27,9 (mediana 21,4) miesięcy od rozpoznania choroby (Tabela 9). Żyje 9 pacjentów 31,4–130,1 (mediana 61,4) miesięcy. Czas obserwacji dla całej grupy w 4. stopniu zaawansowania wynosił 2,5–130,1 (mediana 24,2) miesięcy. Krzywa OS dla zgonów z powodu NBL (Rysunek 9) osiągnęła *plateau* po 64 miesiącach od rozpoznania NBL.

W grupie 29 pacjentów w innym niż 4. stopniu zaawansowania (2., 3. i 4s) było 7 zgonów, w tym 4 (13,8%) z powodu NBL. Czas przeżycia dla dzieci zmarłych z powodu NBL wynosił 9,1–50,2 (mediana 20,8) miesięcy. Troje (10,3%) dzieci zmarło z powodu powikłań w czasie 10,2–133,2 (mediana 22,4) miesięcy od rozpoznania choroby (Tabela 9). Żyje 22 pacjentów 28,4–177,3 (mediana 90,5) miesięcy. Czas obserwacji dla całej grupy w 4. stopniu zaawansowania wynosił 9,1–177,3 (mediana 84,9) miesięcy. Krzywa OS (Rysunek 9) osiągnęła *plateau* po 50 miesiącach od rozpoznania NBL.

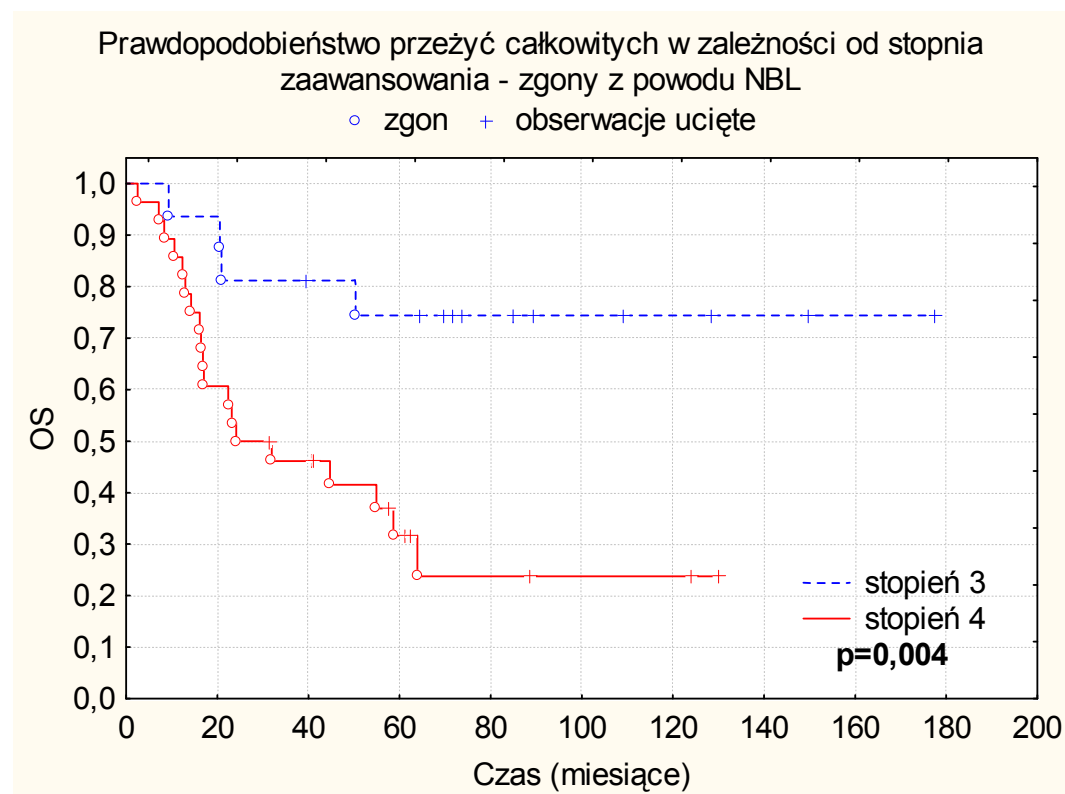
W grupie pacjentów w 2. i 4s stopniu zaawansowania nie stwierdzono zgonów z powodu NBL. W analizie zgonów z powodu NBL dla stopni zaawansowania 3. i 4. wykazano, że ponad 3-letnie i 5-letnie OS wynosiło odpowiednio: 0,81 i 0,74 oraz 0,46 i 0,32. Różnice między grupami były istotne statystycznie ($p=0,004$) (Rysunek 8). Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS (Rysunek 9) dla pacjentów w innym niż 4. stopniu zaawansowania (2, 3 i 4s) wynosiło odpowiednio: 0,88 i 0,84, a dla dzieci w 4. stopniu zaawansowania: 0,46 i 0,32. Różnica między grupami była istotna statystycznie ($p=0,00007$).

W przypadku zgonów z powodu NBL, prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS dla pacjentów powyżej 1. r.ż w 4. stopniu zaawansowania ($n=25$, w tym 17 zgonów z powodu NBL)

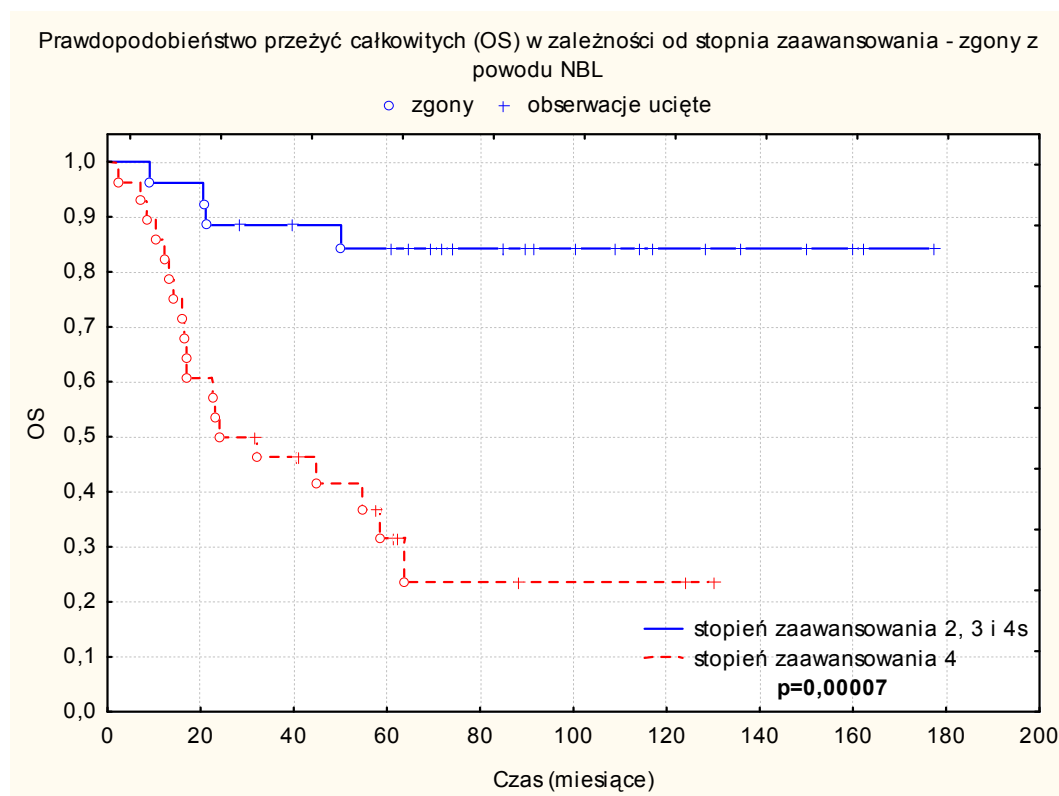
wynosiło odpowiednio: 0,48 i 0,32, a krzywa OS osiągnęła *plateau* po 50 miesiącach. Natomiast dla dzieci w 2. (n=2, bez zgonów z powodu NBL) i 3. (n=9, w tym 3 zgony z powodu NBL) stopniu zaawansowania prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS wynosiło odpowiednio: 0,82 i 0,73, a krzywa OS osiągnęła *plateau* po 64 miesiącach (Rysunek 85). Różnica między grupami była statystycznie istotna (p=0,01). Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera wykazano statystycznie istotne różnice w częstości występowania zgonów u pacjentów powyżej 1. r.ż. w zależności od stopnia zaawansowania (p=0,03). W analizie nie uwzględniono zgonów z powodu powikłań (n=5).

Wśród 3 dzieci poniżej 1. r.ż. w 4. stopniu zaawansowania, dwoje zmarło z powodu NBL. Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera wykazano istnienie trendu w kierunku wzrostu częstości występowania zgonów z NBL u pacjentów poniżej 1. r.ż. w 4. stopniu zaawansowania w porównaniu do stopnia 2., 3. i 4s (p=0,06). W analizie nie uwzględniono zgonów z powodu powikłań (n=1). Ze względu na małą liczebność grup pacjentów w 4. i 2. stopniu zaawansowania poniżej 1 r.ż. nie wykreślono krzywych przeżycia i nie oszacowano OS.

Rysunek 8. Krzywe przeżycia całkowitego w NBL dla wszystkich pacjentów w 3. i 4. stopniu zaawansowania



Rysunek 9. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z powodu NBL) dla wszystkich pacjentów w zależności od stopnia zaawansowania choroby (stopień 4. vs pozostałe)



- Niepowodzenia leczenia i przeżycia wolne od choroby**

Wśród 60 analizowanych pacjentów niepowodzenia leczenia (wstępna progresja lub wznowa) wystąpiły u 32, w tym w 2., 3., 4s i 4. stopniu zaawansowania odpowiednio u: 2, 5, 0 i 24 pacjentów.

Przy zastosowaniu testu χ^2 wykazano statystycznie znaczne częstsze występowanie niepowodzenia leczenia u pacjentów w 4. stopniu zaawansowania niż w innych stopniach zaawansowania (χ^2 17,0, $p=0,00004$).

W grupie 31 pacjentów w 4. stopniu zaawansowania obserwowano 24 niepowodzenia leczenia (w tym 16 wznów). Czas do wystąpienia wznowy lub progresji wynosił 0,5–84,7 (mediana 15,4) miesiąca. Wznowy ani progresji nie stwierdzono u 7 pacjentów (czas obserwacji 5–124 miesiące, mediana 62 miesiące). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci w 4. stopniu zaawansowania wynosił 0,5–124 (mediana 57,6) miesiące. Krzywa DFS (Rysunek 10) osiągnęła wstępne *plateau* po 39 miesiącach od rozpoznania NBL, ale później stwierdzono jeszcze 1 wznowę po 85 miesiącach.

W grupie 29 pacjentów w innym niż 4. stopniu zaawansowania (2., 3. i 4s) niepowodzenie leczenia wystąpiło u 7 pacjentów (w tym 1 wznowa u pacjenta w 2. stopniu i 2 wznowy u pacjentów w 3. stopniu zaawansowania choroby). Czas do wystąpienia niepowodzenia leczenia wynosił 4,9–97,6 (mediana 19,2) miesiąca. Bez wystąpienia niepowodzenia leczenia żyje 22 dzieci (10,3–177 /mediana 95,9/ miesiący). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci w innym niż 4. stopniu zaawansowania wynosił 4,9–177,3 (mediana 84,9) miesiąca. Krzywa DFS (Rysunek 10) osiągnęła wstępnie *plateau* po

38 miesiącach od rozpoznania NBL, jednakże odnotowano jeszcze dwie późne wznowy, odpowiednio w: 88 i 97 miesiącu.

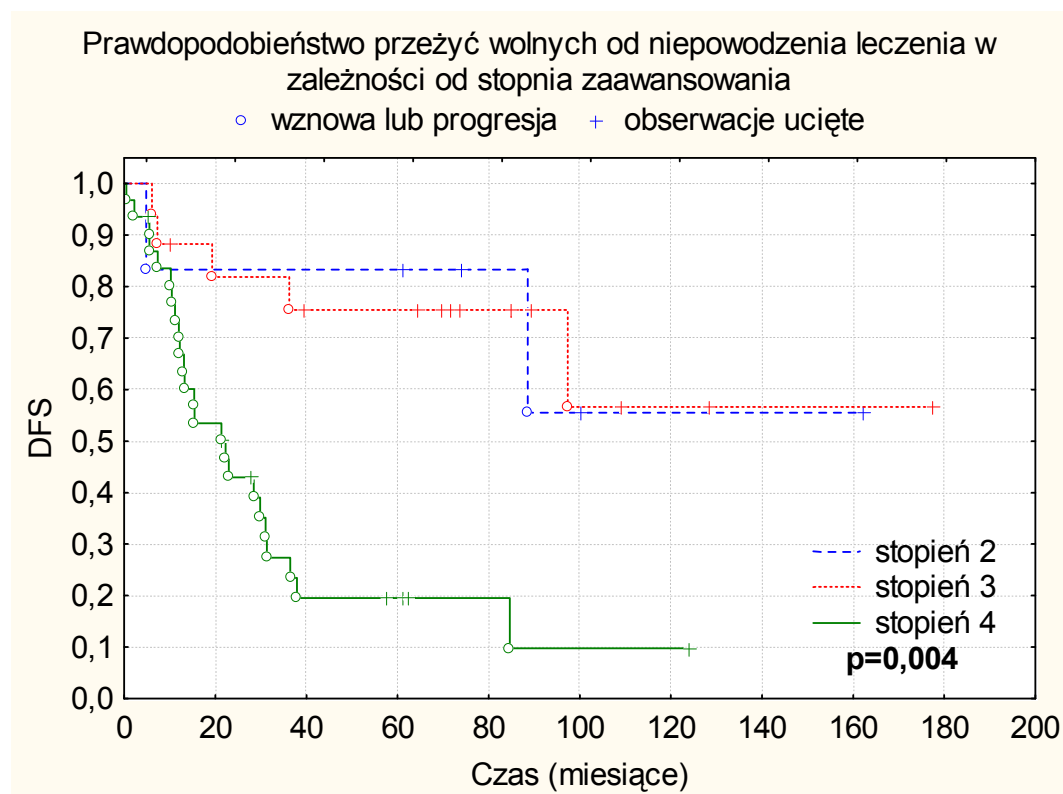
Ponad 3-letnie i 5-letnie DFS dla 2., 3., i 4. stopnia zaawansowania wynosiło odpowiednio: 0,83, 0,82 i 0,77 oraz 0,27 i 0,16. (Rysunek 10) Różnice między grupami były znamienne statystycznie ($p=0,004$). U pacjentów w stopniu 4s nie stwierdzono żadnego niepowodzenia leczenia, prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS wynosiło 1.

Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS dla pacjentów w innym niż 4. stopniu zaawansowania wynosiło odpowiednio 0,82 i 0,79, a dla pacjentów w 4. stopniu zaawansowania: 0,28 i 0,19 (Rysunek 11). Różnica między grupami była znamienna statystycznie ($p=0,0001$).

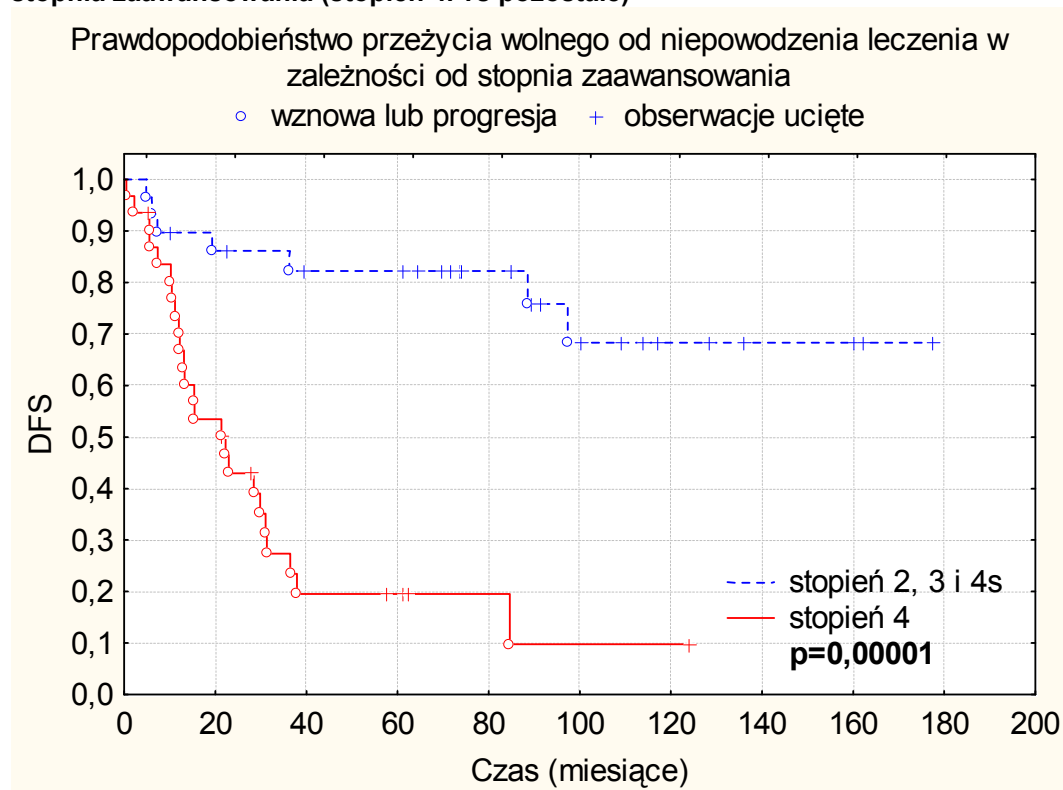
W przypadku wznów lub progresji choroby u pacjentów powyżej 1. r.ż. w 4. stopniu zaawansowania ($n=28$, w tym 21 niepowodzeń leczenia), prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS wynosiło odpowiednio: 0,26 i 0,17, a krzywa DFS osiągnęła wstępne *plateau* po 38 miesiącach, jednakże odnotowano jeszcze jedną późną wznowę w 85 miesiącu. Natomiast dla dzieci w 2. ($n=3$, w tym 1 niepowodzenie leczenia) i 3. ($n=10$, w tym 4 niepowodzenia leczenia) stopniu zaawansowania prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS wynosiło odpowiednio: 0,84 i 0,75, a krzywa osiągnęła wstępne *plateau* po 38 miesiącach, jednakże odnotowano jeszcze dwie późne wznowy, odpowiednio w: 88 i 97 miesiącu (Rysunek 86). Różnice między grupami były znamienne statystycznie ($p=0,001$). Przy użyciu testu χ^2 wykazano znamienny statystycznie wzrost ryzyka wystąpienia niepowodzenia leczenia w 4. stopniu zaawansowania dla pacjentów powyżej 1. r.ż. ($\chi^2=4,04$, $p=0,04$).

Wśród 3 dzieci poniżej 1. r.ż. w 4. stopniu zaawansowania, u 2 wystąpiła progresja NBL. Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera wykazano istnienie trendu w kierunku wzrostu częstości wznów i progresji u pacjentów poniżej 1. r.ż. w 4. stopniu zaawansowania w porównaniu z pacjentami w stopniu 2., 3. i 4s ($p=0,097$). Ze względu na małą liczebność grup pacjentów w 4. i 2. stopniu zaawansowania poniżej 1 r.ż. nie wykreślono krzywych przeżycia i nie oszacowano OS.

Rysunek 10. Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla wszystkich dzieci w zależności od stopnia zaawansowania



Rysunek 11. Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla wszystkich dzieci NBL w zależności od stopnia zaawansowania (stopień 4. vs pozostałe)



3. Amplifikacja onkogenu MYCN

Prezentowano wyniki badań dotyczące występowania zgonów i niepowodzeń terapii (wstępna progresja lub wznowa) i analizę odpowiednich krzywych przeżycia u pacjentów z obecną i nieobecną amplifikacją genu MYCN. Ocenie poddano 58 pacjentów, w tym 46 bez amplifikacji MYCN i 12 z amplifikacją MYCN.

- **Zgony i przeżycia całkowite**

Wśród 58 analizowanych pacjentów zgony stwierdzono u 28, w tym 24 spowodowanych bezpośrednio NBL. Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera u pacjentów z obecną amplifikacją onkogenu MYCN wykazano statystycznie istotne częstsze występowanie zgonów spowodowanych NBL ($p=0,03$).

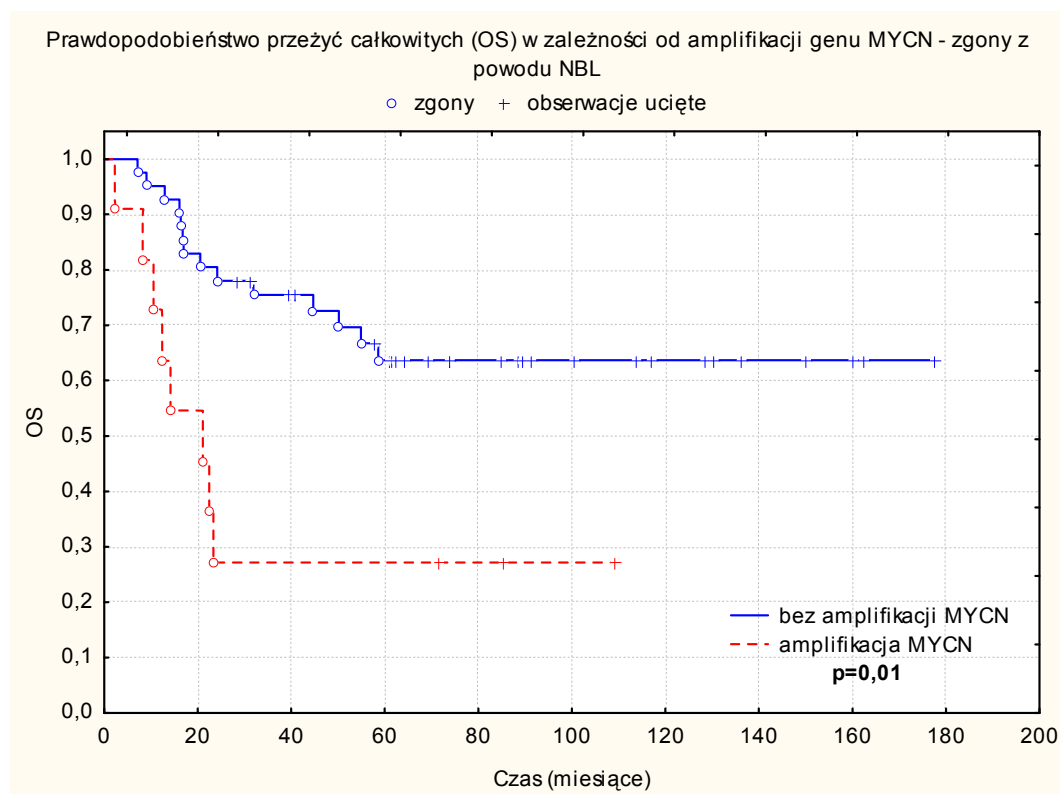
W grupie 46 pacjentów bez amplifikacji genu MYCN było 19 zgonów, w tym 14 (30,0%) z powodu NBL. Czas do wystąpienia zgonu z dowolnej przyczyny wynosił 7–133 (mediana 21,4) miesięcy, czas do wystąpienia zgonu z NBL 7–58,6 (mediana 18,8) miesiąca. Żyje 27 dzieci (28–177 /mediana 89,4/ miesięcy). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci bez amplifikacji MYCN wynosił 7–177 (mediana 58) miesięcy. Krzywa OS (Rysunek 12) osiągnęła *plateau* po 58 miesiącach od rozpoznania NBL.

W grupie 12 pacjentów z obecną amplifikacją onkogenu MYCN było 9 zgonów, w tym 8 (67,7%) z powodu NBL. Czas do wystąpienia zgonu z dowolnej przyczyny wynosił 2,5–21 (mediana 12,4) miesiąca, czas do wystąpienia zgonu z powodu NBL 2,5–21 miesięcy (mediana 13,4). Żyje 3 dzieci, wszystkie z chorobą zlokalizowaną w stopniu 3. (79,7–107 miesięcy, mediana 85 miesięcy). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z amplifikacją genu MYCN wynosił 5–109 (mediana 17,7) miesięcy. Krzywa OS (Rysunek 12) osiągnęła *plateau* po 21 miesiącach od rozpoznania NBL. Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego przeżycia dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN wynosiło odpowiednio: 0,75 i 0,63, a dla pacjentów z amplifikacją MYCN: 0,27 (Rysunek 12). Różnica między grupami była istotna statystycznie ($p=0,01$).

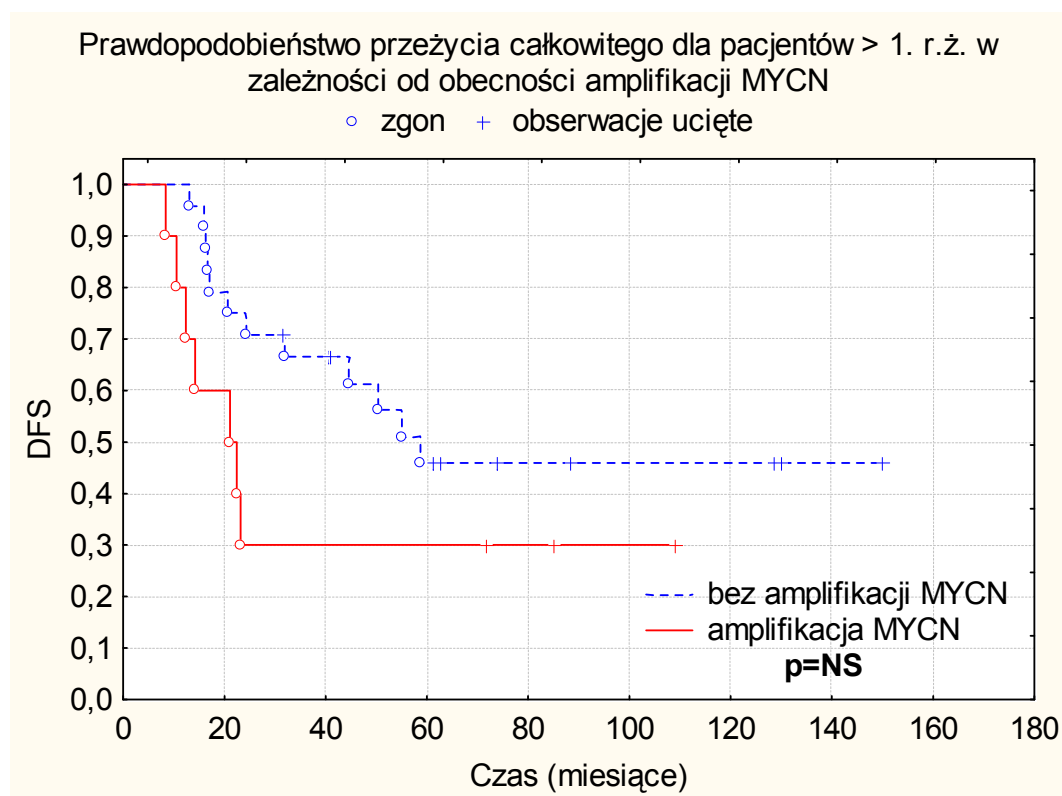
W przypadku zgonów z powodu NBL, prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS dla pacjentów powyżej 1 r.ż bez amplifikacji genu MYCN ($n=24$, w tym 12 zgonów z powodu NBL) wynosiło odpowiednio 0,66 i 0,46, a krzywa OS osiągnęła *plateau* po 59 miesiącach. Natomiast dla dzieci z amplifikacją genu MYCN ($n=10$, w tym 7 zgonów z powodu NBL) prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego przeżycia wynosiło 0,30, a krzywa osiągnęła *plateau* po 21 miesiącach (Rysunek 13). Żyje 3 dzieci, wszystkie w 3. stopniu zaawansowania choroby. Różnice między grupami nie były istotne statystycznie ($p=0,15$). Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano istnienia statystycznie istotnych różnic w występowaniu zgonów z powodu NBL u pacjentów powyżej 1. r.ż. z obecną amplifikacją genu MYCN w porównaniu z pacjentami bez tej nieprawidłowości ($p=0,54$). W analizie nie uwzględniono zgonów z powodu powikłań ($n=5$).

Wśród 19 pacjentów poniżej 1. r.ż. amplifikację genu MYCN stwierdzono tylko u 1 dziecka (pacjent zmarł w wyniku gwałtownej progresji choroby odpornej na leczenie). W grupie 18 pacjentów bez amplifikacji MYCN zmarło 2 z powodu NBL i 1 z powodu powikłań. Nie przeprowadzono analiz porównawczych.

Rysunek 12. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z powodu NBL) dla wszystkich dzieci z NBL w zależności od obecności amplifikacji genu MYCN



Rysunek 13. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z powodu NBL) dla dzieci z NBL powyżej 1. r.ż. w zależności od obecności amplifikacji genu MYCN



- **Niepowodzenia leczenia i przeżycia wolne od choroby**

Wśród 58 analizowanych pacjentów, u których znane były wyniki oznaczenia amplifikacji genu MYCN, niepowodzenia leczenia (wstępną progresję lub wznowę) obserwowano u 31 pacjentów.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu wznów lub progresji u pacjentów z obecną i nieobecną amplifikacją onkogenu MYCN ($p=0,2$).

W grupie 46 pacjentów bez amplifikacji genu MYCN obserwowano 23 niepowodzenia leczenia (w tym 14 wznów). Czas do wystąpienia niepowodzenia leczenia wynosił 2,2-97,5 /mediana 20,8/ miesięcy. Wznowa, ani progresja NBL nie wystąpiła u 24 dzieci (czas obserwacji 21,4-177 (mediana 73,9) miesięcy). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci bez amplifikacji MYCN wynosił 2,2-177 (mediana 38,7) miesięcy. Krzywa DFS (Rysunek 14) osiągnęła wstępne *plateau* po 38 miesiącach od rozpoznania NBL, jednakże w wyniku wystąpienia 3 późnych wznów uległa obniżeniu i krzywa uzyskała kolejne *plateau* po 98 miesiącach od rozpoznania.

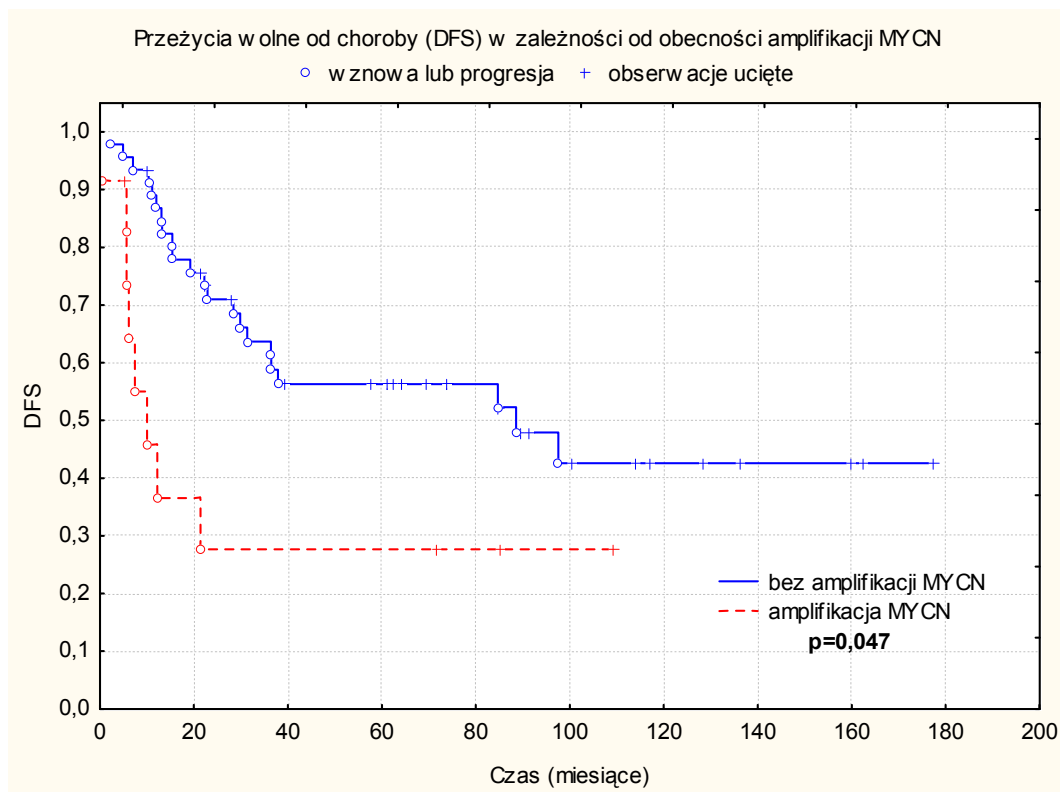
W grupie 12 pacjentów z obecną amplifikacją onkogenu MYCN było 8 niepowodzeń leczenia (w tym 4 wznowy). Czas do wystąpienia niepowodzenia leczenia wynosił 0,5-21 (mediana 6,6) miesięcy. Bez wznowy lub progresji żyje 3 dzieci, wszystkie z chorobą zlokalizowaną w 3. stopniu zaawansowania (79,7-107 miesięcy, mediana 85 miesięcy). Jedno dziecko zmarło z powikłań 5 miesięcy od rozpoczęcia leczenia. Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z amplifikacją MYCN wynosił 0,5-109 (mediana 8,8) miesięcy. Krzywa DFS (Rysunek 14) osiągnęła *plateau* po 21 miesiącach od rozpoznania NBL.

Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN wynosiło odpowiednio: 0,64 i 0,56, a dla pacjentów z amplifikacją genu MYCN: 0,28 (Rysunek 14). Różnice między grupami (test log-rank) były znamienne statystycznie ($p=0,047$).

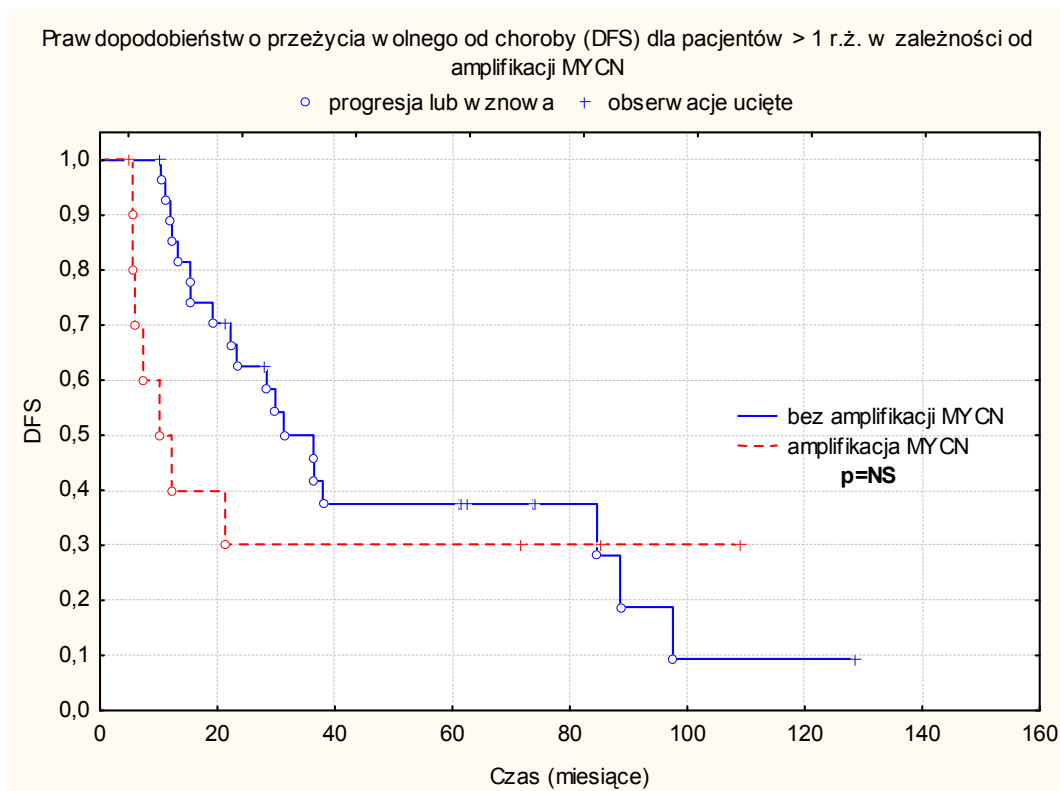
Dla pacjentów powyżej 1 r.ż. z amplifikacją genu MYCN ($n=11$, w tym 7 niepowodzeń leczenia) krzywa DFS osiągnęła *plateau* po 21 miesiącach, a prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS wynosiło 0,3, natomiast dla dzieci bez amplifikacji genu MYCN ($n=28$, w tym 18 niepowodzeń leczenia) krzywa DFS nie osiągnęła *plateau* aż do 98 miesiąca, a prawdopodobieństw 3-letniego i 5-letniego DFS wyniosło odpowiednio: 0,5 i 0,37. Różnice między grupami nie były znamienne statystycznie ($p=0,4$) (Rysunek 15). Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w występowaniu wznów i progresji choroby u pacjentów powyżej 1. r.ż. z obecną amplifikacją genu MYCN w porównaniu z pacjentami bez tej amplifikacji ($p=0,25$).

Wśród 19 pacjentów poniżej 1. r.ż. amplifikację genu MYCN stwierdzono tylko u 1 dziecka (zgon w wyniku gwałtownej progresji choroby opornej na leczenie).

Rysunek 14. Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla wszystkich dzieci z NBL w zależności od obecności amplifikacji MYCN



Rysunek 15. Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla dzieci z NBL powyżej 1. r.ż. w zależności od obecności amplifikacji MYCN



4. Delecja 1p36

Przedstawiono wyniki badań dotyczące występowania zgonów i niepowodzeń terapii (wstępna progresja lub wznowa) i analizę odpowiednich krzywych przeżycia u pacjentów z obecną i nieobecną delecją krótkiego ramienia chromosomu 1.

Ocenie poddano 31 pacjentów (17 bez delecji 1p36 i 14 z delecją 1p36), u których badania cytogenetyczne były wstępnie wykonane w CCRI. Nie włączono do analizy pozostałych chorych, u których wykonano retrospektywną własną ocenę delecji 1p ze względu na trudności z jednoznaczną interpretacją wyników badania FISH (Rozdział 3.1).

U 8 dzieci obecna była izolowana (bez amplifikacji MYCN) delecja 1p36, a u 6 pacjentów oprócz delecji stwierdzono amplifikację genu MYCN. Żadnego z tych dwóch zaburzeń genetycznych nie stwierdzono u 15 chorych, a 2 pacjentów miało wyłącznie amplifikację genu MYCN (w tym 1 z towarzyszącym nadmiarem długiego ramienia chromosomu 17).

• Zgony i przeżycia całkowite

Wśród 31 analizowanych pacjentów, u których była wykonana wstępnie ocena w kierunku delecji 1p36, zgony stwierdzono u 13, w tym 9 z powodu NBL.

Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera wykazano trend w kierunku wyższego ryzyka zgonu z NBL u pacjentów z obecną delecją 1p ($p=0,07$).

W grupie 17 pacjentów bez delecji 1p36 było 5 zgonów, w tym 3 z powodu NBL (17,6%). Czas przeżycia dzieci zmarłych z powodu NBL wynosił 12,4–24,2 (mediana 16,8) miesięcy, a dla wszystkich zmarłych 10,3–27,9 (mediana 16,8) miesięcy. Żyje 12 dzieci (czas obserwacji 28,4–117 /mediana 64,4/ miesięcy). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci bez delecji 1p36 wynosił 10,3–117 (mediana 64,4) miesięcy. Krzywa OS (Rysunek 16) osiągnęła *plateau* po 24 miesiącach od rozpoznania NBL.

W grupie 14 pacjentów z obecną delecją 1p36 było 8 zgonów, w tym 6 z powodu NBL (42,9%). Czas przeżycia dzieci zmarłych z powodu NBL wynosił 8,4–50,0 (mediana 13) miesięcy, zmarłych z dowolnej przyczyny 5,0–50,0 (mediana 10,6) miesięcy. Żyje 6 dzieci (czas obserwacji 39,5–100 miesięcy, mediana 67,7 miesiąca). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z delecją 1p36 wynosił 5,0–50,0 (mediana 39,5) miesięcy. Krzywa OS (Rysunek 16) osiągnęła wstępne *plateau* po 22 miesiącach od rozpoznania NBL, następnie uległa obniżeniu po wystąpieniu 1 zgonu w 50. miesiącu od rozpoczęcia leczenia.

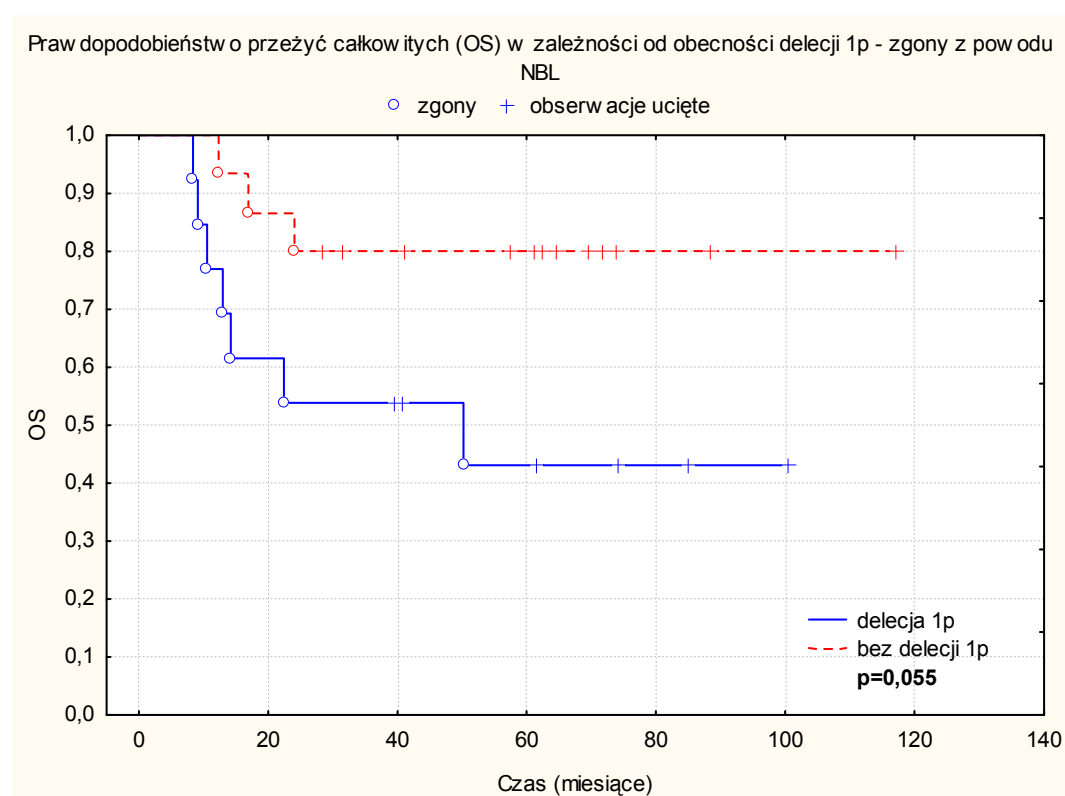
Przy uwzględnieniu wyłącznie zgonów z powodu NBL prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego przeżycia dla pacjentów bez delecji 1p36 wynosiło 0,8, a dla pacjentów z delecją 1p36 odpowiednio: 0,53 i 0,43 (Rysunek 16). Różnice między grupami w teście log-rank były na granicy istotności statystycznej ($p=0,055$).

W przypadku pacjentów powyżej 1. r.ż. z obecną delecją 1p36 ($n=10$, w tym 6 zgonów z NBL), prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS wynosiło odpowiednio: 0,5 i 0,35, a krzywa OS osiągnęła *plateau* po 50 miesiącach. Natomiast dla dzieci bez delecji 1p36 ($n=10$, w tym 3 zgony

z NBL) prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS wynosiło 0,7, a krzywa osiągnęła *plateau* po 25 miesiącach (Rysunek 87). Różnice między grupami nie były istotne statystycznie ($p=0,17$). Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie istotnego większego ryzyka wystąpienia zgonu z NBL u pacjentów powyżej 1. r.ż. z obecną delecją 1p ($p=0,18$). W analizie nie uwzględniono zgonów z powodu powikłań ($n=3$).

U dzieci poniżej 1. r.ż. ze względu na niską liczebność ocenianych podgrup nie przeprowadzono analiz porównawczych. Badania w kierunku obecności delecji 1p wykonano u 8 chorych, w tym u 3 wynik był pozytywny. Jedno z dzieci z obecną delecją 1p zmarło z powodu progresji choroby, pozostałe żyją w pierwszej remisji. W grupie pacjentów bez delecji 1p36 nie było zgonów.

Rysunek 16. Krzywe przeżycia całkowitego dla 31 dzieci z (zgony z powodu NBL) w zależności od obecności delecji 1p36



• Niepowodzenia leczenia i przeżycia wolne od choroby

Wśród 31 analizowanych pacjentów, u których była wykonana wstępnie ocena w kierunku delecji 1p36, wystąpienie niepowodzenia leczenia (wznowę lub pierwotną progresję choroby) obserwowano u 15 pacjentów.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu niepowodzeń leczenia u pacjentów z i bez obecności delecji 1p ($p=0,3$).

W grupie 17 pacjentów bez delecji 1p36 było 7 niepowodzeń leczenia (w tym 5 wznow). Czas do wystąpienia niepowodzenia leczenia wynosił 4,9-84,7 /mediana 15,4/ miesiące. Wznowy ani progresji nie obserwowano u 10 pacjentów (czas obserwacji 27,9-117 (mediana 63,5) miesiące). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci bez delecji 1p36 wynosił 4,9-117 (mediana 57,6) miesiące. Krzywa

DFS (Rysunek 17) osiągnęła wstępne *plateau* po 39 miesiącach od rozpoznania NBL, w 85 miesiącu odnotowano jedną późną wznowę.

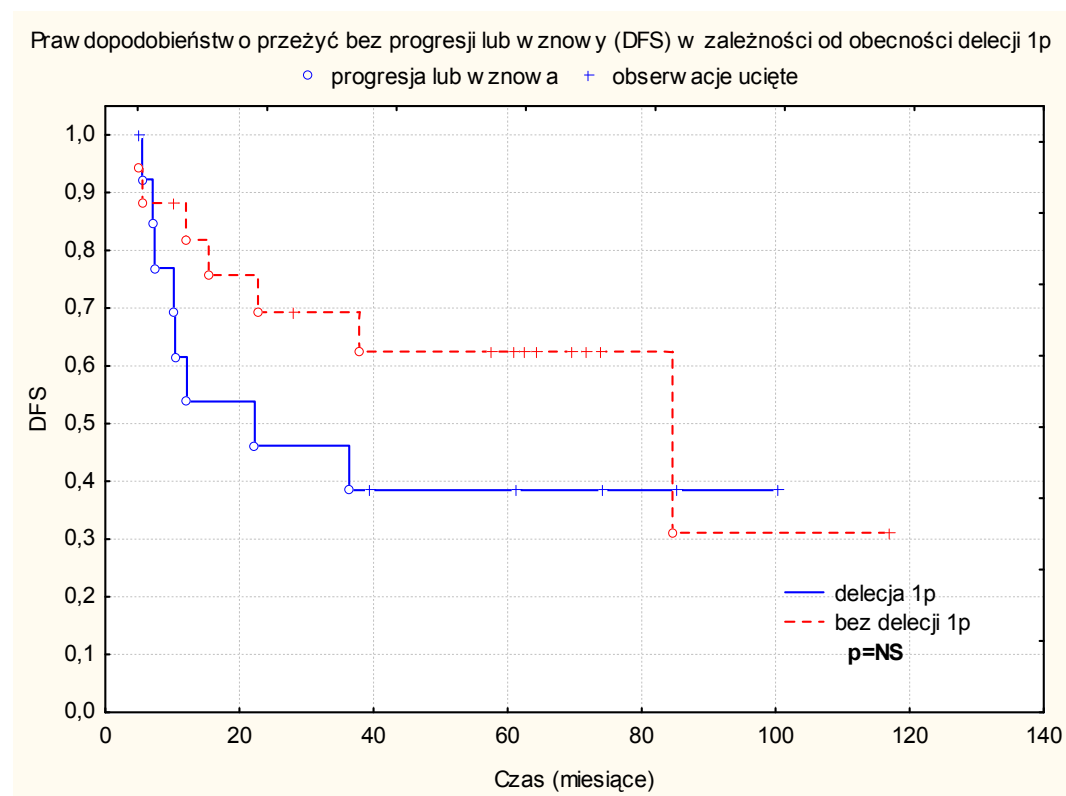
W grupie 14 pacjentów z obecną delecją 1p36 było 8 niepowodzeń leczenia (w tym 4 wznowy). Czas do wystąpienia wznowy lub progresji wynosił 5,0-22,3 (mediana 10,2) miesiąca. Bez wystąpienia niepowodzenia leczenia żyje 5 dzieci (czas obserwacji 39,5-100 miesięcy, mediana 66,9 miesiąca). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z delecją 1p36 wynosił 4,9-100,0 (mediana 57,6) miesięcy. Krzywa DFS (Rysunek 17) osiągnęła *plateau* po 39 miesiącach od rozpoznania NBL.

Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS dla pacjentów bez delecji 1p36 wynosiło 0,69 i 0,62, a dla pacjentów z delecją 1p36 odpowiednio 0,43 i 0,39 (Rysunek 17). Różnice między grupami w teście log-rank nie były istotne statystycznie ($p=0,29$).

W przypadku pacjentów powyżej 1. r.ż., prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS dla pacjentów z obecną delecją 1p36 ($n=11$, w tym 7 niepowodzeń leczenia) wynosiło odpowiednio: 0,4 i 0,3, a krzywa DFS osiągnęła *plateau* po 35 miesiącach. Natomiast dla dzieci bez delecji 1p36 ($n=12$, w tym 6 niepowodzeń leczenia) prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS wynosiło odpowiednio: 0,64 i 0,53, a krzywa osiągnęła wstępne *plateau* po 38 miesiącach, jednakże odnotowano jeszcze jedną późną wznowę, w 85 miesiącu (Rysunek 88). Różnice między grupami nie były istotne statystycznie ($p=0,32$). Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania niepowodzeń leczenia pomiędzy pacjentami powyżej 1. r.ż. z obecną i nieobecną delecją 1p36 ($p=0,26$).

U dzieci poniżej 1. r.ż. ze względu na niską liczebność ocenianych podgrup nie przeprowadzono analiz porównawczych. Badania w kierunku obecności delecji 1p wykonano u 8 chorych, w tym u 3 wynik był pozytywny. Jedno z dzieci z obecną delecją 1p zmarło z powodu progresji choroby, pozostałe żyją w pierwszej remisji. W grupie pacjentów bez delecji 1p36 dwoje dzieci żyje po wznowie w 2 remisji, u pozostałych nie obserwowano niepowodzeń leczenia.

Rysunek 17. Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla 31 dzieci z NBL w zależności od obecności delekcji 1p36



5. Nadmiar materiału genetycznego 17q

Przedstawiono wyniki badań dotyczących występowania zgonów i niepowodzeń terapii (wstępna progresja lub wznowa) i analizę krzywych przeżycia u pacjentów z obecnym i nieobecnym nadmiarem długiego ramienia chromosomu 17.

Ocenie poddano 22 pacjentów (7 bez nadmiaru materiału genetycznego 17q i 15 z obecnym nadmiarem materiału genetycznego 17q), u których badania cytogenetyczne były wstępnie wykonane w CCRI. Nie włączono do analizy pozostałych 38 chorych, u których wykonano własną retrospektywną ocenę w kierunku nadmiaru materiału genetycznego 17q ze względu na trudności z jednoznaczną interpretacją wyników badania FISH (Rozdział 3.1).

U 10 dzieci obecny był izolowany (bez amplifikacji MYCN) nadmiar 17q, a u 5 pacjentów oprócz delecji stwierdzono amplifikację genu MYCN. Żadnego z tych dwóch zaburzeń genetycznych nie stwierdzono u 5 chorych, a 2 pacjentów miało wyłącznie amplifikację genu MYCN (w tym 1 z towarzyszącą delecją krótkiego ramienia chromosomu 1).

• Zgony i przeżycia całkowite

Wśród 22 analizowanych pacjentów, u których wstępnie wykonano badania w kierunku nadmiaru materiału genetycznego 17q było 11 zgonów, w tym 8 z powodu NBL.

Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu zgonów spowodowanych bezpośrednio NBL u pacjentów z i bez obecności nadmiaru materiału genetycznego 17q ($p=0,15$).

W grupie 7 pacjentów bez nadmiaru materiału genetycznego 17q były 2 zgony, w tym 1 z powodu NBL (28,6%). Czas do wystąpienia zgonu z dowolnej przyczyny wynosił 5 i 24 miesiące, zgonu z powodu NBL 24 miesiące. Żyje 5 dzieci (czas obserwacji 28,4-71,7 miesięcy, mediana 61,7 miesiąca). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci bez nadmiaru materiału genetycznego 17q wynosił 5,0–71,7 (mediana 42) miesięcy. Krzywa OS (Rysunek 18) osiągnęła *plateau* po 24 miesiącach od rozpoznania NBL.

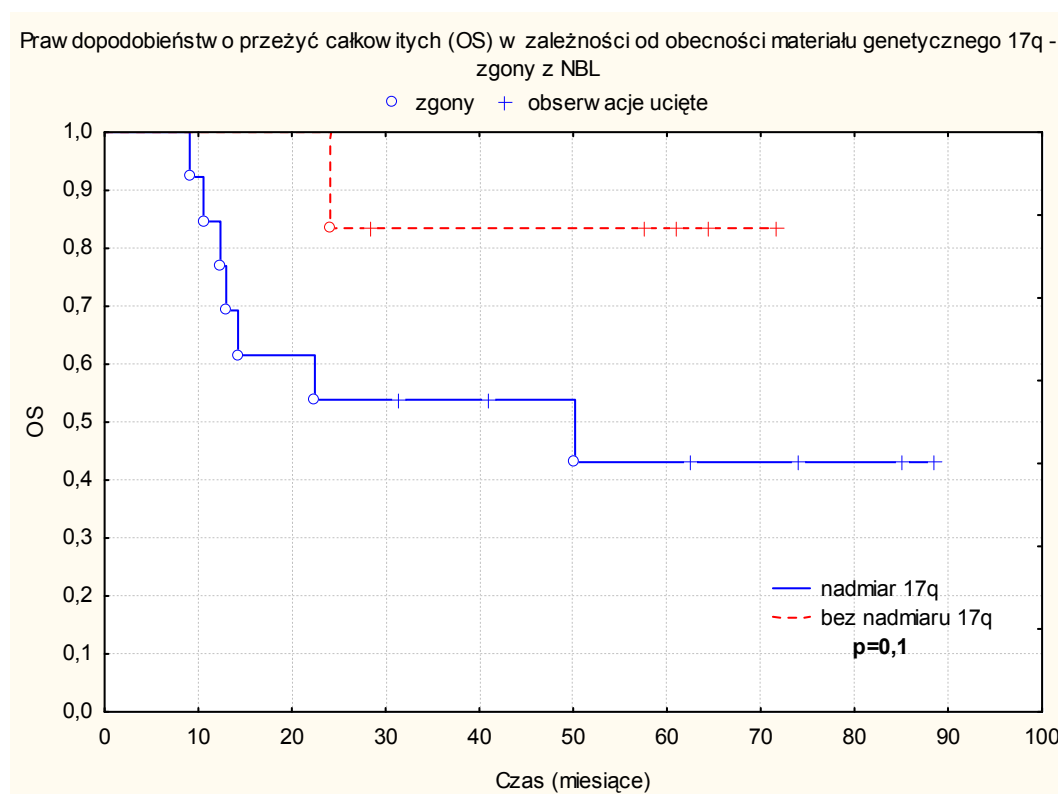
W grupie 15 pacjentów z obecnym nadmiarem materiału genetycznego 17q było 9 zgonów, w tym 7 z powodu NBL (46,7%). Czas do wystąpienia wszystkich zgonów wynosił 9,1–50,2 (mediana 13) miesięcy, a zgonu z powodu NBL 9,1-50,2 /mediana 13/ miesięcy. Żyje 6 dzieci (czas obserwacji 31,4-88,4 (mediana 68,3) miesięcy). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z obecnym nadmiarem materiału genetycznego 17q wynosił 9,1–88,4 /mediana 27,9/ miesięcy. Krzywa OS (Rysunek 18) osiągnęła *plateau* po 50 miesiącach od rozpoznania NBL.

W przypadku analizy zgonów spowodowanych bezpośrednio NBL, prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego przeżycia całkowitego dla pacjentów bez nadmiaru materiału genetycznego 17q wynosiło 0,83, a dla pacjentów z obecnym nadmiarem materiału genetycznego 17q odpowiednio 0,53 i 0,43 (Rysunek 18). Różnice między grupami w teście log-rank nie były znamienne statystycznie ($p=0,1$).

Spośród 15 pacjentów powyżej 1. r.ż., u których wykonano badania w kierunku obecności nadmiaru 17q, w 3 przypadkach wynik był negatywny, w tym 1 dziecko zmarło NBL. Z 12 pacjentów z obecnym nadmiarem 17q z powodu NBL zmarło 6. Ze względu na niską liczebność podgrupy (n=3) bez nadmiaru 17q nie przeprowadzono analiz porównawczych. W badaniu nie uwzględniono dzieci, które zmarły z powodu powikłań (n=3).

W przypadku pacjentów poniżej 1. r.ż. nadmiar 17q oznaczono wstępnie tylko u 4 pacjentów, w tym 1 z pozytywnym wynikiem zmarł z powodu progresji NBL. Trzej dzieci bez obecności nadmiaru 17q żyje.

Rysunek 18. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z powodu NBL) dla 19 dzieci z NBL w zależności od obecności nadmiaru 17q



- Niepowodzenia leczenia i przeżycie wolne od choroby**

Wśród 22 analizowanych pacjentów, u których wstępnie wykonano badania w kierunku nadmiaru materiału genetycznego 17q niepowodzenie leczenia (wznowa lub progresja pierwotna) obserwowano u 12 pacjentów.

Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu niepowodzeń leczenia u pacjentów z i bez obecności nadmiaru materiału genetycznego 17q (p=0,11).

W grupie 7 pacjentów bez nadmiaru materiału genetycznego 17q były 2 niepowodzenia leczenia (wznowy choroby 5 i 12 miesięcy od rozpoczęcia leczenia NBL). Niepowodzenia leczenia nie stwierdzono u 5 dzieci (czas obserwacji 5,0-71,7 (mediana 61,1) miesiące), ale jedno dziecko zmarło z powikłań 5 miesięcy po rozpoczęciu leczenia. Czas obserwacji dla całej grupy dzieci bez nadmiaru

materiału genetycznego 17q wynosił 4,9-71,7 (mediana 57,6) miesięcy. Krzywa DFS (Rysunek 19) osiągnęła *plateau* po 12 miesiącach od rozpoznania NBL.

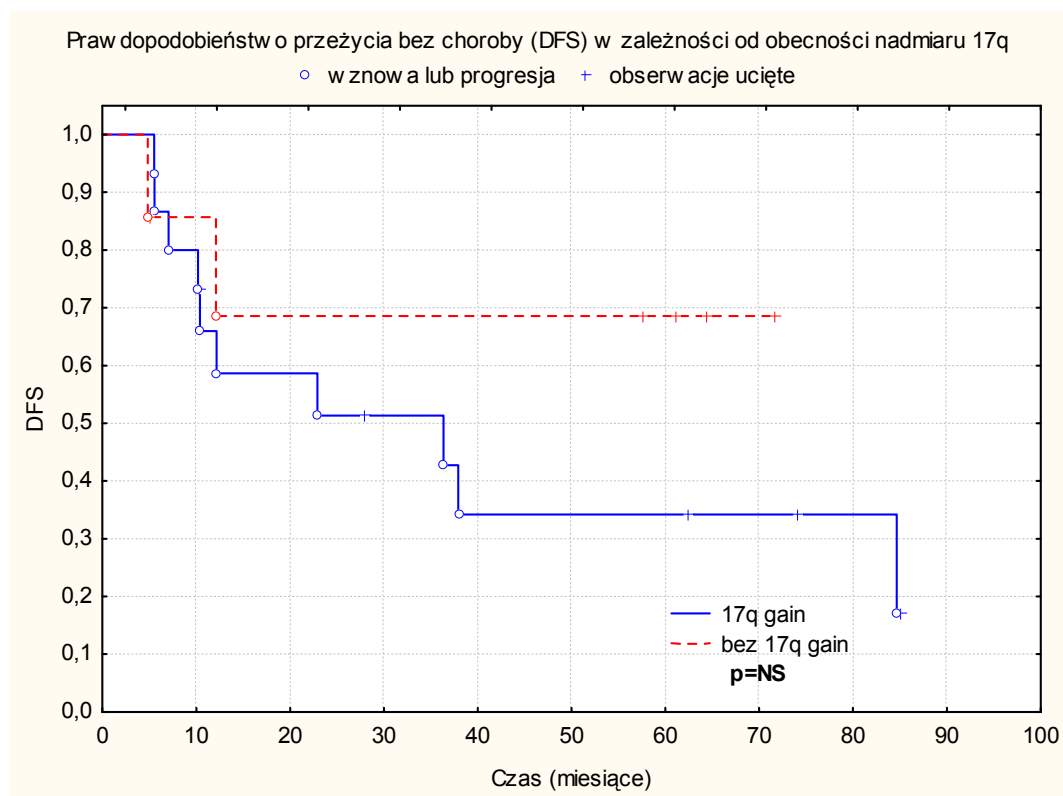
W grupie 15 pacjentów z obecnym nadmiarem materiału genetycznego 17q było 10 niepowodzeń leczenia (w tym 5 wznów). Czas do wystąpienia wznowy lub progresji wynosił 5,5-84,7 (mediana 11,3) miesięcy. Niepowodzenie leczenia nie stwierdzono u 5 dzieci (czas obserwacji 10,3-85,1 miesiąca, mediana 62,5 miesiąca), przy czym dwoje dzieci zmarło z powikłań 10 i 28 miesięcy po rozpoczęciu leczenia NBL. Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z obecnym nadmiarem materiału genetycznego 17q wynosił 5,5-85,1 (mediana 23,3) miesięcy. Krzywa DFS (Rysunek 19) osiągnęła wstępnie *plateau* po 38 miesiącach od rozpoznania NBL; po 75 miesiącach wystąpiło zdarzenie niepożądane u 1 pacjenta.

Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS dla pacjentów bez nadmiaru materiału genetycznego 17q wynosiło 0,69, a dla pacjentów z obecnym nadmiarem materiału genetycznego 17q odpowiednio 0,5 i 0,34 (Rysunek 19). Różnice między grupami w teście log-rank nie były znamienne statystycznie ($p=0,31$).

W przypadku pacjentów powyżej 1. r.ż. z obecnym nadmiarem 17q ($n=14$, w tym 11 niepowodzeń leczenia), prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS wynosiło odpowiednio: 0,55 i 0,37, a krzywa DFS osiągnęła wstępne *plateau* po 38 miesiącach; jednakże po 85 stwierdzono jedną późną wznowę. Natomiast dla dzieci bez nadmiaru 17q ($n=4$, w tym 2 niepowodzenia leczenia) prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS wynosiło 0,67, a krzywa osiągnęła wstępne *plateau* po 12 miesiącach. Różnice między grupami nie były znamienne statystycznie ($p=0,44$). Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic w częstości występowania niepowodzeń leczenia pomiędzy pacjentami powyżej 1. r.ż. z obecnym i nieobecnym nadmiarem 17q ($p=0,62$).

W przypadku pacjentów poniżej 1. r.ż. badania w kierunku obecności nadmiaru 17q wykonano tylko u 4 pacjentów, w tym troje z wynikiem negatywnym żyje (2 bez niepowodzenia leczenia, 1 w drugiej remisji). Jedno dziecko z obecnym nadmiarem 17q zmarło z powodu progresji choroby. Ze względu na niską liczebność ocenianych podgrup nie przeprowadzono analiz porównawczych.

Rysunek 19. Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla 22 dzieci z NBL w zależności od obecności nadmiaru 17q



6. Budowa histopatologiczna

Przedstawiono wyniki badań dotyczące występowania zgonów i niepowodzeń terapii (wstępna progresja lub wznowa) i analizę odpowiednich krzywych przeżycia u pacjentów z guzem o korzystnej i niekorzystnej budowie histologicznej według klasyfikacji INPC.

Ocenie poddano 52 pacjentów, w tym 16 z guzem o korzystnej budowie histologicznej i 36 pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histologicznej według INPC. Do badań nie włączono 8 dzieci ze względu na brak możliwości dokonania jednoznacznej klasyfikacji do grupy rokowniczej według INPC.

• Zgony i przeżycia całkowite

Spśród 52 analizowanych pacjentów zmarło 22, w tym 17 z powodu NBL.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu zgonów spowodowanych bezpośrednio NBL u pacjentów w zależności od budowy histopatologicznej guza ($p=0,1$).

W grupie 16 pacjentów z guzem o korzystnej budowie histologicznej były 4 zgony, w tym 3 związane NBL (18,7%). Czas do wystąpienia wszystkich zgonów wynosił 9,1-133,7 (mediana 13,8) miesięcy, zgonu z powodu NBL 9,10-17,03 (mediana 10,57) miesiąca. Żyje 12 dzieci (czas obserwacji 28,4-177,3 (mediana 120,5) miesiąca). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z guzem o korzystnej budowie histologicznej wynosił 9,1-177,3 (mediana 104,2) miesięcy. Krzywa OS dla zgonów z NBL (Rysunek 20) osiągnęła *plateau* po 17 miesiącach od rozpoznania NBL.

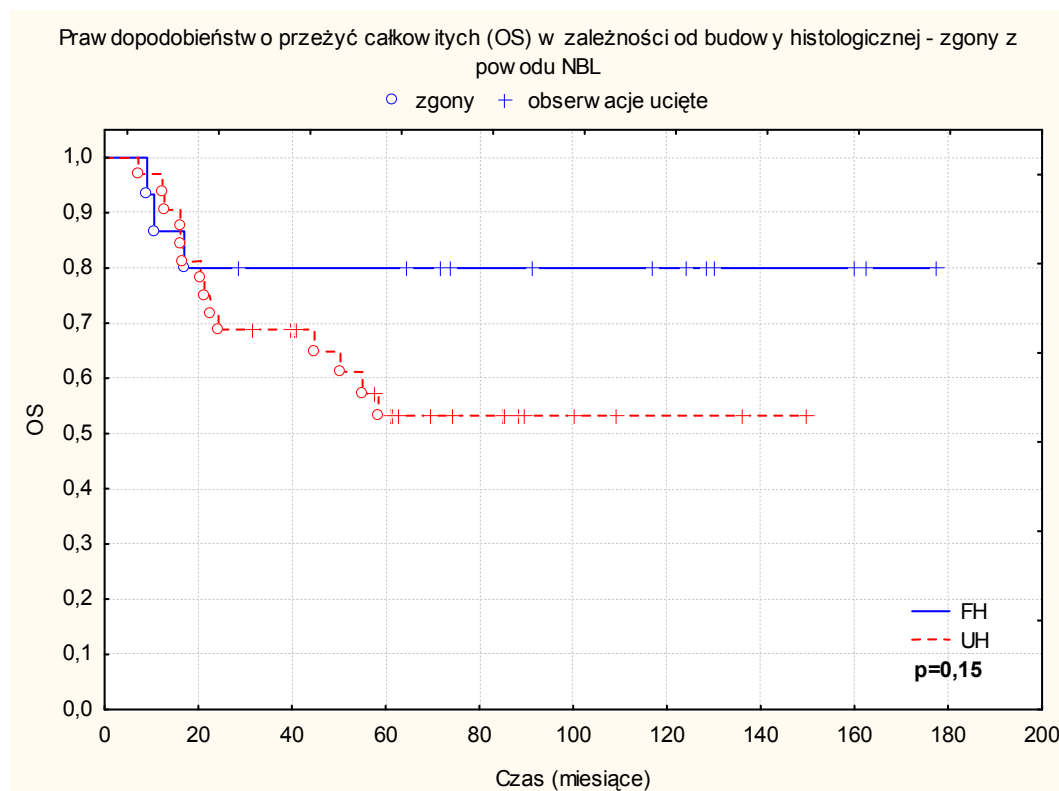
W grupie 36 pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histologicznej było 18 zgonów, w tym 14 z powodu NBL. Czas do wystąpienia wszystkich zgonów wynosił 5,0-58 (mediana 20,1) miesięcy, z powodu NBL 7,2-58 (mediana 20,1) miesięcy. Żyje 18 dzieci (czas obserwacji 39,5-149 /mediana 71,7/ miesięcy). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z guzem o niekorzystnej budowie histologicznej wynosił 5,0-149 (mediana 42,8) miesięcy. Krzywa OS dla zgonów z NBL (Rysunek 20) osiągnęła *plateau* po 58 miesiącach od rozpoznania NBL.

Przy uwzględnieniu wyłącznie zgonów spowodowanych bezpośrednio NBL, prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS dla pacjentów z guzem o korzystnej budowie histologicznej wynosiło 0,80, a dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histologicznej odpowiednio: 0,7 i 0,52 (Rysunek 20). Różnice między grupami w teście log-rank nie były znamienne statystycznie ($p=0,15$).

Dla pacjentów powyżej 1. r.ż. z niekorzystną budową histopatologiczną guza ($n=24$, w tym 13 zgonów z NBL), prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS wynosiło odpowiednio: 0,62 i 0,42, a krzywa OS osiągnęła *plateau* po 58 miesiącach. Natomiast dla dzieci z korzystną budową histopatologiczną ($n=7$, w tym 2 zgony z NBL) prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS wynosiło 0,71, a krzywa osiągnęła *plateau* po 18 miesiącach (Rysunek 89). Różnice między grupami nie były znamienne statystycznie ($p=0,28$). Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano znamienych statystycznie różnic w występowaniu zgonów między pacjentami z korzystną i niekorzystną budową histopatologiczną guza dla pacjentów powyżej 1. r.ż. ($p=0,22$). W analizie nie uwzględniono zgonów z powodu powikłań ($n=4$).

Wśród pacjentów poniżej 1. r.ż. nie stwierdzono różnic między grupami z korzystną i niekorzystną budową histopatologiczną guza. W obu analizowanych grupach o jednakowej liczebności (n=8) stwierdzono po 1 zgonie z powodu NBL. W badaniu nie uwzględniono zgonów z powodu powikłań (n=1).

Rysunek 20. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z powodu NBL) dla wszystkich dzieci z NBL w zależności od budowy histologicznej guza (FU - budowa guza korzystna, UH - budowa guza niekorzystna)



- **Niepowodzenia leczenia i przeżycia wolne od choroby**

Spośród 52 analizowanych pacjentów wystąpienie niepowodzenia leczenia (wznowy i pierwotne progresje) obserwowano u 25.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu niepowodzenia leczenia u pacjentów w zależności od budowy histopatologicznej guza ($\chi^2=1,04$, $p=0,3$).

W grupie 16 pacjentów z guzem o korzystnej budowie histologicznej było 6 niepowodzeń leczenia (w tym 2 wznowy). Czas do wystąpienia wznowy, bądź progresji wynosił 4,9-88,6 (mediana 10,7) miesięcy. Wznowy, ani progresji nie obserwowano u 10 dzieci (czas obserwacji 64,4-160 (mediana 120,5) miesięcy), wszystkie dzieci żyją. Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z guzem o korzystnej budowie histologicznej według klasyfikacji INPC wynosił 4,9-160 (mediana 81,2) miesięcy. Krzywa DFS (Rysunek 21) osiągnęła wstępne *plateau* po 17 miesiącach od rozpoznania NBL, ale w 97 miesiącu od rozpoczęcia leczenia wystąpiła jedna późna wznowa.

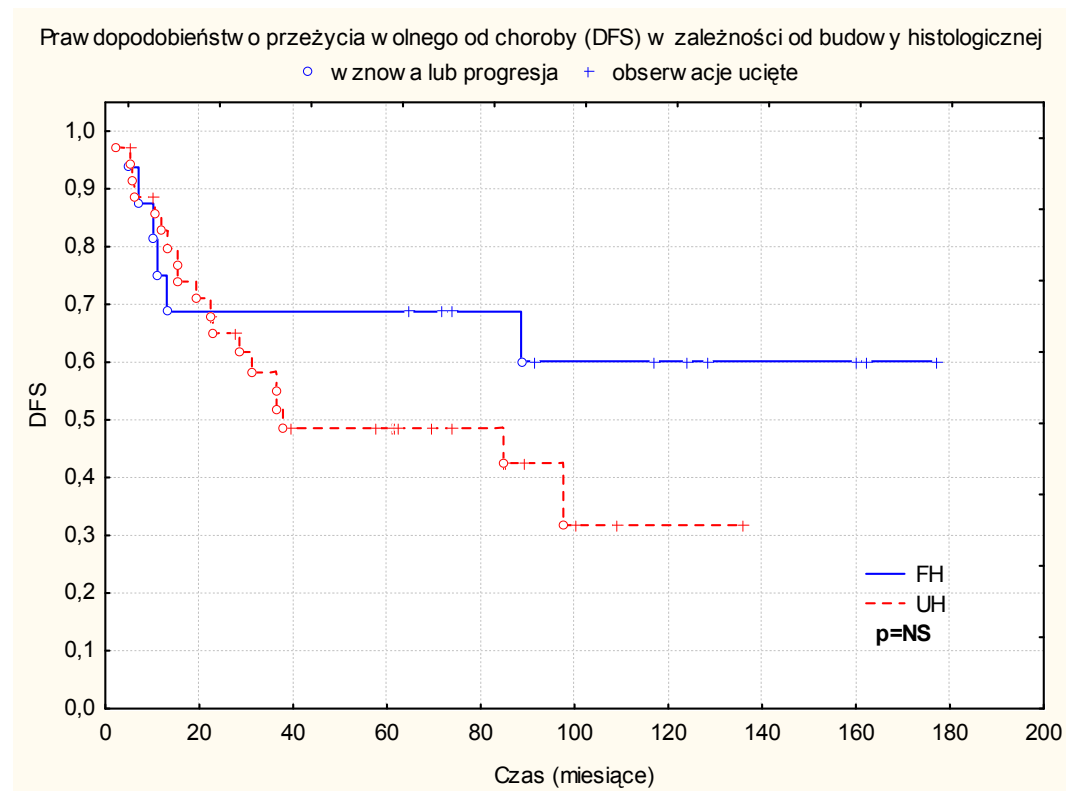
W grupie 36 pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histologicznej było 19 niepowodzeń leczenia (w tym 12 wznów). Czas do wystąpienia niepowodzenia leczenia wynosił 2,2–97,6 (mediana 19,2) miesięcy. Bez wznowy lub progresji żyje 17 dzieci (czas obserwacji 5,1–136 /mediana 74/ miesięcy). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z guzem o niekorzystnej budowie histologicznej wynosił 5,0–109 (mediana 33,8) miesięcy. Krzywa DFS (Rysunek 21) osiągnęła wstępne *plateau* po 38 miesiącach od rozpoznania NBL, po 85 i 97 miesiącach odnotowano jeszcze dwie późne wznowy.

Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS dla pacjentów z guzem o korzystnej budowie wynosiło 0,69, a dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histologicznej odpowiednio: 0,58 i 0,49 (Rysunek 21). Różnice między grupami w teście log-rank nie były znamienne statystycznie ($p=0,097$), ale można przypuszczać istnienie trendu do uzyskania lepszych wyników w przypadku stwierdzenia korzystnej budowy histopatologicznej.

Dla pacjentów powyżej 1. r.ż. z niekorzystną budową histopatologiczną guza ($n=27$, w tym 16 niepowodzeń leczenia), prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS wynosiło odpowiednio: 0,48 i 0,35, a krzywa DFS osiągnęła wstępne *plateau* po 35 miesiącach; jednakże po 83 i 87 miesiącach obserwowano dwie późne wznowy. Natomiast dla dzieci z korzystną budową histopatologiczną ($n=8$, w tym 4 niepowodzenia leczenia) prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS wynosiło 0,62, a krzywa osiągnęła wstępne *plateau* po 15 miesiącach; po 84 miesiącach obserwowano jedną późną wznowę (Rysunek 90). Różnice między grupami nie były znamienne statystycznie ($p=0,22$). Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano znamienych statystycznie różnic w występowaniu wznów lub progresji choroby między pacjentami powyżej 1. r.ż. z korzystną i niekorzystną budową histopatologiczną guza ($p=0,25$).

Wśród pacjentów poniżej 1. r.ż. z niekorzystną budową histopatologiczną guza prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS dla pacjentów wynosiło 0,75 ($n=9$, w tym 2 niepowodzenia leczenia), a krzywa DFS osiągnęła *plateau* po 10 miesiącach. Natomiast dla dzieci z korzystną budową histopatologiczną ($n=8$, w tym 2 niepowodzenia leczenia) prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego przeżycia wynosiło 0,87, a krzywa osiągnęła *plateau* po 2 miesiącach (Rysunek 91). Różnice między grupami nie były znamienne statystycznie ($p=0,51$). Przy użyciu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano istnienia znamienych statystycznie różnic w częstości wznów i progresji u pacjentów z korzystną i niekorzystną budową histopatologiczną ($p=0,45$).

Rysunek 21. Krzywe przeżycia wolnego od choroby w zależności budowy histologicznej guza



7. Rodzaj stosowanego leczenia

Przedstawiono wyniki badań dotyczące występowania zgonów, niekorzystnych zdarzeń i niepowodzeń leczenia (wstępna progresja i wznowy) oraz analizę odpowiednich czasów przeżycia w zależności od zastosowanej metody leczenia, odrębnie dla pacjentów poniżej i powyżej 1. r.ż.

- **Dzieci poniżej 1.r.ż.**

Badaniu poddano łącznie 19 niemowląt. Spośród trzech pacjentów w 2. stopniu zaawansowania, w jednym przypadku, w którym wstępnie przeprowadzono tylko radykalny zabieg usunięcia guza, a później, po 5 miesiącach, z powodu wznowy choroby, zastosowano chemioterapię według programu europejskiego dla nieoperacyjnych guzów zlokalizowanych bez amplifikacji genu MYCN, utrzymuje się wieloletnia II RC. U dwójga innych dzieci, które zaraz po rozpoznaniu NBL, otrzymały chemioterapię z zastosowaniem etopozynu, karboplatyny, winkrystyny i cyklofosfamidu, utrzymuje się I RC.

Spośród 7 niemowląt w 3. stopniu zaawansowania, czworo leczono według protokołu europejskiego dla nieoperacyjnych guzów zlokalizowanych bez amplifikacji genu MYCN. Troje dzieci żyje, a jedno zmarło z powodu progresji choroby. U innego pacjenta stosowano chemioterapię z użyciem winkrystyny i cyklofosfamidu, a u kolejnego etopozyn i karboplatynę, a następnie CADO (4). Dzieci te żyją w I RC. W jednym przypadku w 3. stopniu zaawansowania wykonano wyłącznie zabieg chirurgiczny, pacjent żyje w I RC. Spośród 7 niemowląt w 3. stopniu zaawansowania, leczonych różnymi sposobami, 6 żyje w I RC. W jednym przypadku wystąpił zgon spowodowany progresją NBL.

Spośród 6 pacjentów w 4s stopniu zaawansowania, 5 żyje w I RC, a jeden zgon był spowodowany progresją drugiego nowotworu. U wszystkich 6 dzieci przeprowadzono chemioterapię z zastosowaniem co najmniej 4 różnych schematów, co przedstawiono poniżej:

- U 3 niemowląt stosowano etopozyn i karboplatynę, w tym u jednego, ze względu na niedostateczną odpowiedź na leczenie, wprowadzono później chemioterapię według protokołu TOKIO). Wszystkie dzieci żyją w I RC
- W jednym przypadku po terapii z użyciem cyklofosfamidu i winkrystyny utrzymuje się I RC
- Jedno dziecko otrzymało chemioterapię składającą się z cyklofosfamidu, winkrystyny i doksorubicyny; pacjent zmarł z powodu progresji drugiego nowotworu, ostrej białaczki szpikowej.
- U jednego pacjenta, u którego zastosowano etopozyn i karboplatynę oraz cyklofosfamid i doksorubicynę, utrzymuje się I RC

Spośród trojga dzieci w 4. stopniu zaawansowania, dwoje (w tym 1 z amplifikacją MYCN) leczonych według protokołu TOKIO, zmarło w wyniku progresji choroby. Trzeci pacjent, leczony według protokołu europejskiego, żyje w I RC.

Podsumowując, spośród 19 niemowląt żyje 15, w tym 14 w I RC. Zmarło czworo dzieci, dwoje z powodu progresji NBL, a jedno z powodu drugiego nowotworu. Szczegółowe wyniki leczenia uzyskane w grupie niemowląt przedstawiono w Rozdziale 4.2 (pkt 1.). Z powodu małej liczebności podgrup niemowląt, różniących się sposobami leczenia w poszczególnych stopniach zaawansowania, nie przeprowadzono analiz porównawczych.

- **Dzieci powyżej 1.r.ż.**

Troje dzieci w 2. stopniu zaawansowania otrzymało chemioterapię dla nieoperacyjnych guzów lokalnych bez amplifikacji genu MYCN (cyklofosamid, etopozyd i cisplatyna), w tym u dwojga zastosowano dodatkowo chemioterapię CADO (karboplatyna, adriamycyna, winkrystyna) z powodu niezadowolającej odpowiedzi na wstępne leczenie. Dwoje chorych żyje w I RC, w trzecim przypadku wystąpiła późna wznova choroby i dziecko zmarło w drugiej częściowej remisji z powodu powikłań okołoperacyjnych.

Spośród 10 chorych w 3. stopniu zaawansowania, 8 (w tym 3 z amplifikacją MYCN) było leczonych według protokołu TOKIO. Troje dzieci zmarło z powodu NBL (w tym 1 z amplifikacją MYCN), a jedno z powodu powikłań. Troje pacjentów żyje w I RC (w tym 2 z amplifikacją MYCN), a jedno w II RC. Inne dziecko w 3. stopniu zaawansowania z obecną amplifikacją MYCN, leczone według protokołu europejskiego dla grupy wysokiego ryzyka (HR-NBL-1/SIOPEN) żyje w I RC. W jednym przypadku stosowano chemioterapię z udziałem etopozydu i karboplatyny, chory żyje w I RC. Podsumowując, spośród 10 dzieci powyżej 1 r.ż. w 3. stopniu zaawansowania choroby, żyje 6, w tym 5 w I RC. Zmarło czworo dzieci, troje z powodu progresji NBL, a jedno z powikłań.

Szczegółowe wyniki leczenia dzieci powyżej 1 r.ż. w 2. i 3. stopniu zaawansowania przedstawiono w Rozdziale 4.2 (pkt 1.). Z powodu małej liczebności podgrup różniących się sposobami leczenia tych pacjentów, nie przeprowadzono analiz porównawczych.

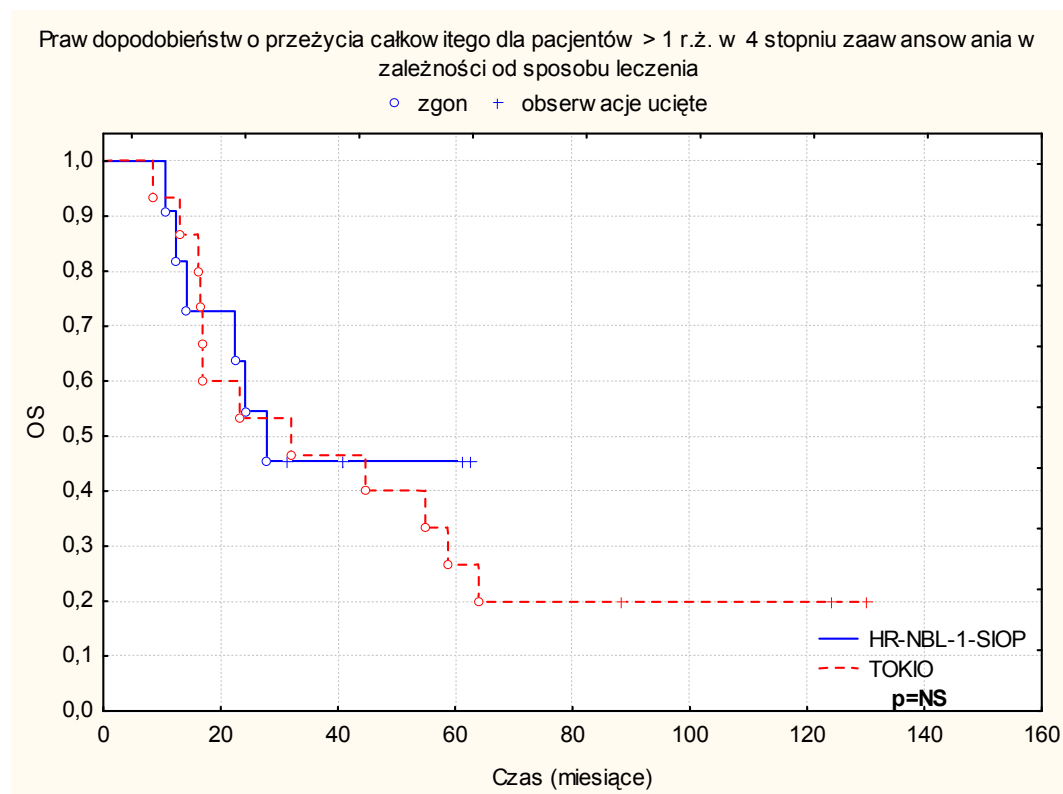
Dzieci powyżej 1 r.ż. w 4. stopniu zaawansowania w analizowanym okresie czasu były leczone dwoma różnymi programami. W 2002 r. zmieniono protokół leczenia pacjentów z NBL grupy wysokiego ryzyka z protokołu japońskiego („TOKIO”) na protokół europejski (HR-NBL-1/SIOPEN), różniący się rodzajem chemioterapii indukcyjnej, a także zakładający u wszystkich pacjentów przeprowadzenie radioterapii, megachemioterapii i autologicznego przeszczepienia komórek macierzystych oraz leczenia minimalnej choroby resztkowej kwasem 13-cis-retinowym (Rozdział 3.2). Dlatego porównano wyniki terapii uzyskane przez dzieci powyżej 1. r.ż. w 4. stopniu zaawansowania, leczone dwoma odmiennymi protokołami.

W grupie 16 chorych w 4. stopniu zaawansowania powyżej 1. r.ż. leczonych według programu „TOKIO” i 12 według protokołu HR-NBL-1/SIOPEN, zmarło odpowiednio: 15 i 7 (w tym z powodu powikłań odpowiednio: 1 i 2 chorych). Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w częstości występowania zgonów z powodu NBL pomiędzy grupą pacjentów leczonych programem japońskim i europejskim ($p=0,13$). Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS dla pacjentów leczonych według protokołu TOKIO wynosiło odpowiednio: 0,47 i 0,27, a według protokołu HR-NBL-1/SIOPEN: 0,5. Krzywa OS dla terapii HR-NBL-1/SIOPEN osiągnęła plateau po 38 miesiącach, a dla protokołu TOKIO wstępnie po 37 miesiącach, ale po 85 miesiącach odnotowano jedno późne zdarzenie niekorzystne (Rysunek 22) Prawdopodobieństwo ponad 5-letnich OS dla dzieci leczonych według programu europejskiego było wyższe niż dla leczonych programem japońskim, ale różnica między grupami nie była znamienna statystycznie ($p=0,67$).

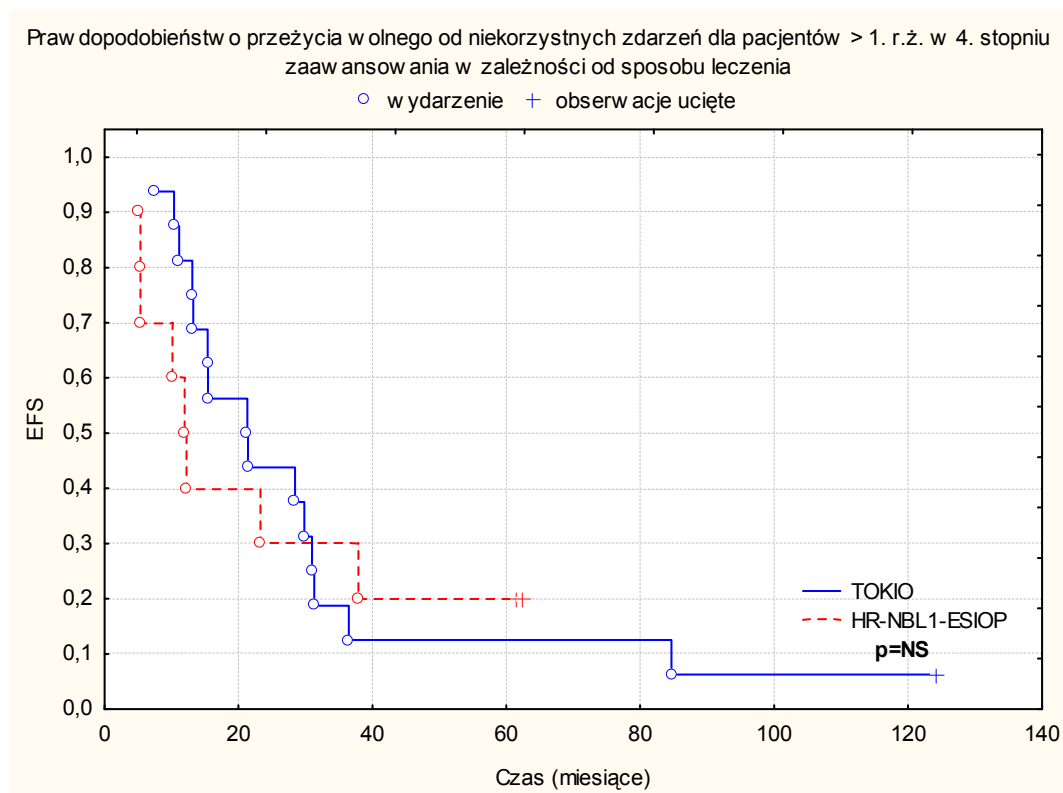
W grupie 16 chorych leczonych według programu „TOKIO” i 12 według protokołu HR-NBL-1/SIOPEN niekorzystne wydarzenia stwierdzono odpowiednio u: 15 i 10 (w tym zgony z powodu powikłań odpowiednio u: 1 i 2 chorych). Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w częstości występowania niekorzystnych zdarzeń pomiędzy grupą pacjentów leczonych programem japońskim i europejskim ($p=0,39$). Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego EFS dla pacjentów leczonych według protokołu TOKIO wynosiło odpowiednio: 0,17 i 0,11, według protokołu HR-NBL-1/SIOPEN odpowiednio: 0,25 i 0,17. Krzywa OS dla terapii HR-NBL-1/SIOPEN osiągnęła plateau po 22 miesiącach, dla protokołu TOKIO po 62 miesiącach (Rysunek 23). Różnica między grupami nie była znamienna statystycznie ($p=0,94$).

W grupie 16 chorych leczonych według programu „TOKIO” i 12 według protokołu HR-NBL-1/SIOPEN niepowodzenia leczenia (wcześnie progresje i wznowy choroby) stwierdzono odpowiednio w: 14 i 8 przypadkach (w tym wznowy odpowiednio u: 11 i 5 chorych). Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennych różnic pomiędzy grupą pacjentów leczonych programem japońskim i europejskim w częstości występowania niepowodzeń leczenia ($p=0,19$). Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS dla pacjentów leczonych według protokołu TOKIO wynosiło odpowiednio: 0,34 i 0,21, według protokołu HR-NBL-1/SIOPEN odpowiednio: 0,42 i 0,31. Krzywa DFS dla terapii HR-NBL-1/SIOPEN osiągnęła plateau po 38 miesiącach, dla protokołu TOKIO wstępnie po 42 miesiącach, ale po 82 i 88 miesiącach odnotowano jeszcze 2 późne wznowy (Rysunek 24). Prawdopodobieństwo ponad 5-letnich DFS dla dzieci leczonych według programu europejskiego było wyższe niż dla leczonych programem japońskim, ale różnica między grupami nie była znamienna statystycznie ($p=0,88$).

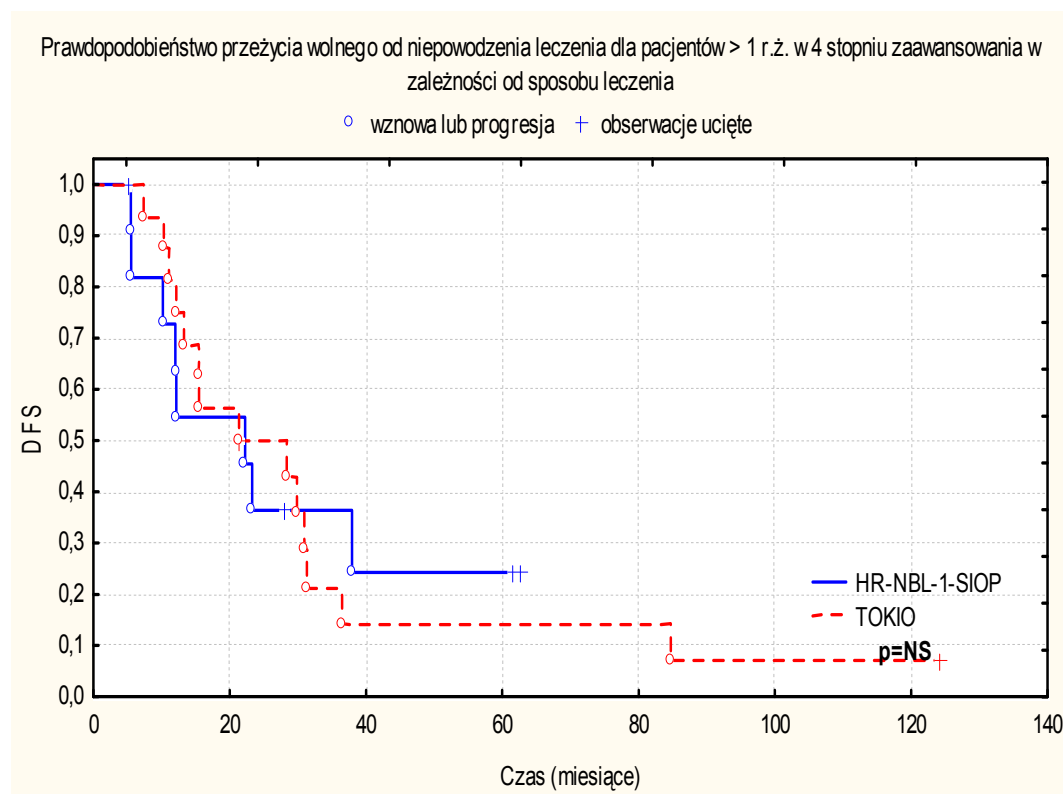
Rysunek 22. Krzywe przeżycia całkowitego dla pacjentów z NBL w 4. stopniu zaawansowania powyżej 1 r.ż. w zależności od sposobu leczenia.



Rysunek 23. Krzywe przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń dla pacjentów z NBL w 4. stopniu zaawansowania powyżej 1. r.ż. w zależności od sposobu leczenia.



Rysunek 24. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia dla pacjentów z NBL w 4. stopniu zaawansowania powyżej 1. r.ż. w zależności od sposobu leczenia



Uzyskane wyniki leczenia dla całej analizowanej w tej pracy grupy pacjentów z NBL przedstawiono zbiorczo w tabeli (Tabela 11). Ze względu na to, że badano tylko te dzieci, dla których był dostępny materiał do badań immunohistochemicznych, co stanowiło 60% wszystkich dzieci z NBL objętych terapią w Klinice w analizowanym okresie, przedstawione rezultaty mogą nie odzwierciedlać rzeczywistości uzyskanych wyników leczenia.

Tabela 11 Wyniki leczenia 60 dzieci z neuroblastoma

Oceniany parametr			Liczba pacjentów (%)	
Uzyskane I remisje całkowite			43 (71,6)	
Uzyskane I remisje częściowe			7 (11,7)	
Bez uzyskanej remisji			10 (16,7)	
Progresja choroby przed uzyskaniem remisji			12 (20,0)	
Wznowy			19 (31,7)	
Uzyskane II remisje			3 (5,0)	
W trakcie leczenia wznowy/progresji			4 (6,7)	
Żyjący	w I remisji		24 (40)	
	po wznowie		7 (11,7)	
Zgony	Wszystkie		29 (48,3)	
	z powodu NBL		23 (38,3)	
	z powodu powikłań	w I remisji	6 (10,0)	1 (1,7)
		przed uzyskaniem remisji		5 (8,3)

8. Stężenie dehydrogenazy mleczanowej

Przedstawiono wyniki badań dotyczące występowania zgonów oraz niepowodzeń terapii (wstępna progresja lub wznowa) i analizę odpowiednich krzywych przeżycia u pacjentów ze stężeniem LDH przy diagnozie powyżej i poniżej 3-krotnej wartości normy dla wieku.

Ocenie poddano 56 pacjentów, w tym 30 z poziomem LDH przekraczającym 3-krotnie normę dla wieku i 26 z poziomem LDH poniżej 3-krotnej wartości normy dla wieku. Do badań nie włączono 4 dzieci ze względu na brak wstępnej (przed rozpoczęciem leczenia) oceny stężenia LDH w surowicy.

Średnia wartość stężenia LDH w całej grupie pacjentów (Tabela 7) wynosiła 2624,1 U/l, mediana 1534 U/l (zakres 209,1-22 500 U/l).

• Zgony i przeżycia całkowite

Spośród 56 analizowanych pacjentów zmarło 27, w tym 22 z powodu NBL. Średnie stężenie LDH u pacjentów żyjących wynosiło 1726 U/l, mediana 1243 U/l (zakres 207-9026 U/l). Dla pacjentów zmarłych z powodu NBL wartości te wynosiły odpowiednio: 4281 U/l i 2250 U/l (zakres 264-6961 U/l).

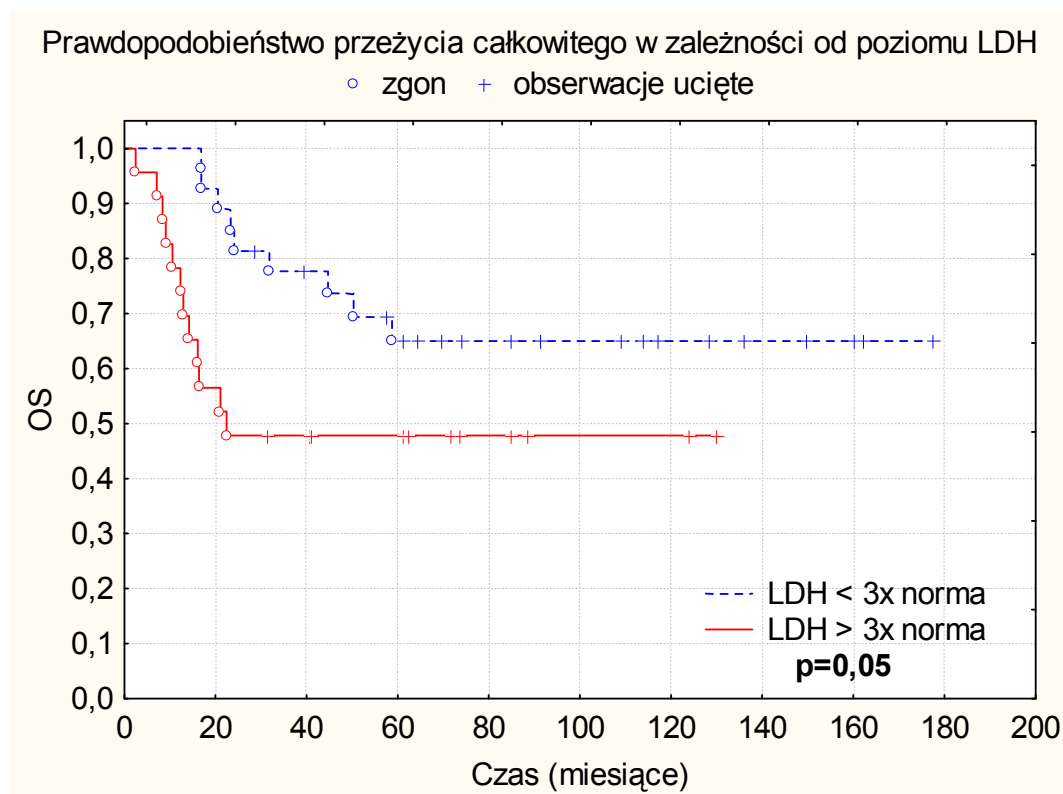
Przy zastosowaniu testu χ^2 nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu zgonów spowodowanych bezpośrednio NBL u pacjentów w zależności od stężenia LDH poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku ($\chi^2=1,8$, $p=0,18$).

W grupie 30 pacjentów ze stężeniem LDH nieprzekraczającym 3-krotnej wartości normy było 12 zgonów, w tym 10 związanych NBL (17,8%). Czas do wystąpienia zgonu z dowolnej przyczyny wynosił 16,8-58,6 (mediana 23,7) miesięcy, zgonu z powodu NBL 17,0-58,6 (mediana 28,0) miesięcy. Żyje 18 dzieci (czas obserwacji 28,4-177,3 /mediana 120,5/ miesięcy). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci ze stężeniem LDH nieprzekraczającym 3-krotnej granicy normy dla wieku wynosił 28,4-177,3 (mediana 100,3) miesięcy. Krzywa OS dla zgonów z NBL (Rysunek 25) osiągnęła *plateau* po 59 miesiącach od rozpoznania NBL.

W grupie 26 pacjentów ze stężeniem LDH podwyższonym wyjściowo powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku było 15 zgonów, w tym 12 z powodu NBL. Czas do wystąpienia zgonu z dowolnej przyczyny wynosił 2,5-27,9 (mediana 12,4) miesięcy, z powodu NBL 2,5-22,4 (mediana 12,7) miesięcy. Żyje 11 dzieci (czas obserwacji 31,4-124,1 /mediana 71,7/ miesięcy). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z podwyższonym ponad 3-krotnie stężeniem LDH powyżej normy dla wieku wynosił 2,5-124,1 (mediana 21,8) miesięcy. Krzywa OS dla zgonów z NBL (Rysunek 25) osiągnęła *plateau* po 22 miesiącach od rozpoznania NBL.

Przy uwzględnieniu wyłącznie zgonów spowodowanych bezpośrednio NBL, prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS dla pacjentów z poziomem LDH poniżej 3-krotnej wartości normy dla wieku wynosiło 0,78 i 0,65, a dla pacjentów z poziomem LDH powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku 0,48 (Rysunek 25). Różnice między grupami (test log-rank) były na granicy istotności statystycznej ($p=0,05$).

Rysunek 25. Krzywe przeżycia całkowitego dla całej grupy pacjentów (zgony z NBL) w zależności od wyjściowego stężenia LDH poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku



- Niepowodzenia leczenia i przeżycie wolne od niepowodzenia leczenia**

Spośród 56 analizowanych pacjentów niepowodzenie leczenia obserwowano w 29 przypadkach, w tym 18 wznów.

Średnie stężenie LDH u pacjentów żyjących bez niepowodzenia leczenia wynosiło 2404 U/l, mediana 1153 U/l (zakres 264-22 500 U/l). Dla pacjentów, u których wystąpiła wznova lub progresja wartości te wynosiły odpowiednio: 2747 U/l i 2250 U/l (zakres 207-9026 U/l).

Przy zastosowaniu testu χ^2 nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu wznowy lub progresji choroby u pacjentów w zależności od stężenia LDH poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku ($\chi^2=3,6$, $p=0,058$).

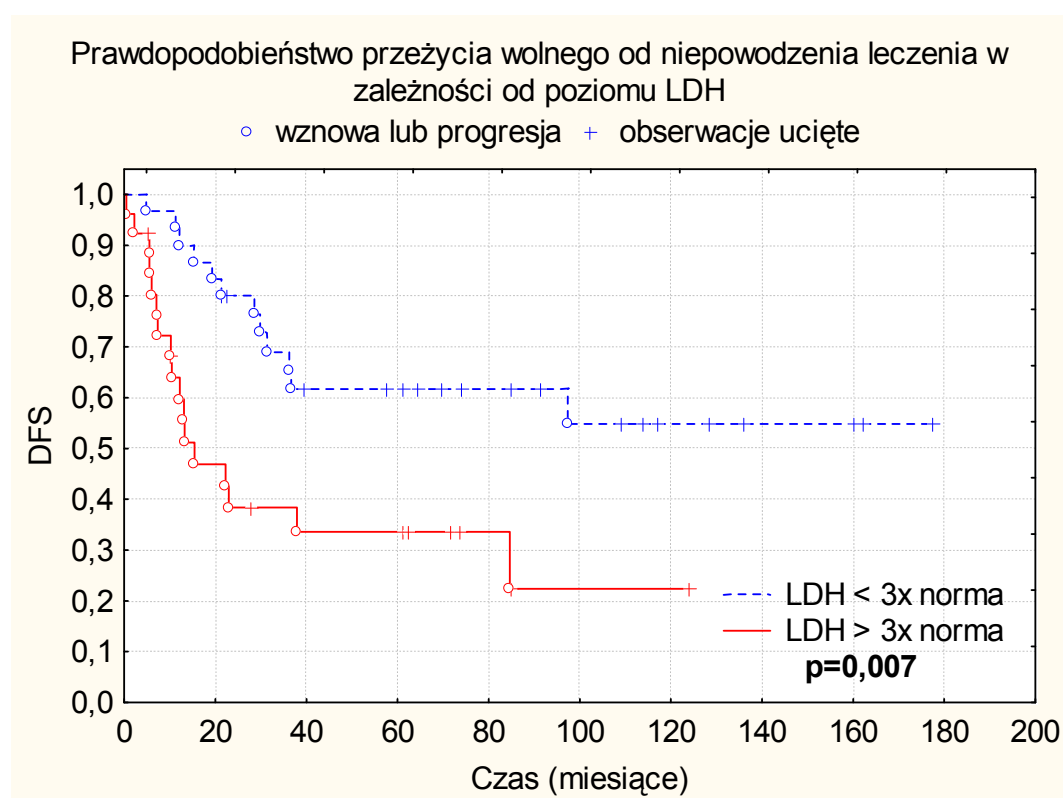
W grupie 30 pacjentów ze stężeniem LDH nieprzekraczającym 3-krotnej wartości normy było 12 niepowodzeń leczenia, w tym 9 wznów. Czas do wystąpienia wznowy lub progresji choroby wynosił 4,9-97,6 (mediana 24,9) miesięcy. Niepowodzenie leczenia nie wystąpiło u 18 dzieci (czas obserwacji 21,4-177,3 /mediana 88,2/ miesięcy). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z poziomem LDH nieprzekraczającym 3-krotnej granicy normy dla wieku wynosił 4,9-177,3 (mediana 59,3) miesięcy. Krzywa DFS (Rysunek 26) osiągnęła wstępne *plateau* po 39 miesiącach od rozpoznania NBL, po 97 miesiącach wystąpiła jedna późna wznova.

W grupie 26 pacjentów ze stężeniem LDH podwyższonym wyjściowo powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku było 17 niepowodzeń leczenia, w tym 9 wznów. Czas do wystąpienia wznowy lub

progresji wynosił 0,5-84,4 (mediana 10,4) miesiąca. Niepowodzenie leczenia nie wystąpiło u 9 dzieci (czas obserwacji 5,1-124,1 /mediana 62,50/ miesięcy). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z podwyższonym stężeniem LDH ponad 3-krotnie powyżej normy dla wieku wynosił 0,5-124,1 (mediana 13,2) miesięcy. Krzywa DFS (Rysunek 26) osiągnęła wstępne *plateau* po 38 miesiącach od rozpoznania NBL, po 84 miesiącach wystąpiła jedna późna wznowa.

Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS dla pacjentów z poziomem LDH poniżej 3-krotnej wartości normy dla wieku wynosiło 0,69 i 0,62, a dla pacjentów z poziomem LDH powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku 0,38 i 0,33 (Rysunek 26). Różnice między grupami (test log-rank) były istotne statystycznie ($p=0,007$).

Rysunek 26. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia dla całej grupy dzieci w zależności od stężenia LDH poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku



9. Stężenie enolazy neurospecyficznej

Przedstawiono wyniki badań dotyczące występowania zgonów i niepowodzeń terapii (wstępna progresja lub wznowa) i analizę odpowiednich krzywych przeżycia u pacjentów ze stężeniem NSE przy diagnozie powyżej i poniżej 3-krotnej wartości normy dla wieku.

Ocenie poddano 11 pacjentów, w tym 3 z poziomem NSE nieprzekraczającym 3-krotnie normy dla wieku i 8 z poziomem NSE powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku. Do badań nie włączono 49 dzieci ze względu na brak wstępnej (przed rozpoczęciem leczenia) oceny stężenia NSE w surowicy. Średnia wartość stężenia NSE w całej grupie pacjentów wynosiła 253,5 ng/ml, mediana 226 ng/ml (zakres 12,0-277 ng/ml).

- **Zgony i przeżycia całkowite**

Spółród 11 analizowanych pacjentów zmarło 4, wszyscy z powodu NBL.

Średnie stężenie NSE u pacjentów żyjących wynosiło 152 ng/ml, mediana 172 ng/ml (zakres 12-316 ng/ml). Dla pacjentów zmarłych z powodu NBL wartości te wynosiły odpowiednio 430 ng/ml i 376 ng/ml (zakres 171-777 ng/ml).

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu zgonów spowodowanych bezpośrednio NBL u pacjentów w zależności od stężenia NSE poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku ($p=0,21$).

W grupie 3 pacjentów ze stężeniem NSE nieprzekraczającym 3-krotnej wartości normy nie było zgonów. Czas obserwacji wynosił 12,0-67,2 (mediana 39,6) miesiąca.

W grupie 8 pacjentów ze stężeniem NSE podwyższonym wyjściowo powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku były 4 zgony, wszystkie z powodu NBL. Czas do wystąpienia zgonu wynosił 10,6-24,2 (mediana 17,4) miesiąca. W grupie pacjentów żyjących czas obserwacji wynosił 31,4-84,5 (mediana 40,8) miesiąca. Czas obserwacji dla całej grupy pacjentów ze stężeniem NSE podwyższonym powyżej 3-krotnej granicy normy dla wieku wynosił 10,6-84,5 (mediana 27,8) miesiąca.

Ze względu na małą liczebność ocenianych podgrup nie wykonano analiz porównawczych.

- **Niepowodzenia leczenia i przeżycia wolne od niepowodzenia leczenia**

Spółród 11 analizowanych pacjentów obserwowano 8 niepowodzeń leczenia, w tym 5 wznów.

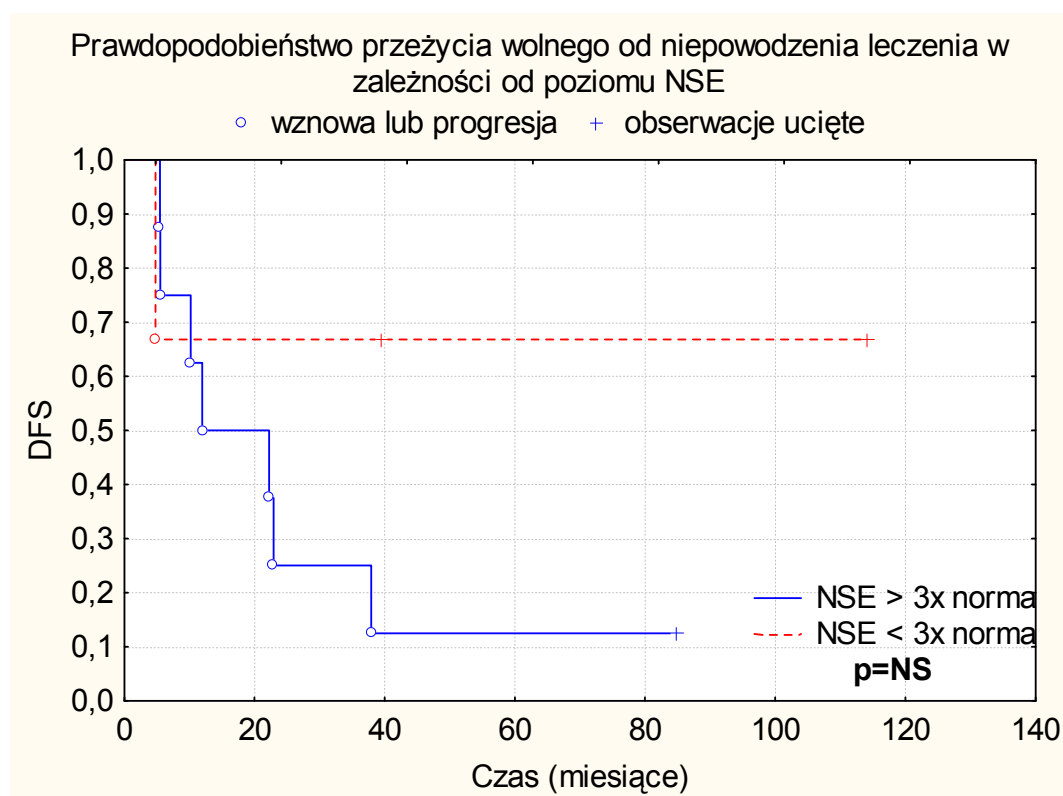
Średnie stężenie NSE u pacjentów żyjących bez niepowodzenia leczenia wynosiło 92,5 ng/ml, mediana 67,2 ng/ml (zakres 40-172 ng/ml). Dla pacjentów, u których wystąpiła wznowa lub progresja wartości te wynosiły odpowiednio 314 ng/ml i 275 ng/ml (zakres 12-777 ng/ml). Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu wznowy lub progresji choroby u pacjentów w zależności od stężenia NSE przy diagnozie ($p=0,15$).

Wśród 3 pacjentów ze stężeniem NSE nieprzekraczającym 3-krotnej wartości normy obserwowano 1 wznowę 4,9 miesiąca od rozpoczęcia leczenia.

W grupie 8 pacjentów ze stężeniem NSE podwyższonym wyjściowo powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku było 7 niepowodzeń leczenia, w tym 4 wznowy. Czas do wystąpienia niepowodzenia leczenia wynosił 10,6-24,2 (mediana 17,4) miesiąca. W grupie pacjentów bez niepowodzenia leczenia czas obserwacji wynosił 31,4-84,5 (mediana 40,8) miesiąca. Czas obserwacji dla całej grupy pacjentów ze stężeniem NSE podwyższonym powyżej 3-krotnej granicy normy dla wieku wynosił 10,6-84,5 (mediana 27,8) miesiąca.

Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS dla pacjentów z poziomem NSE poniżej 3-krotnej wartości normy dla wieku wynosiło 0,69 i 0,62, a dla pacjentów z poziomem NSE powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku 0,25 i 0,12 (Rysunek 27). Różnice między grupami (test log-rank) nie były istotne statystycznie ($p=0,23$).

Rysunek 27. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia w zależności od stężenia NSE poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku



10. Stężenie ferrytyny

Przedstawiono wyniki badań dotyczące występowania zgonów i niepowodzeń terapii (wstępna progresja lub wznowa) i analizę odpowiednich krzywych przeżycia u pacjentów ze stężeniem ferrytyny przy diagnozie powyżej i poniżej 3-krotnej wartości normy dla wieku.

Ocenie poddano 42 pacjentów, w tym 12 z poziomem ferrytyny nieprzekraczającym 3-krotnie normę dla wieku i 30 z poziomem NSE powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku. Do badań nie włączono 8 dzieci ze względu na brak wstępnej (przed rozpoczęciem leczenia) oceny stężenia ferrytyny w surowicy.

Średnia wartość stężenia ferrytyny w całej grupie pacjentów wynosiła 510,4 µg/l, mediana 204,9 µg/l (zakres 13,1-1558,0 µg/l).

- **Zgony i przeżycia całkowite**

Spśród 42 analizowanych pacjentów zmarło 24, w tym 19 z powodu NBL.

Średnie stężenie ferrytyny u pacjentów żyjących wynosiło 300 µg/l, mediana 192 µg/l (zakres 14-1342 µg/l). Dla pacjentów zmarłych z powodu NBL wartości te wynosiły odpowiednio: 795 µg/l i 268 µg/l (zakres 32-1558 µg/l).

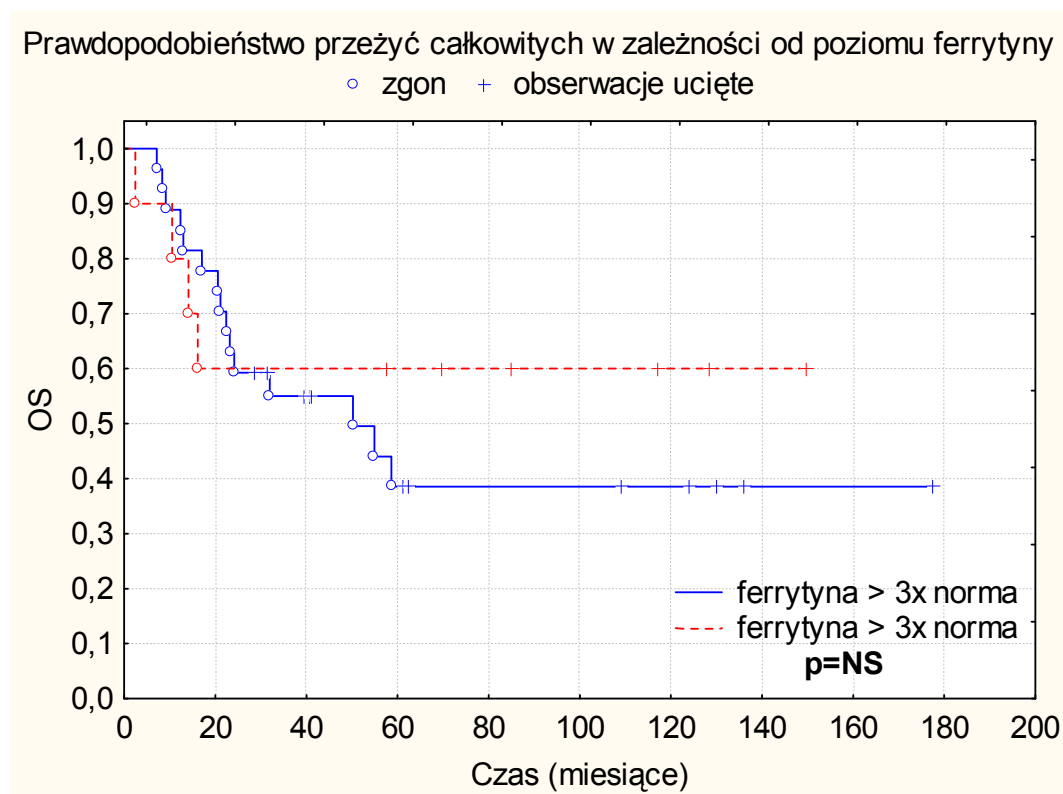
Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu zgonów spowodowanych bezpośrednio NBL u pacjentów w zależności od stężenia ferrytyny poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku ($p=0,32$).

W grupie 12 pacjentów ze stężeniem ferrytyny nieprzekraczającym 3-krotnej wartości normy było 6 zgonów, w tym 4 spowodowane bezpośrednio NBL (9,5%). Czas do wystąpienia zgonu z dowolnej przyczyny wynosił 2,6-27,9 (mediana 15,7) miesięcy, zgonu z powodu NBL 2,5-14,2 /mediana 12,4/ miesiąca. Żyje 6 dzieci (czas obserwacji 57,6-149,8 (mediana 101,0) miesiąca). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z poziomem ferrytyny nieprzekraczającym 3-krotnej granicy normy dla wieku wynosił 2,6-149,8 (mediana 42,7) miesięcy. Krzywa OS dla zgonów z NBL (Rysunek 28) osiągnęła *plateau* po 14 miesiącach od rozpoznania NBL.

W grupie 30 pacjentów ze stężeniem ferrytyny podwyższonym wyjściowo powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku było 18 zgonów, w tym 15 z powodu NBL. Czas do wystąpienia zgonu z dowolnej przyczyny wynosił 5,1-58,6 (mediana 20,8) miesięcy, zgonu z powodu NBL 7,2-58,6 (mediana 21,3) miesiąca. Żyje 12 dzieci (czas obserwacji 57,6-149,8 /mediana 101,0/ miesiąca). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z poziomem ferrytyny przekraczającym 3-krotnie granicę normy dla wieku wynosił 5,1-177,3 (mediana 21,3) miesięcy. Krzywa OS dla zgonów z NBL (Rysunek 28) osiągnęła *plateau* po 59 miesiącach od rozpoznania NBL.

Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego OS dla pacjentów z poziomem ferrytyny poniżej 3-krotnej wartości normy dla wieku wynosiło 0,6, a dla pacjentów z poziomem ferrytyny powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku 0,55 i 0,38 (Rysunek 28). Różnice między grupami (test log-rank) nie były istotne statystycznie ($p=0,53$).

Rysunek 28. Krzywe przeżycia całkowitego dla wszystkich dzieci z NBL w zależności od stężenia ferrytyny poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku



- Niepowodzenia leczenia i przeżycia wolne od niepowodzenia leczenia**

Spośród 42 analizowanych pacjentów niepowodzenia leczenia obserwowano u 25, w tym 15 wznów.

Średnie stężenie ferrytyny u pacjentów żyjących bez niepowodzenia leczenia wynosiło 279 $\mu\text{g/l}$, mediana 176 $\mu\text{g/l}$ (zakres 14-1342 $\mu\text{g/l}$). Dla pacjentów, u których wystąpiła wznova lub progresja choroby wartości te wynosiły odpowiednio 442 $\mu\text{g/l}$ i 318 $\mu\text{g/l}$ (zakres 18-1558 $\mu\text{g/l}$).

Przy zastosowaniu testu χ^2 nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu wznowy lub progresji choroby u pacjentów w zależności od stężenia ferrytyny poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku ($\chi^2=2,2$, $p=0,14$).

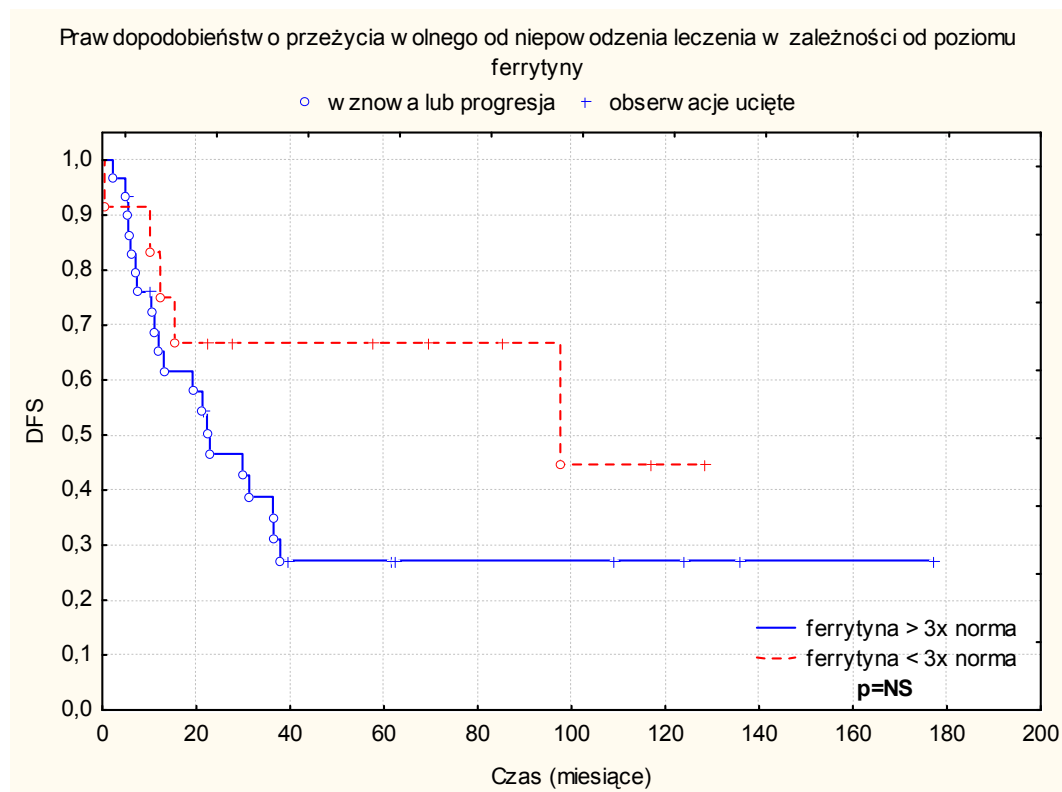
W grupie 12 pacjentów ze stężeniem ferrytyny nieprzekraczającym 3-krotnej wartości normy było 5 niepowodzeń leczenia, w tym 3 wznowy. Czas do wystąpienia wznowy lub progresji choroby wynosił 0,5-97,6 (mediana 12,2) miesięcy. Niepowodzenia leczenia nie obserwowano u 7 dzieci (czas obserwacji 22,4-128,5 /mediana 69,5/ miesiąca). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci z poziomem ferrytyny nieprzekraczającym 3-krotnej granicy normy dla wieku wynosił 0,5-128,5 (mediana 57,6) miesięcy. Krzywa DFS (Rysunek 29) osiągnęła wstępne *plateau* po 17 miesiącach od rozpoznania NBL, po 97 miesiącach obserwowano 1 późną wznowę.

W grupie 30 pacjentów ze stężeniem ferrytyny podwyższonym wyjściowo powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku było 20 niepowodzeń leczenia, w tym 12 wznów. Czas do wystąpienia wznowy lub progresji wynosił 4,9-37,9 (mediana 12,5) miesięcy. Niepowodzenie leczenia nie wystąpiło u 10 dzieci (czas obserwacji 5,1-177,3 /mediana 61,9/ miesiąca). Czas obserwacji dla całej grupy dzieci

z poziomem ferrytyny przekraczającym 3-krotnie granicę normy dla wieku wynosił 5,1-177,3 (mediana 21,4) miesięcy. Krzywa DFS (Rysunek 29) osiągnęła *plateau* po 38 miesiącach od rozpoznania NBL.

Prawdopodobieństwo ponad 3-letniego i 5-letniego DFS dla pacjentów z poziomem ferrytyny poniżej 3-krotnej wartości normy dla wieku wynosiło 0,67, a dla pacjentów z poziomem ferrytyny powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku 0,39 i 0,27 (Rysunek 29). Różnice między grupami (test log-rank) nie były istotne statystycznie ($p=0,33$).

Rysunek 29. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia dla wszystkich dzieci z NBL w zależności od wyjściowego stężenia ferrytyny poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku



4.3. Analiza wpływu intensywności ekspresji białka Id2 i odsetka komórek NBL z obecną amplifikacją białka Id2 na występowanie zgonów oraz niepowodzeń leczenia i przeżycie całkowite, oraz przeżycie wolne od choroby

Analizę wpływu intensywności ekspresji białka Id2 wykonano zarówno dla całej grupy, jak i w podgrupach, które wyodrębniono na podstawie wybranych czynników prognostycznych, tj, wieku, stopnia zaawansowania i obecności amplifikacji genu MYCN. Badano również wpływ odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na uzyskiwane wyniki leczenia.

1. Cała grupa pacjentów

Przedstawiono wyniki badań dotyczące występowania zgonów, niekorzystnych zdarzeń i niepowodzeń terapii (wstępna progresja lub wznowa) i analizę krzywych przeżycia u pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2, ocenianą w odniesieniu do kontroli (Rozdział 12.3). Badano również wpływ odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na uzyskiwane wyniki leczenia.

Ocenie poddano 60 pacjentów, w tym 50 z wysoką i 10 z niską ekspresją białka Id2. Rozkład odsetków komórek z obecną ekspresją białka Id2 dla całej grupy pacjentów przedstawiono na rysunku (Rysunek 4).

• Zgony i przeżycia całkowite

Wśród ocenianych 60 pacjentów, łącznie zmarło 29, w tym z powodu NBL 23. Zgony z NBL wystąpiły u 20 spośród 50 i u 3 spośród 10 chorych odpowiednio w grupie z wysoką i niską ekspresją białka Id2.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy pomiędzy grupą pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 w częstości występowania zgonów spowodowanych NBL ($p=0,3$). Ponad 3-letnie i 5-letnie OS dla pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 wynosiło odpowiednio 0,66 i 0,55 oraz 0,7 (Rysunek 75). Różnica pomiędzy grupami nie była znamienna statystycznie ($p=0,3$).

W analizie z zastosowaniem regresji logistycznej (Rysunek 59) nie wykazano wpływu odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na częstość występowania zgonów z powodu NBL ($p=0,29$).

• Niepowodzenia leczenia i przeżycia wolne od choroby

Wśród ocenianych 60 pacjentów, niepowodzenia leczenia (wznowy lub pierwotne progresje) wystąpiły łącznie u 32. Wśród 50 dzieci z wysokim i 10 z niskim poziomem ekspresji białka Id2 w komórkach NBL niepowodzenia leczenia wystąpiły odpowiednio u: 27 i 4 chorych.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy w częstości występowania wznów lub progresji choroby ($p=0,32$) pomiędzy grupą pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2.

Ponad 3-letnie i 5-letnie DFS dla pacjentów z wysokim poziomem ekspresji białka Id2 wynosiło odpowiednio 0,54 i 0,46, a z niskim poziomem ekspresji 0,7 (Rysunek 76) Różnica pomiędzy grupami nie była znamienna statystycznie ($p=0,17$).

Przy użyciu regresji logistycznej nie wykazano wpływu odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie niepowodzenia leczenia, ale ze względu na wartość $p=0,07$ można przypuszczać istnienie trendu w kierunku wzrostu prawdopodobieństwa wystąpienia niepowodzenia leczenia ze wzrostem odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 (Tabela 12).

Tabela 12 Wpływ liczby komórek z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie niepowodzeń leczenia

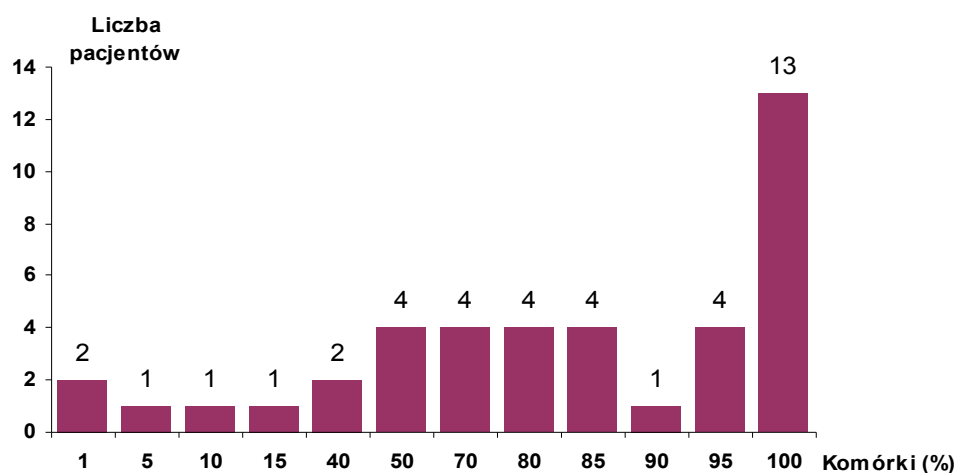
Badany parametr	Beta	SE (beta)	χ^2	p
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją Id2	-0,02	0,01	3,25	0,07

2. Grupa pacjentów powyżej 1. r.ż.

Przedstawiono wyniki badań nad występowaniem zgonów i niepowodzeń terapii (wstępna progresja lub wznowa) i analizę odpowiednich krzywych przeżycia u pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2, ocenianą w odniesieniu do kontroli. Badano również wpływ odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na uzyskiwane wyniki leczenia.

U 41 badanych pacjentów odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 w analizowanych preparatach wahał się od 1–100% (średnia: 73,7%, mediana: 85%). Liczbę przypadków w odpowiednich podgrupach przedstawiono na rysunku (Rysunek 30). Najliczniejszą grupę 17 (41,5%) pacjentów stanowili chorzy, u których stwierdzono ekspresję białka Id2 w ponad 90% komórek NBL. Natomiast grupy dotyczące niższych odsetków pozytywnych komórek NBL, obejmowały 1-8 dzieci, z tym, że w przedziale 16-39% nie było żadnego pacjenta.

Rysunek 30. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 u dzieci powyżej 1. r.ż



Wykonano również test χ^2 z poprawką Fishera w celu porównania częstości występowania bardziej intensywnej ekspresji białka Id2 w grupie pacjentów powyżej i poniżej 1. r.ż. Nie wykazano znamiennych statystycznie różnic w poziomie ekspresji białka Id2 pomiędzy pacjentami poniżej i powyżej 1. r.ż. ($p=0,39$).

W analizie z zastosowaniem testu U Manna-Whitneya nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w odsetku komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 pomiędzy pacjentami poniżej i powyżej 1. r.ż. ($p=0,27$).

• Zgony i przeżycia całkowite

Ocenie poddano 41 pacjentów, w tym 35 z wysoką i 6 z niską ekspresją białka Id2. Wśród badanych 41 pacjentów, zgony wystąpiły łącznie u 25, w tym u 20 z powodu NBL. Wśród 35 dzieci z wysokim i 6 z niskim poziomem ekspresji białka Id2 w komórkach NBL zgony z NBL wystąpiły odpowiednio w 17 i 3 przypadkach.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy pomiędzy grupą pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 w częstości występowania zgonów spowodowanych NBL ($p=0,63$). Ponad 3-letnie i 5-letnie przeżycie całkowite dla pacjentów z wysoką

i niską ekspresją białka Id2 wynosiło odpowiednio 0,65 i 0,55 oraz 0,7 (Rysunek 77). Różnica pomiędzy grupami nie była znamienna statystycznie ($p=0,31$).

W analizie z użyciem regresji logistycznej nie wykazano wpływu odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie zgonów z powodu NBL ($p=0,62$) (Rysunek 61).

- **Niepowodzenia leczenia i przeżycia wolne od choroby**

Wśród 35 ocenianych dzieci z wysokim i 6 z niskim poziomem ekspresji białka Id2 w komórkach NBL niepowodzenia leczenia stwierdzono odpowiednio w: 23 i 4 przypadkach.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy w częstości występowania niepowodzeń leczenia ($p=0,67$) pomiędzy grupą pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2. Ponad 3-letnie i 5-letnie DFS dla pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 wynosiło odpowiednio 0,4 i 0,29, a z niską ekspresją 0,5 (Rysunek 78). Różnica pomiędzy grupami nie była znamienna statystycznie ($p=0,41$).

W analizie z zastosowaniem regresji logistycznej nie wykazano wpływu odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 i występowaniem wznowy lub progresji choroby ($p=0,17$).

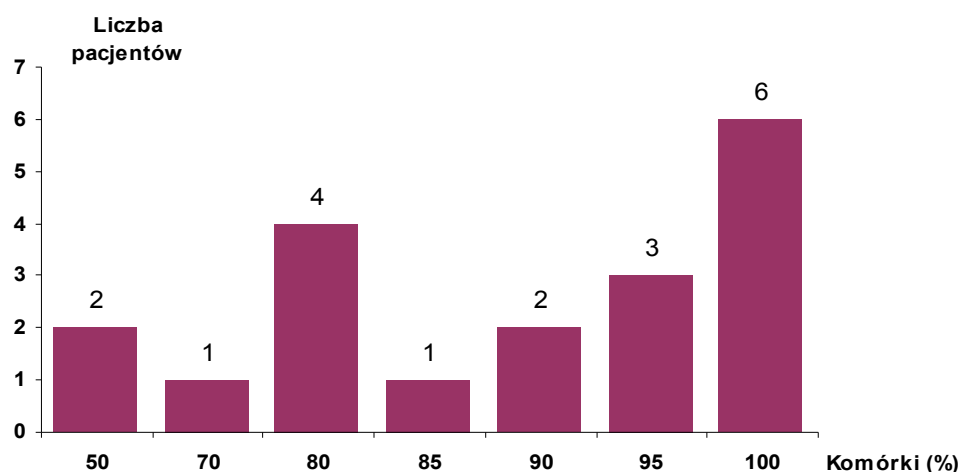
3. Grupa pacjentów poniżej 1. r.ż.

Przedstawiono wyniki badań dotyczące występowania zgonów, niekorzystnych zdarzeń i niepowodzeń terapii (wstępna progresja lub wznowa) i analizę odpowiednich krzywych przeżycia u pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2, ocenianą w odniesieniu do kontroli. Badano również wpływ odsetka komórek NBL z obecną amplifikacją białka Id2 na uzyskiwane wyniki leczenia.

Ocenie poddano 19 pacjentów, w tym 16 z wysoką i 3 z niską ekspresją białka Id2.

U 19 badanych pacjentów odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 w analizowanych preparatach wahał się od 50–100% (średnia: 86%, mediana: 90%). Liczbę przypadków w odpowiednich grupach przedstawiono na rysunku (Rysunek 31). Najliczniejszą grupę 9 (47,4%) pacjentów stanowili chorzy, u których stwierdzono ekspresję białka Id2 w ponad 90% komórek NBL. Natomiast grupy dotyczące niższych odsetków pozytywnych komórek NBL, obejmowały 1-4 dzieci.

Rysunek 31. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 u dzieci poniżej 1. r.ż.



• Zgony i przeżycia całkowite

Wśród ocenianych 19 pacjentów, zgony wystąpiły łącznie u 4 (w tym 3 z powodu NBL). Wszystkie zgony wystąpiły u chorych z wysoką ekspresją białka Id2.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy pomiędzy grupą pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 w częstości występowania zgonów z powodu NBL ($p=0,57$).

Prawdopodobieństwo ponad 3-letnich i 5-letnich OS dla grupy pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 wynosiło odpowiednio 0,78 i 1,0. Dla pacjentów z wysoką ekspresją białka Id2 krzywa OS osiągnęła *plateau* po 10 miesiącach od rozpoczęcia leczenia (Rysunek 79). Różnica między grupami nie była znamienna statystycznie ($p=0,32$).

W analizie z zastosowaniem regresji logistycznej nie wykazano wpływu odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie zgonów z powodu NBL ($p=0,81$) (Rysunek 63).

- **Niepowodzenia leczenia i przeżycia wolne od choroby**

Wśród ocenianych 19 pacjentów, niepowodzenia leczenia (wznowy lub progresje) wystąpiły u 3, wszystkie u chorych z wysoką ekspresją białka Id2.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy pomiędzy grupą pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 w częstości występowania niepowodzeń leczenia ($p=0,35$).

Ponad 3-letnie i 5-letnie przeżycie wolne od choroby dla pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 wynosiło odpowiednio 0,79 oraz 1,0 (Rysunek 80). Różnica pomiędzy grupami nie była znamienna statystycznie ($p=0,32$).

W analizie z zastosowaniem regresji logistycznej nie wykazano wpływu odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie wznowy lub progresji choroby ($p=0,86$) (Rysunek 65).

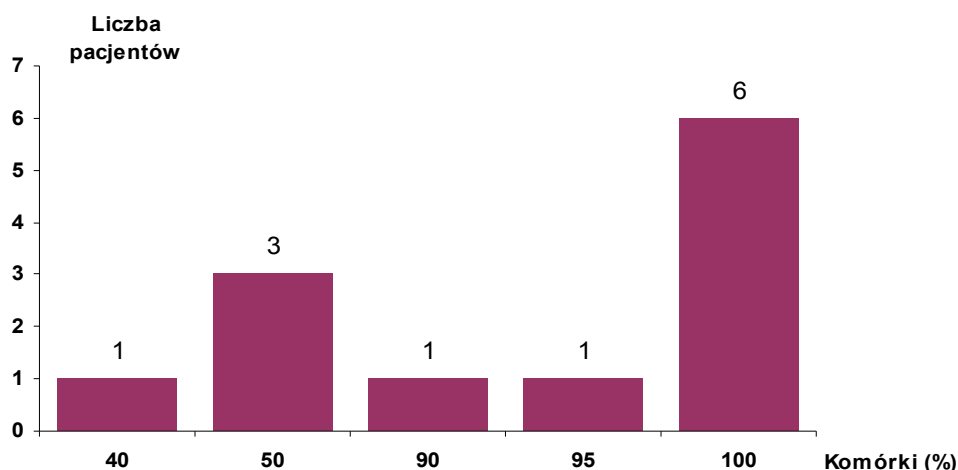
4. Grupa pacjentów z amplifikacją genu MYCN

Wśród 12 pacjentów z NBL z obecną amplifikacją genu MYCN tylko u 1 stwierdzono niski poziom ekspresji białka Id2. Z tego względu nie wykonano analiz porównawczych dotyczących częstości występowania zgonów i niepowodzeń terapii, oraz wpływu wysokiego i niskiego poziomu ekspresji białka Id2 na OS i DFS w obrębie pacjentów z obecną amplifikacją genu MYCN.

U 12 badanych pacjentów odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 w analizowanych preparatach wahał się od 40–100% (średnia: 81,2%, mediana: 97,5%). Liczbę przypadków w odpowiednich grupach przedstawiono na rysunku (Rysunek 32).

W analizie z zastosowaniem regresji logistycznej nie wykazano wpływu odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 zarówno na występowanie zgonów z powodu NBL ($p=0,75$), jak i na występowanie niepowodzenia leczenia ($p=0,51$) (Rysunek 67).

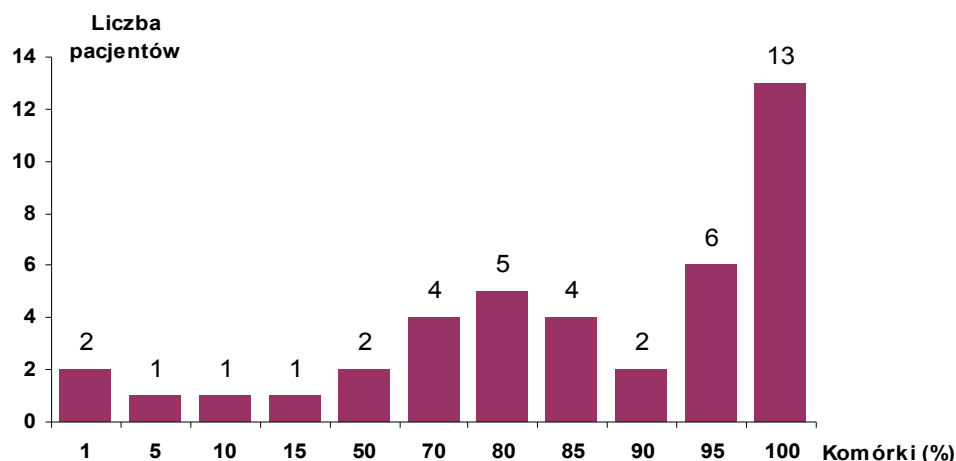
Rysunek 32. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 u dzieci z obecną amplifikacją genu MYCN



5. Grupa pacjentów bez amplifikacji MYCN

U 46 badanych pacjentów odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 w analizowanych preparatach wahał się od 1–100% (średnia: 81,2%, mediana: 97,5%). Liczbę przypadków w odpowiednich grupach przedstawiono na rysunku (Rysunek 33). Najliczniejszą grupę 19 (41,3%) pacjentów stanowili chorzy, u których stwierdzono ekspresję białka Id2 w ponad 90% komórek NBL. Natomiast grupy dotyczące niższych odsetków pozytywnych komórek NBL, obejmowały 1-6 dzieci, z tym, że w przedziale 16-49% nie było żadnego pacjenta.

Rysunek 33. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 u dzieci bez amplifikacji genu MYCN



Wykonano również test χ^2 z poprawką Fishera w celu porównania częstości występowania bardziej intensywnej ekspresji białka Id2 w grupie pacjentów z i bez amplifikacji genu MYCN. Nie wykazano znamienych statystycznie różnic w poziomie ekspresji białka Id2 pomiędzy pacjentami z obecną i nieobecną amplifikacją genu MYCN ($p=0,33$).

Wyniki analiz dotyczących porównania średnich odsetków komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 w zależności od amplifikacji genu MYCN w poszczególnych podgrupach pacjentów przedstawiono w rozdziale 4.5.3.

- **Zgony i przeżycia całkowite**

Ocenie poddano 46 pacjentów, w tym 37 z wysoką i 9 z niską ekspresją białka Id2. Wśród ocenianych 46 pacjentów, zgony wystąpiły łącznie u 19 (w tym 14 z powodu NBL). W grupie 37 dzieci z wysoką i 9 z niską ekspresją białka Id2 zgony z powodu NBL wystąpiły odpowiednio w: 12 i 2 przypadkach.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy pomiędzy grupą pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 w częstości występowania zgonów spowodowanych NBL ($p=0,33$). Ponad 3-letnie i 5-letnie przeżycie całkowite dla pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 wynosiło odpowiednio 0,75 i 0,59 oraz 0,78 (Rysunek 81). Różnica pomiędzy grupami nie była znamienna statystycznie ($p=0,3$).

W analizie z zastosowaniem regresji logistycznej nie wykazano wpływu odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie zgonów z powodu NBL ($p=0,24$) (Rysunek 65).

- **Niepowodzenia leczenia i przeżycie wolne od wznowy lub progresji**

Wśród ocenianych 46 pacjentów, niepowodzenie leczenia (wznowa lub progresja pierwotna) wystąpiło łącznie u 22. W grupie 37 dzieci z wysoką i 9 z niską ekspresją białka Id2 niepowodzenie leczenia stwierdzono odpowiednio w: 19 i 3 przypadkach.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy pomiędzy grupą pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 w częstości występowania wznowy lub progresji choroby ($p=0,28$). Ponad 3-letnie i 5-letnie DFS dla pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 wynosiło odpowiednio: 0,6 i 0,5 oraz 0,78 (Rysunek 82). Różnica pomiędzy grupami nie była istotna statystycznie ($p=0,12$).

W analizie z użyciem regresji logistycznej (Tabela 13) wpływ odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie wznów lub progresji choroby był na granicy istotności statystycznej ($p=0,05$).

Tabela 13. Wpływ odsetka komórek z ekspresją białka Id2 na występowanie wznowy lub progresji choroby u pacjentów bez amplifikacji MYCN

Badany parametr	Beta	SE (beta)	Chi ²	p
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2	-0,03	0,16	0,5	0,05

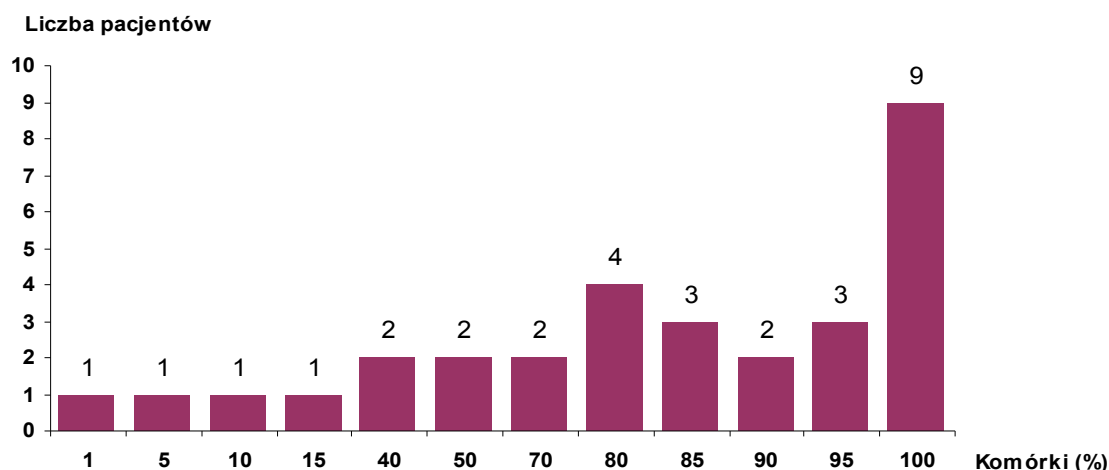
6. Pacjenci w 4. stopniu zaawansowania choroby

Ocenie poddano 31 pacjentów, w tym 29 z wysoką i 2 z niską ekspresją białka Id2.

Ze względu na bardzo małą liczbę pacjentów w grupie z niską ekspresją białka Id2 w komórkach guza (n=2) nie przeprowadzono analiz porównawczych.

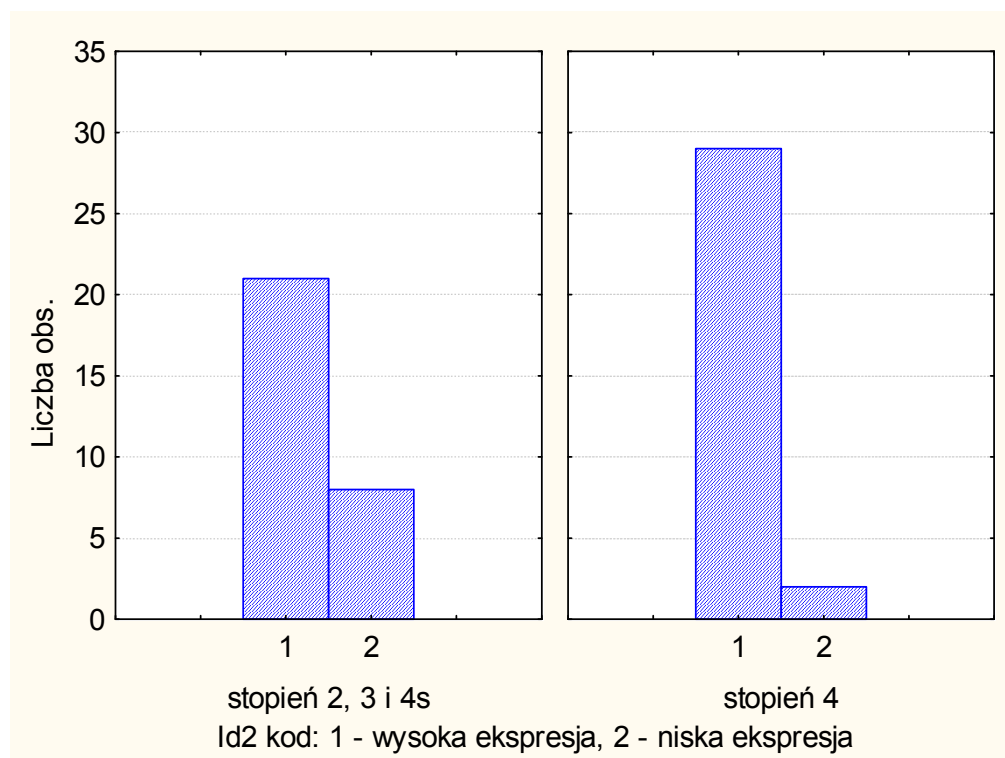
U 31 badanych pacjentów odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 w analizowanych preparatach wahał się od 1–100% (średnia: 74%, mediana: 85%). Liczbę przypadków w odpowiednich grupach przedstawiono na rysunku (Rysunek 34). Najliczniejszą grupę 12 (38,7%) pacjentów stanowili chorzy, u których stwierdzono ekspresję białka Id2 w ponad 90% komórek NBL. Natomiast grupy dotyczące niższych odsetków pozytywnych komórek NBL, obejmowały 1-5 dzieci, z tym, że w przedziale 16-39% nie było żadnego pacjenta.

Rysunek 34. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 u dzieci w 4. stopniu zaawansowania choroby



Wykonano również test χ^2 z poprawką Fishera w celu porównania częstości występowania bardziej intensywnej ekspresji białka Id2 w grupie pacjentów w 4. i innymi niż 4. stopniu zaawansowania. Wykazano istotnie statystycznie częstsze występowanie silnej ekspresji białka Id2 u pacjentów w 4. stopniu zaawansowania w porównaniu z innymi stopniami ($p=0,03$) (Rysunek 35).

Rysunek 35. Porównanie częstości występowania silnej ekspresji białka Id2 u pacjentów w 4. i innym niż 4. stopniu zaawansowania.



W analizie z zastosowaniem testu U Manna-Whitneya nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w odsetku komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 pomiędzy pacjentami w 4. stopniu zaawansowania w porównaniu z innymi stopniami ($p=0,46$).

- **Zgony i przeżycia całkowite**

Wśród ocenianych 31 pacjentów, zgony wystąpiły łącznie u 21, w tym 18 spowodowanych było NBL. W grupie 29 dzieci z wysoką i 2 z niską ekspresją białka Id2, zgony z NBL wystąpiły odpowiednio u: 19 i u obu chorych.

W analizie z zastosowaniem regresji logistycznej nie wykazano wpływu odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie zgonów z powodu NBL ($p=0,61$) ().

- **Niepowodzenia leczenia i przeżycie wolne od choroby**

Wśród ocenianych 31 pacjentów, niepowodzenia leczenia wystąpiły łącznie u 24, w tym u 22 z 29 chorych z wysoką i obu chorych z niską ekspresją białka Id2.

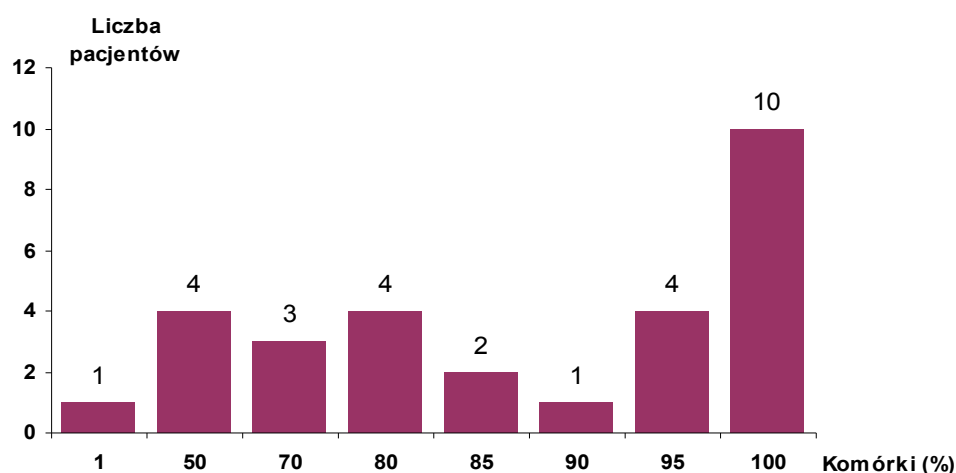
W analizie z zastosowaniem regresji logistycznej nie wykazano wpływu odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie wznowy lub progresji choroby ($p=0,51$) (Rysunek 72).

7. Grupa pacjentów w 2., 3. i 4s stopniu zaawansowania klinicznego

Przedstawiono wyniki badań nad występowaniem zgonów, niekorzystnych zdarzeń i niepowodzeń terapii (wstępna progresja lub wznowa) i analizę krzywych przeżycia u pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2, ocenianą w odniesieniu do kontroli.

U 29 badanych pacjentów odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 w analizowanych preparatach wahał się od 1–100% (średnia: 81,7%, mediana: 90%). Liczbę przypadków w odpowiednich grupach przedstawiono na rysunku (Rysunek 36). Najliczniejszą grupę 14 (48,3%) pacjentów stanowili chorzy, u których stwierdzono ekspresję białka Id2 w ponad 90% komórek NBL. Natomiast grupy dotyczące niższych odsetków pozytywnych komórek NBL, obejmowały 1-5 dzieci, z tym, że w przedziale 5-49% nie było żadnego pacjenta.

Rysunek 36. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 u dzieci w 2.,3. i 4s stopniu zaawansowania



Ocenie poddano 29 pacjentów, w tym 21 z wysoką i 8 z niską ekspresją białka Id2.

• Zgony z NBL i przeżycie całkowite

Wśród ocenianych 29 pacjentów, zgony wystąpiły łącznie u 7 (w tym 4 z powodu NBL). W grupie 21 dzieci z wysoką i 8 z niską ekspresją białka Id2 zgony z NBL wystąpiły odpowiednio u: 3 i 1 pacjenta.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znaczącej różnicy pomiędzy grupą pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 w częstości występowania zgonów spowodowanych bezpośrednio NBL ($p=0,71$). Ponad 3-letnie i 5-letnie OS w grupie pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 wynosiło odpowiednio: 0,85 oraz 0,94 i 0,88 (Rysunek 83). Różnica między grupami nie była istotna statystycznie ($p=0,81$).

W analizie z użyciem regresji logistycznej nie wykazano wpływu odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie zgonów z powodu NBL ($p=0,9$) (Rysunek 69).

- **Niepowodzenia leczenia i przeżycia wolne od choroby**

Wśród ocenianych 29 pacjentów w stopniu zaawansowania 2., 3. i 4s, niepowodzenia leczenia (wznowa lub pierwotna progresja) wystąpiły łącznie u 7. W grupie 21 dzieci z wysoką i 8 z niską ekspresją białka Id2 niepowodzenia leczenia stwierdzono odpowiednio w: 5 i 2 przypadkach.

Przy zastosowaniu testu χ^2 z poprawką Fishera nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy pomiędzy grupą pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 w częstości występowania wznów lub progresji ($p=0,56$).

Ponad 3-letnie i 5-letnie DFS dla pacjentów z wysoką i niską ekspresją białka Id2 wynosiło odpowiednio 0,87 oraz 0,8 (Rysunek 84). Różnica pomiędzy grupami nie była znamienna statystycznie ($p=0,82$).

W analizie z zastosowaniem regresji logistycznej (Rysunek 70) nie wykazano wpływu odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie niepowodzeń leczenia ($p=0,12$).

4.4. Analiza korelacji odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 z czasem przeżyć całkowitych i czasem wolnym od niepowodzenia leczenia oraz wybranymi czynnikami prognostycznymi i markerami choroby

1. Czas przeżycia całkowitego

W badaniu całej grupy pacjentów z wyłączeniem dzieci zmarłych z powodu powikłań ($n=54$), analizując współczynnik korelacji Pearsona nie stwierdzono statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy odsetkiem komórek NBL, w których stwierdzono ekspresję białka Id2, a czasem przeżycia całkowitego ($r=-0,04$, $p=0,74$) (Rysunek 92).

Korelacji takiej nie wykazano również dla:

- 36 pacjentów powyżej 1. r.ż. ($r=-0,18$, $p=0,29$)
- 18 niemowląt ($r=-0,6$, $p=0,8$)
- 29 pacjentów w 4. stopniu zaawansowania klinicznego ($r=-0,23$, $p=0,25$)
- 25 pacjentów w stopniach zaawansowania 2., 3. i 4s ($r=-0,16$, $p=0,43$)
- 41 pacjentów bez amplifikacji MYCN ($r=-0,03$, $p=0,83$)
- 11 pacjentów z amplifikacją MYCN ($r=-0,1$, $p=0,77$)

2. Czas przeżycia wolnego od choroby

W badaniu całej grupy ($n=60$), analizując współczynnik korelacji Pearsona nie stwierdzono statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy odsetkiem komórek, w których stwierdzono ekspresję białka Id2, a czasem do wystąpienia progresji lub wznowy choroby ($r=0,15$, $p=0,26$) (Rysunek 93).

Korelacji takiej nie zaobserwowano również dla:

- 41 pacjentów powyżej 1. roku życia ($r=-0,15$, $p=0,26$),
- 19 niemowląt ($r=0,07$, $p=0,77$)
- 31 pacjentów w 4. stopniu zaawansowania klinicznego ($r=0,21$, $p=0,27$)
- 29 pacjentów w stopniach zaawansowania 2., 3. i 4s ($r=0,07$, $p=0,71$)
- 46 pacjentów bez amplifikacji MYCN ($r=0,2$, $p=0,18$)
- 12 pacjentów z amplifikacją MYCN ($r=-0,003$, $p=0,99$)

3. Stężenie dehydrogenazy mleczanowej (LDH)

W badaniu całej grupy ($n=56$), analizując współczynnik korelacji Pearsona nie stwierdzono statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy odsetkiem komórek, w których stwierdzono ekspresję

białka Id2, a oznaczanym stężeniem LDH w osoczu w momencie diagnozy ($r=0,03$, $p=0,81$) (Rysunek 94).

Korelacji takiej nie zaobserwowano również dla:

- 39 pacjentów powyżej 1. r.ż. ($r=-0,09$, $p=0,57$),
- 17 niemowląt ($r=0,09$, $p=0,74$)
- 30 pacjentów w 4. stopniu zaawansowania klinicznego ($r=0,21$, $p=0,27$)
- 26 pacjentów w stopniach zaawansowania 2., 3. i 4s ($r=0,09$, $p=0,65$)
- 12 pacjentów z amplifikacją MYCN ($r=0,28$, $p=0,4$)
- 43 pacjentów bez amplifikacji MYCN ($r=-0,21$, $p=0,19$)

4. Stężenie ferrytyny w osoczu

W badaniu całej grupy pacjentów ($n=42$), analizując współczynnik korelacji Pearsona (Rysunek 95) nie stwierdzono statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy odsetkiem komórek, w których stwierdzono ekspresję białka Id2, a stężeniem ferrytyny w osoczu oznaczonej w momencie diagnozy ($r=0,02$, $p=0,89$).

Korelacji takiej nie zaobserwowano również dla:

- 32 pacjentów powyżej 1. roku życia ($r=0,02$, $p=0,89$),
- 11 niemowląt ($r=0,08$, $p=0,82$)
- 26 pacjentów w 4. stopniu zaawansowania klinicznego ($r=0,02$, $p=0,93$)
- 16 pacjentów w stopniach zaawansowania 2., 3. i 4s ($r=0,16$, $p=0,55$)
- 11 pacjentów z amplifikacją MYCN ($r=0,17$, $p=0,64$)
- 30 pacjentów bez amplifikacji MYCN ($r=0,006$, $p=0,97$)

5. Stężenie enolazy neurospecyficznej (NSE) w osoczu

W badaniu grupy pacjentów z oznaczonym wstępnie stężeniem NSE w osoczu, analizując współczynnik korelacji Pearsona stwierdzono statystycznie znamiennej negatywną korelację pomiędzy odsetkiem komórek, w których stwierdzono ekspresję białka Id2, a stężeniem NSE w osoczu w momencie diagnozy dla:

- 11 wszystkich pacjentów (Rysunek 37) - ($r=-0,73$, $p=0,017$) oraz
- 7 pacjentów powyżej 1. r.ż. (Rysunek 38) - ($r=-0,73$, $p=0,017$).

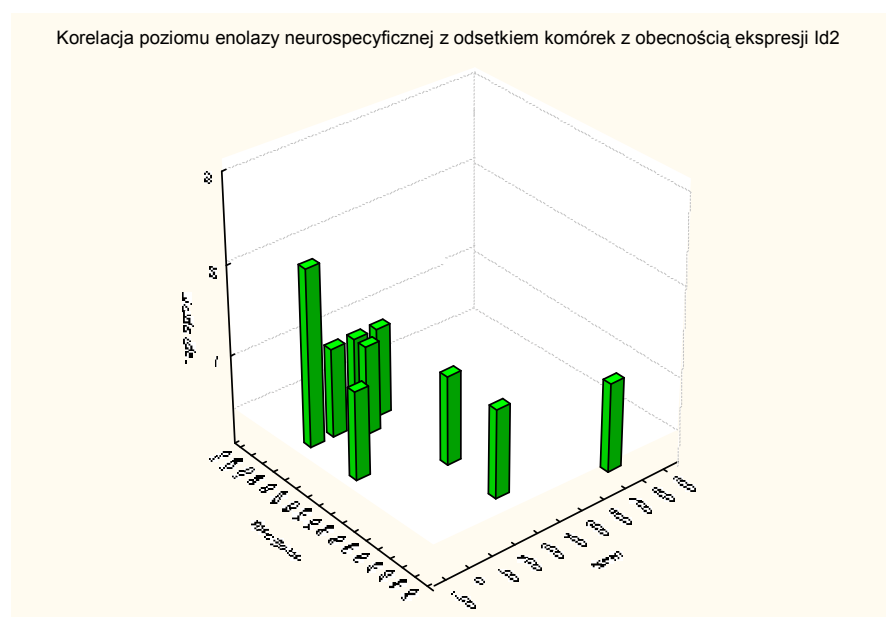
W przypadku 7 pacjentów w 4. stopniu zaawansowania stwierdzono istnienie trendu negatywnej korelacji pomiędzy odsetkiem komórek z obecną ekspresją białka Id2 ($r=-0,76$, $p=0,079$), a stężeniem NSE.

Jednakże ze względu na małą liczbę pacjentów, u których dostępne były dane dotyczące stężenia NSE, wyniki należy traktować z dużą ostrożnością.

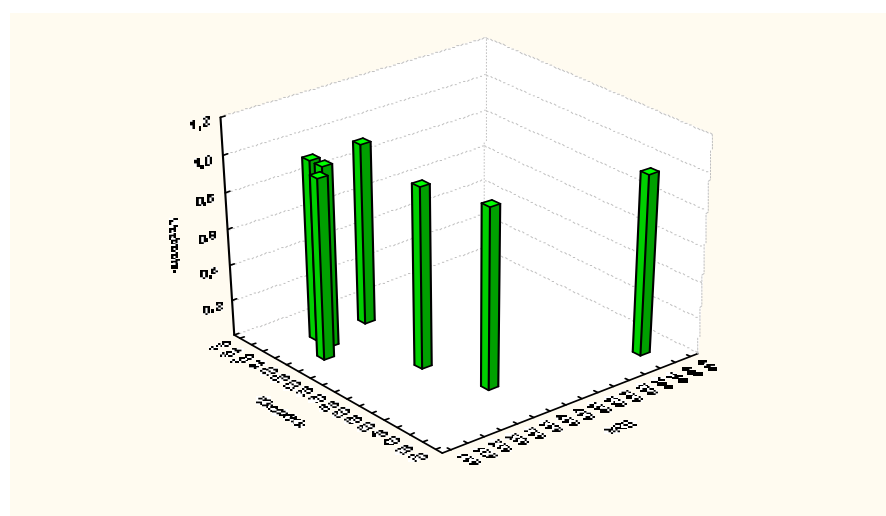
Korelacji nie zaobserwowano dla:

- 4 niemowląt ($r=0,58$, $p=0,42$)
- 4 pacjentów w stopniach zaawansowania 2., 3. i 4s ($r=0,58$, $p=0,42$)
- 7 pacjentów bez amplifikacji MYCN ($r=-0,09$, $p=0,83$)
- dla 3 pacjentów z amplifikacją MYCN nie wykonano analizy ze względu na zbyt niską liczbę przypadków

Rysunek 37. Korelacja stężenia enolazy neurospecyficznej w momencie diagnozy i odsetka komórek z ekspresją Id2 dla całej grupy



Rysunek 38. Korelacja stężenia enolazy neurospecyficznej w momencie diagnozy i odsetka komórek z ekspresją Id2 dla pacjentów powyżej 1 r.ż



4.5. Analiza różnic w występowaniu zgonów z NBL, wznowy lub progresji choroby w zależności od odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 i intensywności ekspresji tego białka

4.5.1. Ocena wpływu odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 na zgony i niepowodzenia leczenia

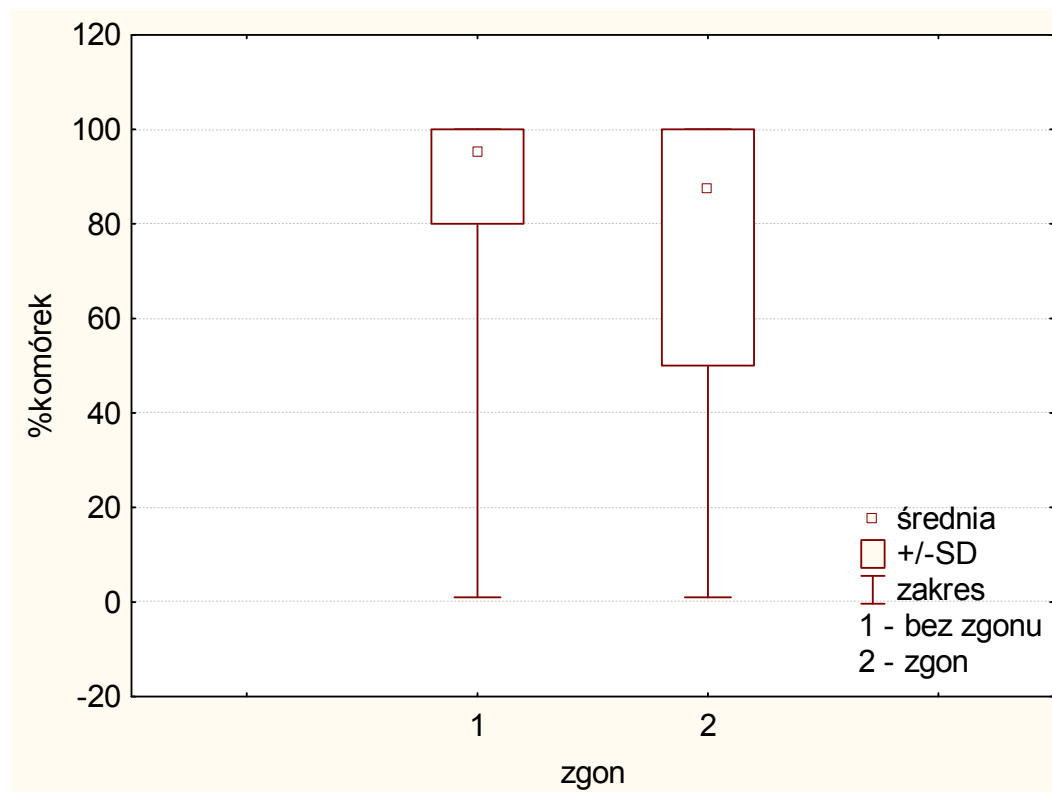
1. Wystąpienie zgonu z NBL

W badaniu całej grupy pacjentów (po wyłączeniu zgonów z powikłań) przy użyciu testu U Manna-Whitneya nie wykazano (Rysunek 39) statystycznie znamiennej różnicy w odsetku komórek z obecną ekspresją Id2 między pacjentami, u których wystąpił zgon i którzy żyją ($p=0,64$). Nie stwierdzono również znamiennych statystycznie różnic w analizowanych podgrupach (Tabela 14).

Tabela 14. Wpływ odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie zgonów z powodu NBL

Grupa oceniana (liczba pacjentów)	Zgony		Pacjenci żyjący		Wartość p
	Liczba dzieci	Średnia % pozytywnych komórek	Liczba dzieci	Średnia % pozytywnych komórek	
Cała grupa (54)	23	92	31	90	0,64
Pacjenci powyżej 1. r.ż. (36)	20	85	16	83	0,84
Pacjenci poniżej 1. r.ż. (18)	3	95	15	90	1,0
4. stopień zaawansowania (28)	19	90	9	85	0,83
2., 3. i 4s stopień zaawansowania (26)	4	95	22	90	1,0
Bez amplifikacji MYCN (41)	14	90	27	80	0,61
Z amplifikacją MYCN (11)	8	95	3	93	1,0

Rysunek 39. Średnia odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2, a występowanie zgonów z NBL



2. Wystąpienie niepowodzenia leczenia (wznowy lub progresji choroby)

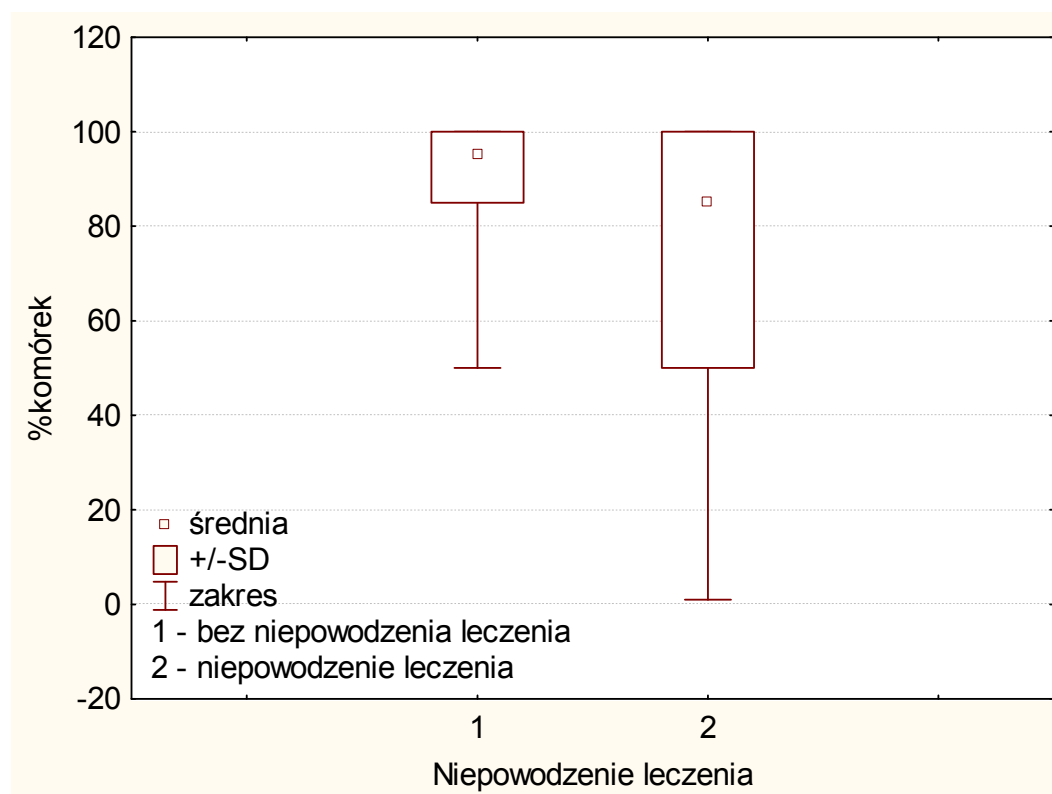
W badaniu całej grupy (n=60) z zastosowaniem testu U Manna-Whitneya (Rysunek 40) nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy w odsetku komórek z obecną ekspresją Id2 między pacjentami, u których wystąpiło niepowodzenie leczenia i pacjentami bez wznowy lub progresji choroby ($p=0,18$). Nie stwierdzono również znamienych statystycznie różnic w analizach wykonanych dla poszczególnych podgrup (Tabela 15).

Tabela 15. Wpływ odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie niepowodzenia leczenia

Grupa oceniana (liczba pacjentów)	Bez niepowodzenia leczenia		Niepowodzenie leczenia		Wartość p
	Liczba dzieci	Średnia % pozytywnych komórek	Liczba dzieci	Średnia % pozytywnych komórek	
Cała grupa (60)	28	78	32	80	0,18
Pacjenci powyżej 1. r.ż. (41)	13	85	28	85	0,38
Pacjenci poniżej 1. r.ż. (19)	15	95	4	85	0,8
4. stopień zaawansowania (31)	7	25	24	25	0,84
2., 3. i 4s stopień zaawansowania	22	95	7	80	0,23

(29)					
Z amplifikacją MYCN (12)	8	93	4	100	0,37
Bez amplifikacji MYCN (46)	24	80	22	90	0,13

Rysunek 40. Średnia odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2, a niepowodzenia leczenia (cała grupa, n=60)



4.5.2. Czas całkowitego przeżycia i czas wolny od niepowodzeń leczenia, a intensywność ekspresji białka Id2

Wykonano również analizy z zastosowaniem testu U Manna-Whitneya, w którym jako zmienną kategoryzującą potraktowano nasilenie ekspresji białka Id2, a jako zmienną ciągłą analizowano czas do wystąpienia poszczególnych wydarzeń (zgonu, niekorzystnych zdarzeń, bądź progresji lub wznowy choroby) dla całej grupy pacjentów oraz w podgrupach wyodrębnionych na podstawie obecności wybranych czynników prognostycznych. Analiza w grupie pacjentów z amplifikacją MYCN nie była możliwa ze względu na to, że tylko u jednego dziecka stwierdzono niską ekspresję białka Id2.

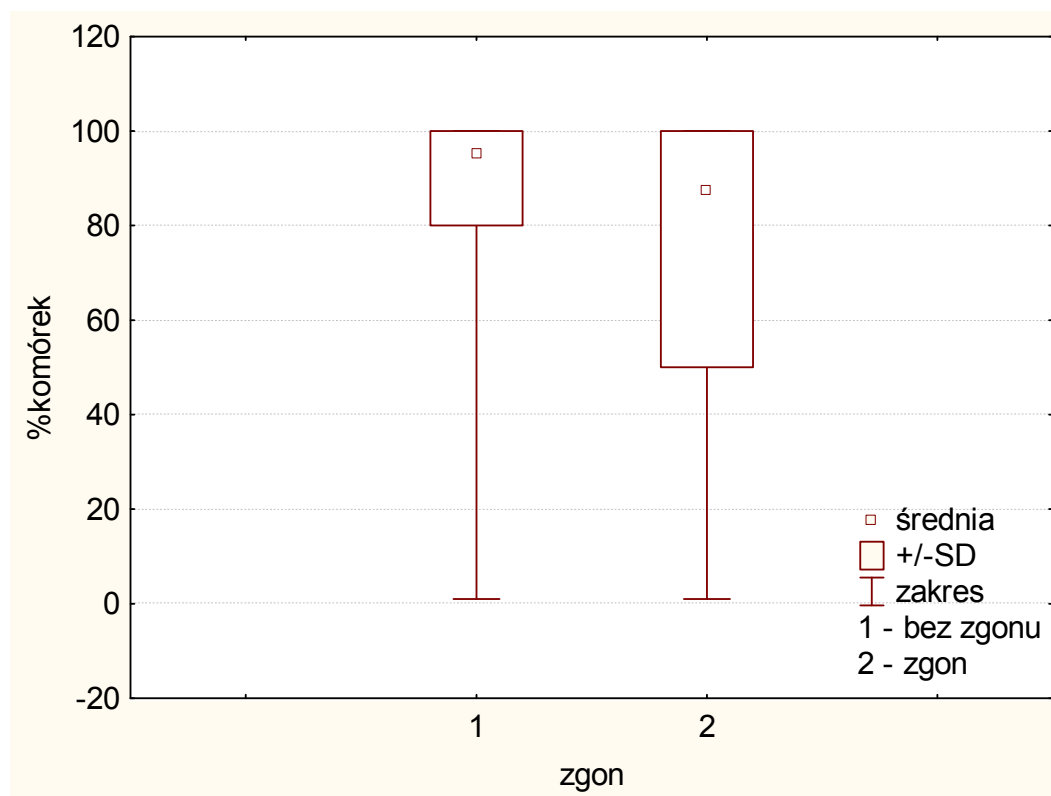
1. Całkowity czas przeżycia

Przy zastosowaniu testu U Manna-Whitneya wykazano istnienie trendu do pogorszenia OS (Rysunek 42) dla pacjentów bez amplifikacji MYCN (n=46) w przypadku obecności komórek NBL z silną ekspresją białka Id2 ($p=0,08$). W analizach wykonanych dla całej grupy pacjentów (Rysunek 41) oraz dla pozostałych podgrup nie wykazano statystycznie istotnych zależności (Tabela 16)

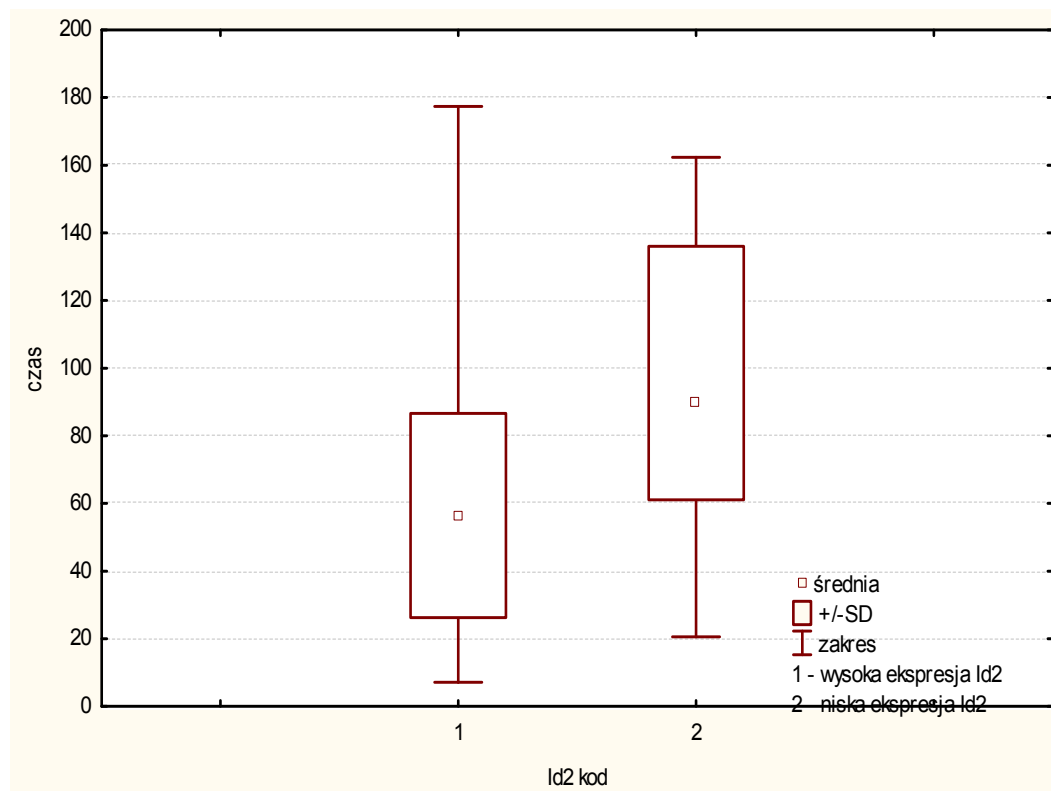
Tabela 16. Czas przeżycia całkowitego (zgon z NBL), a intensywność ekspresji białka Id2

Grupa oceniana (liczba pacjentów)	Silna ekspresja Id2			Słaba ekspresja Id2			p
	Liczba zgonów	Liczba dzieci żyjących	Średnia czasu przeżycia	Liczba zgonów	Liczba dzieci żyjących	Średnia czasu przeżycia	
Cała grupa (54)	20	24	52	3	7	78	0,11
Pacjenci powyżej 1. r.ż. (36)	17	13	40	3	3	60	0,53
Pacjenci poniżej 1. r.ż. (18)	3	12	78	0	3	115	0,24
4. stopień zaawansowania (28)	16	10	40	2	0	60	0,53
2., 3. i 4s stopień zaawansowania (26)	3	15	85	1	7	130	0,34
Bez amplifikacji genu MYCN (41)	12	20	58	2	7	80	0,08

Rysunek 41. Średnia przeżycia całkowitego (zgony z NBL), a intensywność ekspresji białka Id2 (cała grupa pacjentów, n=54)



Rysunek 42. Średnia przeżycia całkowitego (zgony z NBL), a intensywność ekspresji białka Id2 dla pacjentów bez amplifikacji MYCN (n=41)



- **Czas przeżycia wolny od choroby**

Przy zastosowaniu testu U Manna-Whitneya wykazano statystycznie istotne obniżenie DFS u pacjentów z wysoką ekspresją białka Id2 w komórkach guza:

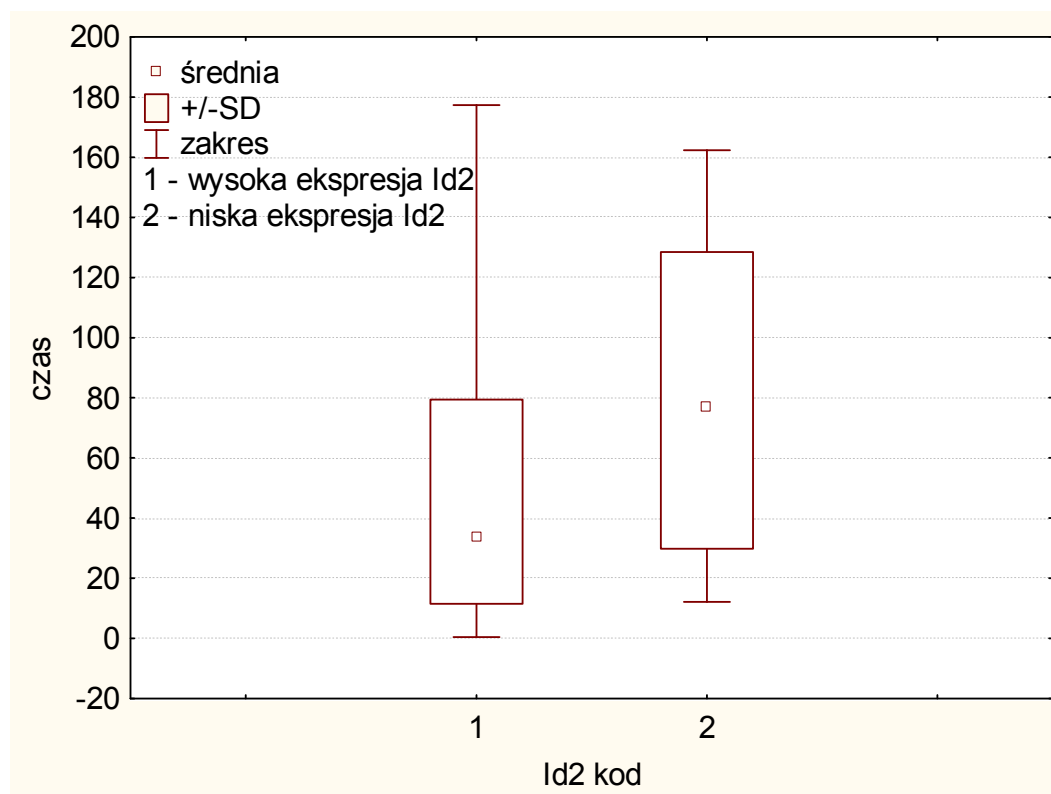
- dla całej grupy pacjentów (n=60): p=0,041 (Rysunek 43)
- dla pacjentów bez amplifikacji MYCN (n=46): p=0,047 (Rysunek 44).

Dla pozostałych podgrup nie wykazano statystycznie istotnych zależności (Tabela 17).

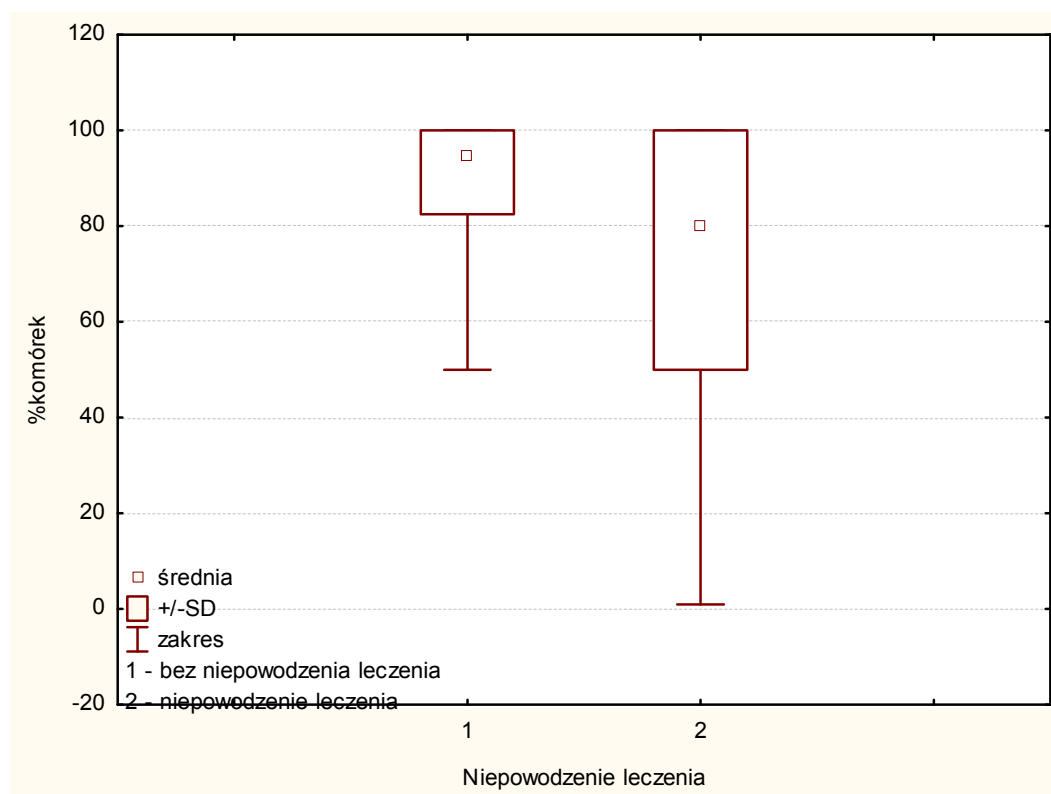
Tabela 17. Czas przeżycia wolnego od choroby a intensywność ekspresji białka Id2

Grupa oceniana (liczba dzieci)	Silna ekspresja Id2			Słaba ekspresja Id2			p
	Liczba niepowodzeń leczenia	Liczba dzieci bez niepowodzeń leczenia	Średnia DFS	Liczba niepowodzeń leczenia	Liczba dzieci bez niepowodzeń leczenia	Średnia DFS	
Cała grupa (60)	27	13	30	4	6	80	0,041
Pacjenci powyżej 1. r.ż. (41)	23	12	25	4	2	45	0,37
Pacjenci poniżej 1. r.ż. (19)	4	12	110	0	3	70	0,22
4. stopień zaawansowania (31)	22	7	20	2	0	20	0,97
2., 3. i 4s stopień zaawansowania (29)	5	16	85	2	6	90	0,5
Bez amplifikacji MYCN (46)	19	18	40	3	6	90	0,047

Rysunek 43. Średnia czasu do wystąpienia wznowy lub progresji choroby w zależności od poziomu ekspresji białka Id2 (cała grupa, n=60)



Rysunek 44. Średnia czasu do wystąpienia wznowy lub progresji choroby w zależności od poziomu ekspresji białka Id2 dla pacjentów bez amplifikacji MYCN (n=46)



4.5.3. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2, a obecna amplifikacja genu MYCN

Test U Manna-Whitneya zastosowano również w celu porównania odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 pomiędzy pacjentami z obecną i nieobecną amplifikacją genu MYCN (Tabela 18).

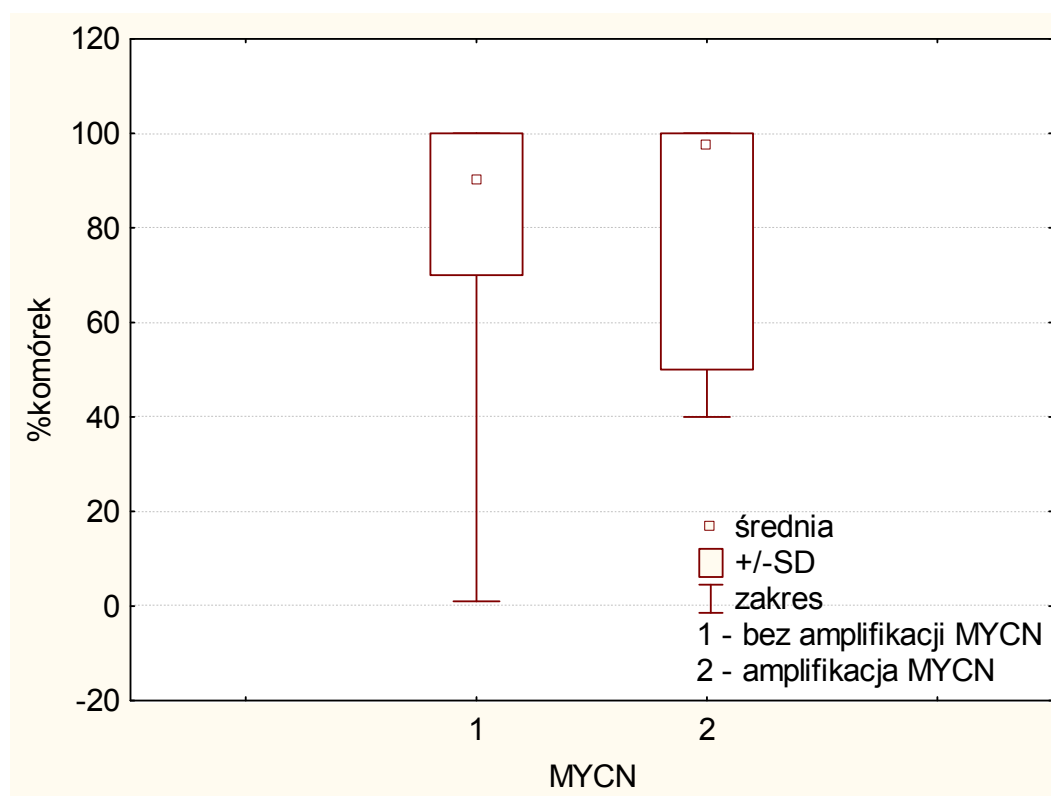
Nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w odsetku komórek z ekspresją Id2 w grupie pacjentów z i bez amplifikacji MYCN zarówno dla wszystkich pacjentów (Rysunek 45), jak i w żadnej z analizowanych podgrup.

W podgrupie pacjentów poniżej 1. r.ż. ze względu na to, że tylko w jednym przypadku stwierdzono amplifikację genu MYCN nie przeprowadzono analizy porównawczej.

Tabela 18. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2, a obecna amplifikacja genu MYCN

Grupa oceniana (liczba pacjentów)	Pacjenci bez amplifikacji MYCN		Pacjenci z amplifikacją MYCN		Wartość p
	Liczba dzieci	Średnia % pozytywnych komórek	Liczba dzieci	Średnia % pozytywnych komórek	
Cała grupa (58)	46	90	12	98	0,18
Pacjenci powyżej 1. r.ż. (39)	13	83	11	95	0,38
Pacjenci poniżej 1. r.ż. (19)	18	90	1	100	0,8
4. stopień zaawansowania (29)	20	80	9	98	0,84
2., 3. i 4s stopień zaawansowania (29)	26	90	3	75	0,23

Rysunek 45. Średni odsetek komórek z obecną ekspresją białka Id2 w zależności od obecności amplifikacji genu MYCN.



4.6 Model regresji proporcjonalnego hazardu Coxa

Przeprowadzono jednoczynnikową i wieloczynnikową analizę z zastosowaniem modelu regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w celu wyodrębnienia czynników istotnie wpływających na OS i DFS dla całej grupy i odrębnie dla poszczególnych podgrup pacjentów. W jednoczynnikowej analizie uwzględniono wszystkie dotąd badane z zastosowaniem innych metod parametry, takie jak: wiek (powyżej i poniżej 1. r.ż. oraz jako zmienną ciągłą), stopień zaawansowania (stopień 4. i inne oraz każdy stopień odrębnie), obecność amplifikacji MYCN, delekcji 1p oraz nadmiaru 17q, a także rodzaj budowy histopatologicznej guza oraz parametry biochemiczne (LDH, ferrytynę i NSE zarówno wartości średnie, jak i liczbę pacjentów z poziomem powyżej i poniżej 3x norma dla wieku) oraz intensywność ekspresji białka Id2 i odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2. Poszczególne czynniki nie były uwzględniane w badaniach, gdy liczebność wyodrębnionej na jego podstawie podgrupy była mniejsza niż 5. Do analizy wieloczynnikowej wybierano tylko te parametry, dla których w analizie jednoczynnikowej wykazano istotny statystycznie lub na pograniczu istotności wpływ na OS lub DFS. W przypadku istotnego wpływu czynników analizowanych zarówno jako zmienne ciągłe, jak i zmienne dyskretne (kodowane przedziały), do wieloczynnikowej analizy włączano cechę o wyższej istotności. Jeżeli w wyniku analizy jednoczynnikowej wykazano tylko jeden czynnik istotnie wpływający na przeżycie, to nie wykonywano analizy wieloczynnikowej. W przypadku tylko dwóch cech włączonych do analizy wieloczynnikowej, nie wykonywano badań metodą regresji krokowej. Analizę regresji krokowej kontynuowano do momentu, w którym wszystkie włączone cechy uzyskiwały znamienność statystyczną lub gdy pozostawały tylko 2 cechy, bez względu na ich istotność.

1. Wszyscy pacjenci

- **Całkowity czas przeżycia**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 19). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa, najsilniejszym czynnikiem niekorzystnie wpływającym na OS był 4. stopień zaawansowania choroby (współczynnik ryzyka: 7,2, $p=0,0004$).

Tabela 19. Wyniki jednoczynnikowej analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu poszczególnych parametrów na całkowite przeżycie dla całej grupy pacjentów (n=54)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek powyżej [36] i poniżej [18] 1. r.ż.	1,24	0,62	4,02	0,04
Wiek (zmienna ciągła)	0,01	0,004	5,2	0,02
Stopień zaawansowania (4. [28] vs 2., 3. i 4s [26])	1,98	0,56	12,6	0,0004

Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	1,62	0,5	10,45	0,001
Obecna [11] i nieobecna [41] amplifikacja genu MYCN	1,02	0,44	5,28	0,02
Obecna [14] i nieobecna [17] delecja 1p	1,14	0,59	3,71	0,051
Obecny [14] i nieobecny [5] nadmiar 17q	1,55	0,98	2,53	0,11
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0003	0,00009	9,48	0,002
Stężenie LDH powyżej [23] i poniżej [29] 3x norma dla wieku	0,88	0,44	3,9	0,05
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,003	0,001	4,03	0,04
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,0006	0,0005	1,47	0,22
Stężenie ferrytyny powyżej [26] i poniżej [11] 3x norma dla wieku	0,49	0,68	0,53	0,47
Niekorzystna [33] i korzystna [15] budowa histopatologiczna guza	0,73	0,54	1,83	0,17
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,006	0,98	0,97	0,32
Silna [44] i słaba [10] intensywność ekspresji białka Id2	0,6	0,62	0,89	0,34

W analizie wieloczynnikowej wykazano (Tabela 20) statystycznie znamienne niekorzystne wpływy na OS 4. stopnia zaawansowania (współczynnik ryzyka 7,4; $p=0,002$).

Tabela 20. Wyniki analizy wieloczynnikowej proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na przeżycie całkowite w analizie jednoczynnikowej dla całej grupy (n=54)

Oceniany parametr w analizie wieloczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stopień zaawansowania (4. vs pozostałe)	2,01	0,65	9,39	0,002
Wiek (zmienna ciągła)	0,004	0,007	0,29	0,59
Obecna i nieobecna amplifikacja genu MYCN	0,92	0,57	2,59	0,11
Obecna i nieobecna delecja 1p	1,03	0,63	2,64	0,1
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0001	0,0001	1,59	0,21

Stężenie NSE (zmienna ciągła)	-0,001	0,002	0,61	0,43
--------------------------------------	--------	-------	------	------

Przeprowadzono również analizę z zastosowaniem metody regresji krokowej (Tabela 21). Wykazano statystycznie znamienne niekorzystny wpływ 4. stopnia zaawansowania i obecności amplifikacji MYCN na OS.

Tabela 21. Parametry istotnie wpływające na przeżycie całkowite po zastosowaniu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa metodą regresji krokowej dla całej grupy (n=54)

Oceniany parametr w analizie wieloczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stopień zaawansowania (4. vs pozostałe)	2,17	0,57	14,34	0,0001
Obecna i nieobecna amplifikacja genu MYCN	1,31	0,46	7,91	0,005

- Czas wolny od choroby**

W przypadku badań dotyczących DFS wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 20). W jednoczynnikowym modelu regresyjnym Coxa, najsilniejszym parametrem zwiększającym ryzyko zgonu z powodu NBL był stopień zaawansowania (współczynnik ryzyka: 6,8, p=0,00001).

Tabela 22. Wyniki jednoczynnikowej analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas wolny od choroby dla całej grupy pacjentów (n=60)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek powyżej [41] i poniżej [19] 1. r.ż.	1,5	0,54	7,5	0,006
Wiek (zmienna ciągła)	0,01	0,004	8,5	0,003
Stopień zaawansowania (4. [31] vs 2., 3. i 4s [29])	1,91	0,45	17,7	0,00001
Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	1,29	0,34	14,34	0,0001
Obecna [12] lub nieobecna [46] amplifikacja genu MYCN	0,82	0,42	3,8	0,05
Obecna [14] lub nieobecna [17] delecja 1p	0,59	0,53	1,24	0,26
Obecny [15] lub nieobecny [7] nadmiar 17q	1,2	0,87	1,93	0,16

Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0001	0,00005	6,3	0,01
Stężenie LDH powyżej [26] i poniżej [31] 3x norma dla wieku	1,1	0,39	7,9	0,004
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,006	0,002	7,5	0,006
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,0008	0,0005	2,49	0,11
Stężenie ferrytyny powyżej [29] i poniżej [13] 3x norma dla wieku	0,92	0,6	2,34	0,12
Korzystna [16] i niekorzystna [36] budowa histopatologiczna guza	0,51	0,44	1,3	0,2
Odsetek komórek z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,009	0,005	2,67	0,1
Słaba [10] lub silna [50] intensywność ekspresji białka Id2	0,65	0,54	1,46	0,23

W analizie wieloczynnikowej wykazano (Tabela 23) statystycznie znamienne wpływy na DFS 4. stopnia zaawansowania (współczynnik ryzyka 6,0, $p=0,0005$).

Tabela 23 Wyniki analizy wieloczynnikowej proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na przeżycia wolne od choroby w analizie jednoczynnikowej dla całej grupy (n=60)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek (zmienna ciągła)	-0,002	0,006	0,15	0,69
Stopień zaawansowania (4. vs 2., 3. i 4s)	1,96	0,57	12,02	0,0005
Obecna i nieobecna amplifikacja MYCN	1,35	0,5	7,24	0,007
Stężenie LDH powyżej i poniżej 3x norma dla wieku	0,001	0,44	0,00001	0,99
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	-0,0008	0,002	0,23	0,63

Przeprowadzono również analizę z zastosowaniem metody regresji krokowej (Tabela 24). Stwierdzono statystycznie znamienne niekorzystne wpływy 4. stopnia zaawansowania oraz obecności amplifikacji genu MYCN na DFS.

Tabela 24. Parametry istotnie wpływające na czas wolny od choroby po zastosowaniu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa metodą regresji krokowej dla całej grupy (n=60)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stopień zaawansowania (stopnie 2-4)	1,83	0,48	14,62	0,0001
Obecna i nieobecna amplifikacja MYCN	1,21	0,42	8,23	0,004

2. Pacjenci powyżej 1. r.ż.

- Całkowity czas przeżycia**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 25). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa, najsilniejszym czynnikiem zwiększającym ryzyko zgonu z powodu NBL był stopień zaawansowania (współczynnik ryzyka: 4,05, p=0,03).

Tabela 25. Wyniki jednoczynnikowej analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas całkowitego przeżycia dla pacjentów powyżej 1. r.ż. (n=36)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stopień zaawansowania (4.[26] vs 2., 3. i 4s [10])	1,4	0,63	4,89	0,03
Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	1,31	0,59	4,93	0,03
Obecna [10] i nieobecna [24] amplifikacja genu MYCN	0,55	0,45	1,45	0,23
Obecna [10] i nieobecna [10] delecja 1p	0,89	0,63	1,98	0,16
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	-0,14	0,47	0,08	0,77
Stężenie LDH powyżej [20] i poniżej [13] 3x norma dla wieku	0,88	0,44	3,9	0,5
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,002	0,002	0,83	0,36
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	-0,000008	0,0006	0,0002	0,99
Stężenie ferrytyny powyżej [20] i poniżej [10] 3x norma dla wieku	0,19	0,7	0,07	0,78
Niekorzystna [24] i korzystna [8] budowa histopatologiczna guza	0,71	0,66	1,14	0,29

Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,002	0,007	0,14	0,71
Silna [25] i słaba [7] intensywność ekspresji białka Id2	0,08	0,56	0,02	0,88

Ze względu na fakt, że jedynym czynnikiem w sposób istotny wpływającym na OS u pacjentów powyżej 1. r.ż. był stopień zaawansowania, nie wykonano analizy wieloczynnikowej.

- Przeżycie wolne od choroby**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 26). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa, najsilniejszym czynnikiem zwiększającym ryzyko niepowodzenia leczenia był 4. stopień zaawansowania (współczynnik ryzyka: 4,35, $p=0,004$).

Tabela 26. Wyniki jednoczynnikowej analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów powyżej 1. r.ż. (n=41)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stopień zaawansowania (4.[28] vs 2., 3. i 4s [13])	1,46	0,51	8,1	0,004
Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	1,14	0,43	0,57	0,008
Obecna [11] i nieobecna [28] amplifikacja genu MYCN	0,3	0,43	0,49	0,48
Obecna [12] i nieobecna [11] delecja 1p	0,59	0,56	1,13	0,29
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,3	0,42	0,5	0,45
Stężenie LDH powyżej [23] i poniżej [14] 3x norma dla wieku	0,88	0,44	3,9	0,5
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,006	0,005	1,53	0,21
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,0003	0,0005	0,29	0,59
Stężenie ferrytyny powyżej [23] i poniżej [7] 3x norma dla wieku	0,67	0,61	1,21	0,27
Niekorzystna [27] i korzystna [8] budowa histopatologiczna guza	0,6	0,53	1,29	0,26
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,005	0,006	0,76	0,38
Silna [34] i słaba [7] intensywność ekspresji białka Id2	0,39	0,55	0,51	0,47

Ze względu na fakt, że jedynym czynnikiem w sposób istotny wpływającym na DFS u pacjentów powyżej 1. r.ż. był stopień zaawansowania, nie wykonano analizy wieloczynnikowej.

3. Pacjenci poniżej 1. r.ż.

- Całkowity czas przeżycia**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 27). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa, najsilniejszym czynnikiem niekorzystnie wpływającym na OS było wzrastające stężenie LDH (współczynnik ryzyka:1,001, $p=0,01$).

Tabela 27. Wyniki jednoczynnikowej analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na całkowity czas przeżycia dla pacjentów poniżej 1. r.ż. (n=18)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	0,11	0,52	0,05	0,83
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,001	0,0005	6,07	0,01
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,003	0,002	4,77	0,03
Niekorzystna [8] i korzystna [8] budowa histopatologiczna guza	0,04	1,2	0,001	0,97
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	0,01	0,05	0,08	0,77

W analizie wieloczynnikowej wykazano (Tabela 28) trend w kierunku pogorszenia przeżyć całkowitych u pacjentów poniżej 1. r.ż. z wyższym stężeniem LDH ($p=0,07$).

Tabela 28. Wyniki analizy wieloczynnikowej proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na całkowite przeżycie w analizie jednoczynnikowej dla dzieci poniżej 1. r.ż. (n=18)

Oceniany parametr w analizie wieloczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,002	0,001	3,22	0,07
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	-0,002	0,004	0,46	0,49

Ze względu na to, że do analizy wieloczynnikowej wyłoniono tylko 2 parametry, nie wykonano badań z zastosowaniem metody regresji krokowej.

- **Przeżycie wolne od choroby**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 29). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa, najsilniejszym czynnikiem niekorzystnie wpływającym na DFS było wyższe stężenie LDH (współczynnik ryzyka: 1,0009, $p=0,003$).

Tabela 29. Wyniki jednoczynnikowej analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolny od choroby dla pacjentów poniżej 1. r.ż. (n=19)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	1,21	0,69	3,05	0,08
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0009	0,0003	7,26	0,003
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,003	0,001	5,23	0,02
Stężenie ferrytyny powyżej i poniżej 3x norma dla wieku	1,75	1,64	1,13	0,29
Niekorzystna [9] i korzystna [8] budowa histopatologiczna guza	-0,62	1,07	0,33	0,56
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	0,008	0,03	0,05	0,82

W analizie wieloczynnikowej wykazano (Tabela 30) statystycznie znamieny wpływ wyższego stężenia LDH na DFS.

Tabela 30. Wyniki analizy wieloczynnikowej proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na przeżycie wolne od choroby w analizie jednoczynnikowej dla dzieci poniżej 1. r.ż. (n=19)

Oceniany parametr w analizie wieloczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,002	2,68	3,99	0,04
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	-0,006	0,004	2,3	0,13

Ze względu na to, że do analizy wieloczynnikowej wyłoniono tylko 2 parametry, nie wykonano analiz z zastosowaniem metody regresji krokowej.

4. Pacjenci w 4. stopniu zaawansowania

- Całkowity czas przeżycia

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 31). Wykazano, że statystycznie znamienny wpływ na OS miała tylko obecność amplifikacji genu MYCN (współczynnik ryzyka 4,93, $p=0,003$).

Tabela 31. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na całkowity czas przeżycia dla pacjentów w 4. stopniu zaawansowania (n=28)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek (zmienna ciągła)	-0,0008	0,006	0,02	0,89
Obecna [7] i nieobecna [19] amplifikacja genu MYCN	1,59	0,54	8,51	0,003
Obecna [7] i nieobecna [8] delecja 1p	1,1	0,67	2,7	0,1
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0001	0,0001	2,05	0,15
Stężenie LDH powyżej [18] i poniżej [8] 3x norma dla wieku	-0,27	0,51	0,28	0,59
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,002	0,002	0,64	0,42
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	-0,0002	0,0006	0,1	0,75
Stężenie ferrytyny powyżej [17] i poniżej [5] 3x norma dla wieku	-1,04	0,62	2,87	0,09
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,0004	0,007	0,002	0,96

W analizie wieloczynnikowej wykazano (Tabela 32) statystycznie znamienny niekorzystny wpływ na OS obecności amplifikacji MYCN ($p=0,005$).

Tabela 32. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na całkowity czas przeżycia w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów w 4. stopniu zaawansowania (n=31)

Oceniany parametr w analizie wieloczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Obecna amplifikacja genu MYCN	1,56	0,55	7,95	0,005
Stężenie ferrytyny powyżej i poniżej 3x norma dla wieku	-0,92	0,61	2,29	0,13

Ze względu na to, że w analizie wieloczynnikowej uwzględniono tylko 2 parametry, nie przeprowadzono analizy z zastosowaniem metody regresji krokowej.

- **Czas przeżycia wolny od choroby**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 33). Wykazano, że w grupie pacjentów w 4. stopniu zaawansowania choroby żaden z analizowanych parametrów nie miał statystycznie znaczącego lub na pograniczu istotności wpływu na DFS.

Tabela 33. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolny od choroby dla pacjentów w 4. stopniu zaawansowania (n=31)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek (zmienna ciągła)	0,002	0,005	0,11	0,74
Obecna [8] i nieobecna [21] amplifikacja genu MYCN	0,56	0,45	1,53	0,22
Obecna [8] i nieobecna [9] delecja 1p	0,58	0,54	1,18	0,28
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	-0,00005	0,00006	0,77	0,39
Stężenie LDH powyżej [20] i poniżej [9] 3x norma dla wieku	0,12	0,46	0,07	0,79
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,003	0,003	0,82	0,36
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,0004	0,0005	0,005	0,94
Stężenie ferrytyny powyżej [19] i poniżej [6] 3x norma dla wieku	-0,29	0,59	0,24	0,62
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,007	0,007	1,1	0,29

5. Pacjenci w 2., 3. i 4s stopniu zaawansowania

- **Całkowity czas przeżycia**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 34). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa, najsilniejszym czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia zgonu z NBL było podwyższone stężenie ferrytyny (współczynnik ryzyka: 1,003, p=0,03).

Tabela 34. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas całkowitego przeżycia dla pacjentów w stopniu zaawansowania 2., 3. i 4s (n=29)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek powyżej [11] i poniżej [15] 1. r.ż.	1,39	1,15	1,45	0,23
Wiek (zmienna ciągła)	0,03	0,02	2,33	0,13
Obecna [8] i nieobecna [9] delecja 1p	2,4	1,55	2,42	0,12
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0003	0,0002	2,79	0,09
Stężenie LDH powyżej [5] i poniżej [19] 3x norma dla wieku	1,6	1,02	2,45	0,12
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,007	0,003	4,53	0,03
Niekorzystna [14] i korzystna [11] budowa histopatologiczna guza	0,88	1,18	0,55	0,46
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,002	0,02	0,007	0,93
Silna [19] i słaba [7] intensywność ekspresji białka Id2	0,6	0,62	0,89	0,34

W analizie wieloczynnikowej nie wykazano (Tabela 35) statystycznie znaczącego wpływu na OS dla żadnego z analizowanych czynników.

Tabela 35. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na całkowity czas przeżycia w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów w stopniu zaawansowania 2., 3. i 4s (n=26)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0003	0,0002	1,85	0,17
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,001	0,002	0,43	0,51

- Czas przeżycia wolny od choroby**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 36). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa, wykazano trend w kierunku większego ryzyka wystąpienia niepowodzenia leczenia u dzieci starszych (p=0,07) i z wyższym poziomem LDH (p=0,098).

Tabela 36. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów w stopniu zaawansowania 2., 3. i 4s (n=29)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek powyżej [13] i poniżej [16] 1 r.ż.	1,32	0,84	2,46	0,12
Wiek (zmienna ciągła)	0,03	0,02	3,34	0,07
Obecna [6] i nieobecna [7] delecja 1p	-0,9	1,17	0,59	0,44
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0003	0,0002	2,4	0,098
Stężenie LDH powyżej [6] i poniżej [20] 3x norma dla wieku	1,24	0,94	1,74	0,19
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,003	0,002	2,37	0,12
Stężenie Ferrytyny powyżej [10] i poniżej [6] 3x norma dla wieku	2,35	1,51	2,4	0,12
Niekorzystna [16] i korzystna [12] budowa histopatologiczna guza	0,15	0,79	0,04	0,85
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,01	0,01	1,52	0,22
Silna [21] i słaba [8] intensywność ekspresji białka Id2	0,18	0,84	0,05	0,83

W analizie wieloczynnikowej nie wykazano (Tabela 37) statystycznie znaczącego wpływu na OS dla żadnego z analizowanych czynników.

Tabela 37. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na czas przeżycia wolnego od choroby w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów w stopniu zaawansowania 2., 3. i 4s (n=29)

Oceniany parametr w analizie wieloczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek (zmienna ciągła)	0,03	0,02	2,38	0,12
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0002	0,0002	1,43	0,23

6. Pacjenci z obecną amplifikacją genu MYCN

- **Całkowity czas przeżycia**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 38). W analizie jednoczynnikowej wykazano, że dla pacjentów z amplifikacją genu MYCN jedynym czynnikiem istotnie statystycznie (niekorzystnie) wpływającym na OS był wyższy stopień zaawansowania choroby ($p=0,04$).

Tabela 38. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas całkowitego przeżycia dla pacjentów z amplifikacją genu MYCN ($n=11$)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek (zmienna ciągła)	0,004	0,01	0,14	0,71
Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	2,21	1,09	4,15	0,04
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0001	0,0001	0,88	0,35
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	-0,002	0,003	0,35	0,55
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	-0,00002	0,001	0,0003	0,98
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,0008	0,01	0,00003	0,99

Ze względu na fakt, że jedynym czynnikiem wpływającym w sposób znamieny statystycznie na występowanie zgonów z NBL w grupie pacjentów z obecną amplifikacją genu MYCN był stopień zaawansowania choroby, nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej.

- **Czas przeżycia wolny od choroby**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 39). W analizie jednoczynnikowej wykazano, że dla pacjentów z amplifikacją genu MYCN jedynym czynnikiem wpływającym (niekorzystnie) na DFS i to tylko na pograniczu istotności był wyższy stopień zaawansowania choroby.

Tabela 39. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów z amplifikacją genu MYCN ($n=12$)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek (zmienna ciągła)	-0,003	0,01	0,07	0,79
Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	2,04	1,09	3,49	0,06
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,00003	0,0001	0,11	0,74

Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,002	0,004	0,35	0,55
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,0006	0,0005	1,47	0,22
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,006	0,98	0,97	0,32

Ze względu na fakt, że jedynym czynnikiem wpływającym i to tylko na pograniczu istotności na DFS dla pacjentów z amplifikacją MYCN był stopień zaawansowania choroby, nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej.

7. Pacjenci bez amplifikacji genu MYCN

- Całkowity czas przeżycia**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 40). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa, najsilniejszym czynnikiem wpływającym niekorzystnie na OS był 4. stopień zaawansowania ($p=0,005$).

Tabela 40. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas całkowitego przeżycia dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (n=41)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek powyżej [25] i poniżej [17] 1. r.ż.	1,48	0,76	3,72	0,05
Wiek (zmienna ciągła)	0,12	0,006	4,55	0,03
Stopień zaawansowania (4. [19] vs 2., 3. i 4s [22])	1,83	0,66	7,76	0,005
Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	1,45	0,56	6,76	0,009
Obecna [8] i nieobecna [13] delecja 1p	0,81	0,73	1,24	0,26
Obecny [8] i nieobecny [5] nadmiar 17q	0,79	1,08	0,53	0,47
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0003	0,0001	5,15	0,02
Stężenie LDH powyżej [13] i poniżej [25] 3x norma dla wieku	0,54	0,58	0,89	0,34
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,78	1,42	0,3	0,58
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,001	0,0006	2,27	0,13

Stężenie ferrytyny powyżej [19] i poniżej [6] 3x norma dla wieku	1,78	1,29	1,9	0,17
Niekorzystna [27] i korzystna [12] budowa histopatologiczna guza	1,0	0,75	1,78	0,18
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,008	0,008	1,26	0,26
Silna [32] i słaba [9] intensywność ekspresji białka Id2	0,73	0,76	0,91	0,34

W analizie wieloczynnikowej wykazano (Tabela 41) istnienie trendu w kierunku pogorszenia przeżyć całkowitych u pacjentów w 4. stopniu zaawansowania ($p=0,08$).

Tabela 41. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na całkowity czas przeżycia w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (n=41)

Oceniany parametr w analizie wieloczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek (zmienna ciągła)	0,004	0,008	0,31	0,58
Stopień zaawansowania (4. vs 2., 3. i 4s)	1,36	0,79	2,99	0,08
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0001	0,0001	0,94	0,33
Stężenie ferrytyny powyżej i poniżej 3x norma dla wieku	0,68	1,12	0,37	0,54

Przeprowadzono również analizę z zastosowaniem metody regresji krokowej (Tabela 42). Wykazano dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN, statystycznie znamieny niekorzystny wpływ 4. stopnia zaawansowania na OS ($p=0,02$).

Tabela 42. Parametry wpływające na czas całkowitego przeżycia po zastosowaniu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa metodą regresji krokowej dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (n=41)

Oceniany parametr w analizie wieloczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stopień zaawansowania (4. vs 2., 3. i 4s)	1,66	0,69	5,76	0,02
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0001	0,0001	0,77	0,38

- Czas przeżycia wolny od choroby**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 43). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa, najsilniejszym czynnikiem niekorzystnie wpływającym na DFS był 4. stopień zaawansowania ($p=0,0002$).

Tabela 43. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (n=46)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek powyżej [28] i poniżej [18] 1. r.ż.	1,68	0,63	7,15	0,0007
Wiek (zmienna ciągła)	0,01	0,004	8,47	0,004
Stopień zaawansowania (4.[21] vs 2., 3. i 4s [25])	2,13	0,58	13,43	0,0002
Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	1,36	0,4	11,53	0,0007
Obecna [8] i nieobecna [15] delecja 1p	0,23	0,64	0,13	0,72
Obecny [10] i nieobecny [5] nadmiar 17q	0,6	0,98	0,37	0,54
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0003	0,0001	6,39	0,01
Stężenie LDH powyżej [15] i poniżej [27] 3x norma dla wieku	1,22	0,48	6,52	0,01
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,007	0,004	2,65	0,1
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,001	0,0005	3,17	0,07
Stężenie ferrytyny powyżej [21] i poniżej [8] 3x norma dla wieku	2,00	0,96	4,39	0,04
Niekorzystna [30] i korzystna [13] budowa histopatologiczna guza	0,57	0,53	1,13	0,28
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,009	0,007	1,79	0,18
Silna [37] i słaba [9] intensywność ekspresji białka Id2	0,84	0,62	1,83	0,17

W analizie wieloczynnikowej wykazano (Tabela 44) istotny niekorzystny wpływ 4. stopnia zaawansowania na DFS dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN ($p=0,01$).

Tabela 44. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (n=46)

Oceniany parametr w analizie wieloczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek (zmienna ciągła)	0,004	0,006	0,46	0,5
Stopień zaawansowania (4. vs 2., 3. i 4s)	1,66	0,68	6,03	0,01
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0001	0,0001	1,19	0,28
Stężenie ferrytyny powyżej i poniżej 3x norma dla wieku	1,18	0,84	1,98	0,16

Przeprowadzono również analizę z zastosowaniem metody regresji krokowej (Tabela 45). Wykazano statystycznie znamiennej niekorzystny wpływ 4. stopnia zaawansowania na DFS (p=0,0008).

Tabela 45. Parametry wpływające na czas przeżycia wolnego od choroby po zastosowaniu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa metodą regresji krokowej dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (n=46)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stopień zaawansowania (stopień 4. vs pozostałe)	1,97	0,62	8,78	0,0008
Stężenie ferrytyny powyżej i poniżej 3x norma dla wieku	1,24	0,84	2,2	0,14

8. Pacjenci z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej

- Zgony z NBL

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 46). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa, najsilniejszym czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia zgonu z NBL był stopień zaawansowania (p=0,02).

Tabela 46. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas całkowitego przeżycia dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej (N=32)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek powyżej [24] i poniżej [8] 1. r.ż.	1,67	1,04	2,58	0,11
Wiek (zmienna ciągła)	0,01	0,01	1,26	0,26
Stopień zaawansowania (4. [18] vs	1,49	0,66	5,12	0,02

2., 3. i 4s [14])				
Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	0,68	0,38	3,12	0,02
Obecna [5] i nieobecna [27] amplifikacja genu MYCN	0,55	0,65	0,72	0,4
Obecna [9] i nieobecna [10] delecja 1p	0,03	0,69	0,02	0,96
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0003	0,0001	5,27	0,02
Stężenie LDH powyżej [14] i poniżej [16] 3x norma dla wieku	0,57	0,56	1,03	0,31
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,003	0,001	3,64	0,06
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,0006	0,0006	1,31	0,25
Stężenie ferrytyny powyżej [18] i poniżej [5] 3x norma dla wieku	1,51	1,17	1,66	0,2
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,006	0,98	0,97	0,32
Silna [27] i słaba [5] intensywność ekspresji białka Id2	0,01	0,008	1,68	0,19

W analizie wieloczynnikowej wykazano (Tabela 47) istnienie trendu w kierunku pogorszenia OS dla pacjentów w 4. stopniu zaawansowania ($p=0,07$).

Tabela 47. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na czas całkowitego przeżycia (zgony z NBL) w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej ($n=32$)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stopień zaawansowania (4. vs 2., 3. i 4s)	1,23	0,69	3,17	0,07
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0002	0,0001	1,33	0,25
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,001	0,002	0,53	0,47

Przeprowadzono również analizę z zastosowaniem metody regresji krokowej (Tabela 48). Wykazano istnienie trendu w kierunku pogorszenia przeżyć wolnych od niepowodzenia leczenia u pacjentów w 4. stopniu zaawansowania ($p=0,06$).

Tabela 48. Parametry wpływające na czas przeżycia całkowitego (zgony z NBL) po zastosowaniu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa metodą regresji krokowej dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej zgony z NBL (n=32)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Stopień zaawansowania (4. vs 2., 3. i 4s)	1,27	0,68	3,45	0,06
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0002	0,0001	2,22	0,13

- Czas przeżycia wolny od choroby**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 49). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa, najsilniejszym czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia wznowy lub progresji choroby był 4. stopień zaawansowania.

Tabela 49. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej (n=36)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek powyżej [27] i poniżej [9] 1 r.ż.	2,24	1,03	4,71	0,03
Wiek (zmienna ciągła)	0,02	0,009	5,08	0,02
Stopień zaawansowania (4 [20] vs 2., 3. i 4s [16])	1,98	0,65	9,24	0,002
Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	0,56	0,3	3,62	0,003
Obecna [6] i nieobecna [30] amplifikacja genu MYCN	0,37	0,64	0,33	0,56
Obecna [10] i nieobecna delecja 1p [12]	-0,27	0,61	0,2	0,66
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0001	0,00008	3,1	0,08
Stężenie LDH powyżej [17] i poniżej [17] 3x norma dla wieku	0,98	0,51	3,76	0,05
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,008	0,003	7,5	0,006
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,0007	0,0005	1,65	0,2
Stężenie ferrytyny powyżej [20] i poniżej [7] 3x norma dla wieku	1,36	0,83	2,65	0,1

Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	0,006	0,98	0,97	0,32
Silna [31] i słaba [5] intensywność ekspresji białka Id2	-0,007	0,007	1,001	0,32

W analizie wieloczynnikowej wykazano (Tabela 50) statystycznie istotne pogorszenia DFS dla pacjentów starszych ($p=0,03$) oraz z wyższym stężeniem NSE ($p=0,02$).

Tabela 50. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na czas przeżycia wolnego od choroby w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej ($n=36$)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek (zmienna ciągła)	0,008	0,01	0,68	0,03
Stopień zaawansowania (4. vs 2., 3. i 4s)	1,62	0,73	4,98	0,41
Stężenie LDH powyżej i poniżej 3x norma dla wieku	0,07	0,54	0,02	0,89
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,006	0,003	5,05	0,02

Przeprowadzono również analizę z zastosowaniem metody regresji krokowej (Tabela 51). Wykazano statystycznie istotny niekorzystny wpływ wyższego wieku ($p=0,005$) i wyższego stężenia NSE ($p=0,02$) na DFS.

Tabela 51. Parametry wpływające na czas wolny od choroby po zastosowaniu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa metodą regresji krokowej dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej ($n=36$)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek (zmienna ciągła)	1,84	0,65	7,88	0,005
Stężenie NSE (zmienna ciągła)	0,006	0,003	5,16	0,02

9. Pacjenci z guzem o korzystnej budowie histopatologicznej

- Zgony z NBL**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 52). W grupie pacjentów z korzystną budową patologiczną guza, żaden z analizowanych parametrów nie miał statystycznie znamiennej lub nawet na pograniczu istotności wpływu na OS.

Tabela 52. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na całkowity czas przeżycia choroby dla pacjentów z guzem o korzystnej budowie histopatologicznej (n=15)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej [liczba pacjentów]	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek powyżej [7] i poniżej [8] 1. r.ż.	0,79	1,22	0,41	0,52
Wiek (zmienna ciągła)	0,03	0,04	0,52	0,47
Stopień zaawansowania (stopnie 2.-4.)	0,12	0,59	0,04	0,83
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0003	0,0002	1,35	0,24
Stężenie LDH powyżej [6] i poniżej [9] 3x norma dla wieku	1,001	1,23	1,11	0,29
Stężenie ferrytyny (zmienna ciągła)	0,001	0,003	0,23	0,63
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,01	0,02	0,41	0,52

- Czas przeżycia wolny od choroby**

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli (Tabela 53). W grupie pacjentów z korzystną budową patologiczną guza tylko wyższy odsetek komórek NBL z obecną amplifikacją genu MYCN istotnie statystycznie (korzystnie) wpływał DFS.

Tabela 53. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów z guzem o korzystnej budowie histopatologicznej (n=16)

Oceniany parametr w analizie jednoczynnikowej	Beta	Błąd standardowy	Chi ²	Wartość p
Wiek powyżej [8] i poniżej [8] 1. r.ż.	0,69	0,87	0,63	0,43
Wiek (zmienna ciągła)	0,03	0,02	1,92	0,17
Stopień zaawansowania	-0,25	0,5	0,25	0,61

(stopnie 2.-4.)				
Stężenie LDH (zmienna ciągła)	0,0002	0,0002	0,85	0,36
Stężenie LDH powyżej [7] i poniżej [9] 3x norma dla wieku	1,01	0,88	1,32	0,25
Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 (zmienna ciągła)	-0,02	0,01	4,12	0,04

Ze względu na fakt, że jedynym czynnikiem wpływającym istotnie statystycznie na DFS dla pacjentów z korzystną budowa histopatologiczną był odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2, nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej.

5. Omówienie i dyskusja

Nerwiak zarodkowy współczulny jest jednym z najczęstszych nowotworów wieku dziecięcego (7-10%). Może rozwijać się wszędzie tam, gdzie znajdują się embrionalne komórki części współczulnej układu autonomicznego. Rocznie stwierdza się 6-11 zachorowań na 1 milion dzieci w wieku 0-15 lat, 50% guzów występuje przed 2. r.ż., a 90% przed 5. r.ż. W Polsce rozpoznaje się rocznie około 60 nowych zachorowań. [5] Wśród 60 pacjentów analizowanych w obecnej pracy niemowlęta i dzieci do 2. r.ż. stanowiły odpowiednio: 31,7% i 50% (Tabela 7). W NBL podwyższone stężenie metabolitów katecholamin w moczu stwierdza się u 90% chorych, a w 60-70% przypadkach rozpoznaje się 4. stopień zaawansowania choroby. [5,9,18] W naszym materiale wśród 60 analizowanych dzieci, stężenie dopaminy, VMA i HVA w czasie diagnozowania NBL było oznaczone odpowiednio u: 40, 49 i 41 chorych, w tym u ponad 80% pacjentów stężenia tych metabolitów były podwyższone. Najlicniejszą grupę – 31 (51,7%) stanowili pacjenci w 4. stopniu zaawansowania (Tabela 7).

NBL jest nowotworem wieku dziecięcego, w którym występuje najwięcej nietypowych objawów takich jak: senność, brak łaknienia, bóle brzucha, bledność, osłabienie i drażliwość, dlatego upodabnia się obrazem klinicznym do wielu chorób, zarówno nowotworowych, jak i nienowotworowych. Różnorodność obrazu klinicznego NBL wynika z różnych pierwotnych umiejscowień choroby, występujących zaburzeń metabolicznych, a przede wszystkim z wielu objawów spowodowanych przerzutami. Niezwykłe cechy biologiczne NBL i występowanie postaci skrajnie różniących się naturalnym przebiegiem i rokowaniem, od spontanicznej regresji do bardzo szybkiego postępu choroby, a także występowanie, zwłaszcza u nastolatków, progresji o powolnym przebiegu [5,9,18], sprawiają, że ten nowotwór od wielu lat jest w centrum zainteresowania wielu naukowców i wydaje się być dobrym modelem do poznania ogólnych mechanizmów onkogenezy. Przyczyna powstania NBL, tak jak i innych nowotworów, jest ciągle niewyjaśniona. Chociaż znanych jest już wiele czynników prognostycznych w NBL, precyzyjne określenie rokowania w tej chorobie nadal nie jest możliwe. Pomimo intensywnej terapii, wyleczalność w grupie wysokiego ryzyka pozostaje bardzo niska (około 30%), niezależnie od prób wprowadzania nowych, eksperymentalnych metod terapii. Na podstawie dotąd poznanych licznych zaburzeń genetycznych w komórkach NBL oraz mechanizmów biorących udział w transformacji nowotworowej, nadal nie można wyjaśnić, dlaczego część guzów ulega samoistnej regresji, a w innych, pomimo intensywnego leczenia dochodzi do progresji choroby i zgonu pacjenta. [3,36,55,75] Dlatego powinny być kontynuowane badania nad zaburzeniami biorącymi udział w złożonym procesie nowotworzenia oraz nad istotnymi czynnikami wpływającymi na przebieg choroby w celu wyboru odpowiedniej terapii. Określone zaburzenia molekularne mogą również stanowić cel terapeutyczny przez wprowadzenie leczenia hamującego lub korygującego skutki tych nieprawidłowości. [82] W obecnej pracy podjęto badania nad ekspresją białka Id2 w komórkach NBL, w tym ocenę znaczenia prognostycznego i korelacji tej ekspresji ze znanymi już czynnikami rokowniczymi.

Znaczenie białka Id2 w fizjologicznej (w okresie prawidłowej embriogenezy) i patologicznej progresji cyklu komórkowego oraz mechanizmy jego działania, w tym w NBL, przedstawiono we wstępie

niniejszej pracy. Uzyskane dotąd wyniki badań nad znaczeniem ekspresji białka Id2 w NBL są ciągle niejednoznaczne. [1,30,72,90,92]

W badaniu przeprowadzonym przez Lasorellę i wsp. oceniano korelację poziomu ekspresji białka Id2 z poziomem ekspresji MYCN w materiale pobranym od 46 pacjentów z NBL w stopniu 1.-4. Ekspresję białka Id2 i Mycn oceniano metodą immunohistochemiczną. Stwierdzono istnienie korelacji między ekspresją obu białek (28 przypadków z ekspresją Mycn i Id2, 18 przypadków bez ekspresji Mycn i Id2). Ekspresję białka Id2 w danym preparacie uznano za pozytywną, jeśli była stwierdzana w minimum 25% komórek NBL. Tak zdefiniowana obecność ekspresji białka Id2 w sposób znamieny statystycznie wpływała na OS i EFS i była niezależnym czynnikiem prognostycznym. Amplifikacja MYCN obecna była u 8 pacjentów, ale nie analizowano tego parametru. Dla pacjentów powyżej 1. r. ż. bez ekspresji białka Mycn, obecność ekspresji Id2 nie była znamienym prognostycznie czynnikiem rokowniczym [44]. Wykazano również, że wysoka intensywność ekspresji białka Id2 występuje w tych samych obszarach guza, w których obserwuje się podwyższony poziom ekspresji MYCN. [71]

Vandesompele i wsp. wykonali badania na liniach komórkowych NBL, oceniając ekspresję genów ID2, MYCN i MYC. [90] Początkowo oceniono poziom mRNA w 8 liniach komórkowych zarówno z amplifikacją, jak i bez amplifikacji MYCN. Badanie Northern blot i ilościowe RT-PCR nie potwierdziło istnienia korelacji ani pomiędzy poziomem mRNA ID2 a MYCN, ani pomiędzy poziomem mRNA ID2 a MYC. Potwierdzono natomiast opisaną już wcześniej odwrotną korelację między poziomem MYCN a MYC. [14] Dodatkowo analizowano poziom mRNA i białek Mycn i Id2 na tych samych 6 liniach komórkowych ocenianych przez Lasorella i wsp. oraz na innych, wcześniej nie badanych liniach komórkowych i guzach pierwotnych. W tym i kolejnych eksperymentach nie potwierdzono istnienia korelacji poziomu mRNA MYCN z mRNA ID2 ani z białkiem Id2. Zaobserwowano natomiast korelację poziomu ekspresji mRNA ID2 i MYC. W celu wykluczenia błędu związanego z warunkami hodowli, eksperymenty powtórzono dla różnego czasu wzrostu komórek i zmianie pożywki. Obserwowano różnice w poziomie mRNA i białka Id2, ale nie korelujące ze zmianami poziomu mRNA MYCN. Również w badaniach guzów pierwotnych nie zaobserwowano korelacji białka Id2 ani z poziomem ekspresji genu MYCN, ani z rokowaniem, chociaż u pacjentów z poziomem Id2 niższym niż średnia dla grupy obserwowano trend w kierunku poprawy rokowania. W badaniu tym oceniano poziom mRNA, podczas gdy Lasorella i wsp. oceniali poziom ekspresji białka metodą immunohistochemiczną, co mogło przyczynić się do uzyskania różnych wyników badań. Zarówno w badaniu Lasorella i wsp. [43], jak i Vandesompele i wsp. [90] oceniano ekspresję MYCN, a nie jego amplifikację, która ma ustalone już znaczenie prognostyczne. Wyniki analiz Lasorella i wsp. nie zostały również potwierdzone w badaniu przeprowadzonym przez Alaminos i wsp. [1] Ocenę ekspresji białka Id2 przeprowadzono na dużej grupie pacjentów dwoma metodami – RT-PCR dla mRNA i immunohistochemiczną w pierwotnych guzach NBL pobranych od 99 pacjentów i dodatkowo na 12 liniach komórkowych. Nie stwierdzono różnic w ekspresji Id2 w zależności od poziomu ekspresji genu MYCN ocenianego poprzez poziom mRNA metodą RT-PCR, ani korelacji pomiędzy poziomem ekspresji mRNA MYCN a poziomem ekspresji mRNA ID2. Generalnie w liniach komórkowych stwierdzono wyższą ekspresję ID2 niż w guzach pierwotnych. Wprowadzenie genu MYCN do niezawierających go linii komórkowych nie wpłynęło na poziom ekspresji Id2. Nie stwierdzono różnic

w rokowaniu pacjentów w zależności od poziomu ekspresji białka Id2. W badaniu oceniano amplifikację MYCN i jego korelację z nadmierną ekspresją mRNA ID2, ale nie oceniano korelacji mRNA ID2 z obecnością amplifikacji MYCN. [1]

Także badanie Wang i wsp. [92] nie potwierdziło postulowanej korelacji pomiędzy poziomem białka Id2 a ekspresją MYCN i niekorzystnym rokowaniem. Badanie wykonano metodami RT-PCR i Northern Blot dla oceny mRNA oraz Western Blot i profilu ekspresji oligonukleotydów dla oceny poziomu ekspresji białka na 10 liniach komórkowych i w guzach NBL, pochodzących od 170 pacjentów, u których nie analizowano ekspresji białka Id2. Ekspresja genu ID2 wyrażona zarówno jako poziom mRNA, jak i poziom białka Id2, nie korelowała ani z ekspresją, ani z amplifikacją genu MYCN i obecna była we wszystkich badanych liniach i guzach. Nie stwierdzono również korelacji poziomu ekspresji Id2 z kliniczną charakterystyką pacjentów. Białko Id2 zarówno w guzach, jak i w liniach komórkowych, ulegało ekspresji niezależnie od statusu MYCN. Co więcej, stwierdzono trend w kierunku wyższej ekspresji białka Id2 w guzach NBL bez amplifikacji MYCN, nie stwierdzono natomiast korelacji ekspresji obu białek. [92]

Gebauer i wsp. [30] wykazali, że poziom ekspresji genu ID2 nie odzwierciedlał poziomu białka Id2 w komórce, co również może odpowiadać za różnice wyników między poszczególnymi badaniami. Stwierdzono transkrypcję genu ID2 w większości badanych guzów, która nie zawsze korelowała z poziomem białka Id2. Ekspresja Id2 była niezależna zarówno od MYCN, jak i ekspresji ocenianych genów supresorowych (p27 i p16). [30]

Podobne wyniki analiz uzyskał Raetz i wsp., którzy w badaniu metodą mikromacierzy wykazali związek między amplifikacją MYCN a nadmierną ekspresją genu ID2, ale ilościowe badania RT-PCR nie wykazały ani podwyższonej ilości mRNA ID2, ani jego korelacji z MYCN w komórkach NBL. [72]

Za różnice wyników badań uzyskanych w poszczególnych eksperymentach mogą być odpowiedzialne m. in. warunki hodowli komórek. Stwierdzono, że ekspresja Id2 jest indukowana w liniach komórkowych w warunkach hipoksji. Może to częściowo wyjaśniać zarówno obserwowane wcześniej odróżnicowywanie się komórek NBL w wyniku hipoksji, jak i powstawanie klinicznie agresywnych fenotypów guza. W złośliwych guzach litych często jest obniżone zaopatrzenie komórek w tlen ze względu na wysokie tempo proliferacji komórek nowotworowych, znacznie przewyższające tempo angiogenezy. Konieczne są więc zmiany adaptacyjne guza, pozwalające na wzrost nawet w niesprzyjających warunkach. Regulacja ekspresji Id2 przez hipoksję może mieć istotne znaczenie w progresji cyklu komórkowego w NBL. [52] Opisywano również zależność poziomu ekspresji od warunków hodowli komórek, takich jak czas przenoszenia komórek i zmiany pożywki. [90]

Należy również podkreślić fakt, że w czasie prawidłowej embriogenezy odpowiedni poziom ekspresji białka Id2 ma kluczowe znaczenie w określonych fazach rozwoju, a w komórkach postmitotycznych może zanikać lub tracić swoje znaczenie pomimo utrzymującej się ekspresji, i że w czasie neogenezy możliwe jest także istnienie analogicznego mechanizmu. Tak więc dla prawidłowej interpretacji znaczenia poziomu Id2 w komórkach NBL prawdopodobnie konieczne byłoby określenie momentu, w którym ulega ono ekspresji. [71]

W obecnie przeprowadzonym badaniu ekspresja białka Id2 została stwierdzona metodą immunohistochemiczną we wszystkich 60 preparatach wykonanych z guzów pobranych od pacjentów z NBL. W 50 (83,3%) przypadkach intensywność ekspresji w odniesieniu do pozytywnej kontroli określono jako wysoką (Rysunek 58). Przyjęto, że wynik pozytywny oznaczał każdą ekspresję białka Id2, bez względu na odsetek komórek NBL z obecną ekspresją, a nie tylko wtedy, gdy odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 był wyższy niż 25%, jak to założyli Lasorella i wsp. [43] Istnieją doniesienia o obecności macierzystych komórek nowotworowych, w których mechanizmy związane z działaniem białka Id2 mogą odgrywać potencjalną rolę w powstaniu i utrzymaniu fenotypu komórki nowotworowej [2], dlatego eliminacja przypadków z ekspresją białka Id2 obecną w pojedynczych komórkach wydaje się nieuzasadniona. We własnym materiale intensywność ekspresji białka Id2 była porównywalna w grupie dzieci powyżej i poniżej 1. r.ż. oraz z i bez amplifikacji MYCN. Natomiast istotnie więcej dzieci z silną ekspresją białka Id2 było w grupie pacjentów w 4. stopniu w porównaniu z pozostałymi stopniami zaawansowania (Rysunek 35). Wang i wsp. stwierdzili trend w kierunku wyższej ekspresji białka Id2 w guzach NBL bez obecnej amplifikacji genu MYCN. [92]

Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 w analizowanych w obecnym badaniu preparatach wahał się od 1–100% (średnia: 77,7%, mediana: 85%). W 53 przypadkach (88,3%) ekspresję białka Id2 obserwowano w minimum 50%, a w 55 preparatach (93%) w co najmniej 25% komórek NBL. Najliczniejszą grupę - 27 (45%) pacjentów stanowili chorzy, u których stwierdzono ekspresję białka Id2 w ponad 90% komórek NBL. Natomiast grupy z niższymi odsetkami pozytywnych komórek NBL, obejmowały 1-8 dzieci, z tym, że w przedziale 16-39% nie było żadnego pacjenta (Rysunek 4). W żadnej z analizowanych podgrup nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic w odsetku komórek z obecną ekspresją białka Id2 (Rysunek 30, Rysunek 31, Rysunek 32, Rysunek 33, Rysunek 34, Rysunek 36) Ze względu na bardzo małą liczbę naszych pacjentów z ekspresją białka Id2 obecną w mniej niż 25% komórek (n=5), nie przeprowadzono analiz porównawczych z punktem odcięcia na poziomie 25% obecnych komórek pozytywnych.

Czynniki rokownicze w neuroblastoma

Przed przystąpieniem do badań nad znaczeniem rokowniczym ekspresji białka Id2 we własnym materiale oceniono wpływ znanych już czynników na uzyskiwane wyniki leczenia. [5,8,9,12,17,18,19,22,42,49,55,57,58,70,79,80,87].

Wiek dziecka w chwili rozpoznania NBL

Pomimo lepszego poznania biologii NBL i wyłonienia nowych parametrów prognostycznych oraz wprowadzania zmian w leczeniu, wiek nadal pozostaje jednym z najważniejszych czynników rokowniczych w tej chorobie. [5,8,18] W materiale własnym, w całej analizowanej grupie w badaniu z zastosowaniem regresji logistycznej, wiek w sposób istotny statystycznie wpływał zarówno na występowanie zgonów (Tabela 54) spowodowanych bezpośrednio przez NBL ($p=0,01$), jak i niepowodzeń leczenia (wczesne progresje i wznowy choroby: $p=0,00008$) - (Tabela 55). Na podstawie analizy krzywej regresji (Rysunek 75, Rysunek 76) nie udało się jednoznacznie ustalić wieku granicznego, przy którym w sposób znamienny wzrastałoby ryzyko wystąpienia zgonu lub

niepowodzenia leczenia. Dlatego zgodnie z danymi z literatury jako wiek, w którym w sposób znamieny wzrasta ryzyko zgonu spowodowanego NBL, przyjęto 12 miesięcy [5,8,18]. Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego OS (Rysunek 6) dla niemowląt i pacjentów powyżej 1. r.ż. wynosiło odpowiednio: 0,82 i 0,47 ($p=0,03$), a prawdopodobieństwo 5-letniego DFS (Rysunek 7) dla dzieci poniżej i powyżej 1. r.ż. wynosiło odpowiednio: 0,78 i 0,38 ($p=0,006$). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa dla całej grupy (Tabela 19, Tabela 22) wykazano, że wiek miał istotny niekorzystny wpływ zarówno na OS ($p=0,02$), jak i na DFS (0,003). Jednakże w analizie wieloczynnikowej (Tabela 20, Tabela 21, Tabela 23, Tabela 24) nie stwierdzono istotnego statystycznie wpływu wieku ani na OS ($p=0,59$), ani na DFS ($p=0,69$).

Stopień zaawansowania choroby

W wielu dostępnych opracowaniach dotyczących NBL, podkreśla się, że zaawansowanie choroby nadal jest niezależnym czynnikiem istotnie wpływającym na uzyskiwane wyniki leczenia bez względu na zastosowany sposób terapii [5,9,18]. W badaniu wszystkich pacjentów w materiale własnym stwierdzono znamienne częstsze występowanie zarówno zgonów spowodowanych przez NBL ($p=0,00001$) – (Tabela 54), jak i niepowodzeń leczenia ($p=0,00004$) u pacjentów w 4. stopniu w porównaniu z niższymi stopniami zaawansowania choroby (Tabela 55). Wśród dzieci w 2. i 4s stopniu zaawansowania nie stwierdzono zgonów z powodu NBL. Prawdopodobieństwo 5-letniego OS (Rysunek 9) dla pacjentów w innym niż 4. stopniu (2., 3. i 4s) i w 4. stopniu zaawansowania wynosiło odpowiednio: 0,84 i 0,32 ($p=0,00007$). U 6 dzieci w stopniu 4s nie stwierdzono żadnego niepowodzenia leczenia. Prawdopodobieństwo 5-letniego DFS (Rysunek 11) dla pacjentów w innym niż 4. stopniu i w 4. stopniu zaawansowania wynosiło odpowiednio: 0,79 i 0,19 ($p=0,0001$). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa (Tabela 19, Tabela 22) najsilniejszym czynnikiem niekorzystnie wpływającym na OS był 4. stopień zaawansowania choroby ($p=0,0004$). Przeprowadzenie analizy wieloczynnikowej z zastosowaniem metody regresji krokowej (Tabela 20, Tabela 21, Tabela 23, Tabela 24) wykazało znamienne niekorzystny niezależny wpływ 4. stopnia zaawansowania zarówno na OS (0,0001), jak i na DFS (0,0001).

Budowa histopatologiczna guza

NBL jest jednym z kilku dziecięcych nowotworów, w których stwierdza się obecność małych, okrągłych, niebieskich komórek. W odróżnieniu od innych guzów, komórki NBL wykazują w różnym stopniu neuralne zróżnicowanie. Klasyfikacja Shimady i wsp. opiera się na ocenie dojrzałości komórek, podścieliska, liczby mitoz, cech rozpadu jądra komórkowego oraz wieku dziecka. Korzystna lub niekorzystna budowa histologiczna guza NBL stanowi ważny czynnik rokowniczy. Istnieje wysoka korelacja między amplifikacją MYCN i niekorzystną histologią, ale guzy NBL, w których nie stwierdza się amplifikacji, ale mają niekorzystną histologię, stanowią również podgrupę o gorszym rokowaniu. [5,9,18,79]

Wśród ocenianych obecnie dzieci, korzystną i niekorzystną budowę histopatologiczną guza NBL ustalono odpowiednio u: 13 (26,7%) i 36 (60%). W 8 przypadkach ocena nie była możliwa. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu zgonów spowodowanych bezpośrednio przez NBL w zależności od budowy histopatologicznej guza ($p=0,1$). Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego

OS (Rysunek 24) dla pacjentów z guzem o korzystnej i niekorzystnej budowie histopatologicznej wynosiło odpowiednio: 0,80 i 0,52 ($p=0,15$). Nie wykazano również statystycznie istotnej różnicy w występowaniu niepowodzenia leczenia u chorych w zależności od budowy histopatologicznej guza ($p=0,3$). Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego DFS dla pacjentów z guzem o korzystnej i niekorzystnej budowie histologicznej wynosiło odpowiednio: 0,69 i 0,49. Różnice między grupami ($p=0,097$) wskazują na istnienie trendu do uzyskania lepszych wyników w przypadku korzystnej budowy histopatologicznej (Rysunek 21). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa nie wykazano statystycznie znaczącego wpływu budowy histopatologicznej guza ani na OS, ani na DFS (Tabela 19, Tabela 22).

Nieprawidłowości cytogenetyczne

Różnorodność obrazu klinicznego NBL i odmienny przebieg tej choroby, może mieć swój wyraz w wielu zaburzeniach cytogenetycznych. Częstą nieprawidłowość cytogenetyczną (19-36% pacjentów) stanowi delecja krótkiego ramienia chromosomu 1. Alleliczna utrata krótkiego ramienia chromosomu 1. jest silnym niekorzystnym czynnikiem prognostycznym, zarówno w guzach u niemowląt, jak i u dzieci starszych. Delecja krótkiego ramienia chromosomu 1. jest częściej stwierdzana u pacjentów z zaawansowaną chorobą i u tych, u których komórki guza są diploidalne. [16,17,19,22,56,58]

W materiale własnym delecję 1p stwierdzono u 14 (23,3%) pacjentów, a wyników nie uzyskano w 29 (48,4%) przypadkach. Wykazano trend w kierunku wyższego ryzyka zgonu z powodu NBL u pacjentów z obecną delecją 1p ($p=0,07$). Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego OS (Rysunek 16) dla pacjentów bez delecji 1p36 i z delecją wynosiło odpowiednio: 0,8 i 0,43 ($p=0,055$). Natomiast nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu niepowodzeń leczenia u pacjentów z i bez obecności delecji 1p ($p=0,3$). Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego DFS (dla pacjentów bez delecji 1p36 i z delecją) wynosiło odpowiednio: 0,62 i 0,39 ($p=0,29$). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa wykazano niekorzystny, na pograniczu istotności ($p=0,055$) wpływ obecnej delecji 1p na OS, ale w analizie wieloczynnikowej parametr ten nie miał istotnego wpływu (Tabela 19, Tabela 23). Również w modelu Coxa nie wykazano istotnego wpływu delecji 1p na DFS (Tabela 22).

Nadcięcie długiego ramienia chromosomu 17. jest najczęstszym zaburzeniem genetycznym stwierdzanym w pierwotnym NBL i może łączyć się również z gorszym rokowaniem. [9,12,15,19,22,49,55] W materiale własnym nadmiar 17q stwierdzono u 15 (25%) pacjentów, a wyników nie uzyskano w 38 (63,3%) przypadkach. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu zarówno zgonów spowodowanych przez NBL ($p=0,15$), jak i niepowodzeń leczenia ($p=0,11$) u pacjentów z i bez obecności nadmiaru materiału genetycznego 17q. Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego OS (Rysunek 21) dla chorych bez nadmiaru i z nadmiarem 17q wynosiło odpowiednio: 0,83 i 0,43 ($p=0,21$). Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego DFS (Rysunek 23) dla pacjentów bez i z nadmiarem 17q wynosiło odpowiednio: 0,69 i 0,34 ($p=0,31$). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa nie wykazano statystycznie znaczącego wpływu nadmiaru 17q ani na OS, ani na DFS (Tabela 19, Tabela 22).

Według aktualnych doniesień amplifikacja genu MYCN stanowi najsilniejszy marker złej prognozy. Zwielokrotnienie tego genu, umiejscowionego na krótkim ramieniu chromosomu 2., łączy się z szybką progresją guza i złymi wynikami leczenia, niezależnie od stopnia zaawansowania i wieku dziecka. Amplifikację genu MYCN stwierdza się w około 30% zaawansowanej NBL, a w 1. i 2. stopniu oraz w 4s., odpowiednio: w 4% i 8%. [9,10,16,21,55,66,77] Wśród 58 obecnie analizowanych pacjentów, u których wykonano badania w kierunku obecności amplifikacji MYCN, zaburzenie to stwierdzono łącznie u 12 (20,7%), i tylko w 3. i 4. stopniu zaawansowania, odpowiednio u: 4 (23,5%) i 8 (25,8%) dzieci. W dwóch przypadkach nie uzyskano wyniku. Wśród chorych z obecną amplifikacją MYCN (Tabela 54) wykazano statystycznie znaczniejsze występowanie zgonów spowodowanych przez NBL ($p=0,03$). Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego OS (Rysunek 12) dla wszystkich badanych pacjentów bez i z amplifikacją genu MYCN wynosiło odpowiednio: 0,63 i 0,27 ($p=0,01$).

Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego OS (Rysunek 13) dla pacjentów powyżej 1 r.ż. bez i z amplifikacją genu MYCN wynosiło odpowiednio: 0,46 i 0,30 ($p=0,15$). Nie wykazano również istnienia statystycznie znamienych różnic w występowaniu zgonów z powodu NBL u pacjentów powyżej 1. r.ż. z obecną amplifikacją genu MYCN w porównaniu z pacjentami bez tej nieprawidłowości ($p=0,54$). Wszyscy żyjący pacjenci w grupie dzieci z obecną amplifikacją genu MYCN byli w 3., lepiej rokującym stopniu zaawansowania choroby.

W materiale własnym nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu wznów lub progresji u pacjentów z obecną i nieobecną amplifikacją onkogenu MYCN ($p=0,2$). Natomiast prawdopodobieństwo ponad 5-letniego DFS (Rysunek 14) dla dzieci bez i z amplifikacją genu MYCN wynosiło odpowiednio: 0,56 i 0,28 i różnica ta była istotna statystycznie ($p=0,047$, Tabela 55). Wynika to najprawdopodobniej z faktu stwierdzenia późnych wznów choroby (powyżej 5 lat od rozpoznania) u pacjentów w 4. stopniu zaawansowania powyżej 1. r.ż. i bez amplifikacji genu MYCN. Chorzy ci mogą stanowić odrębną biologicznie podgrupę NBL, o rokowaniu niekorzystnym pomimo braku amplifikacji onkogenu MYCN, w której obecne są inne, dotąd jeszcze nie zidentyfikowane czynniki, wpływające na występowanie późnych niepowodzeń. [17,55,67] Dla badanych obecnie pacjentów powyżej 1 r.ż. z i bez amplifikacji genu MYCN prawdopodobieństwo ponad 5-letniego DFS było podobne ($p=0,4$, Rysunek 17).

Amplifikacja MYCN straciła swoje znaczenie prognostyczne u dzieci powyżej 1. r.ż., prawdopodobnie ze względu na dużą liczbę przypadków w 4. stopniu, zarówno w grupie z obecną, jak i nieobecną amplifikacją genu MYCN oraz silniejszy wpływ stopnia zaawansowania niż amplifikacji genu MYCN zarówno na OS, jak i na DFS.

Na uwagę zasługuje fakt, że wśród 19 pacjentów poniżej 1 r.ż. amplifikację genu MYCN stwierdzono tylko u jednego (5,2%) dziecka, które zmarło w wyniku gwałtownej progresji choroby odpornej na leczenie. W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa (Tabela 19, Tabela 22), wykonanej dla całej grupy pacjentów, obecność amplifikacji genu MYCN istotnie niekorzystnie wpływała zarówno na OS ($p=0,02$), jak i na DFS ($p=0,05$). Przeprowadzenie analizy wieloczynnikowej z zastosowaniem metody regresji krokowej (Tabela 20, Tabela 21, Tabela 23, Tabela 24) wykazało znamienne niekorzystny niezależny wpływ 4. stopnia zaawansowania i amplifikacji genu MYCN zarówno na OS (0,005), jak i na DFS (0,004).

Tabela 54. Znane dotąd czynniki prognostyczne istotnie statystycznie wpływające na występowanie zgonów i na czas całkowitego przeżycia (zgony z powodu NBL) dla wszystkich pacjentów z NBL – materiał własny

Badany parametr		Liczba dzieci		Wartość p		
		Zmarłych	Żyjących	Test χ^2	Regresja logistyczna	Czas całkowitego przeżycia test log rank
Wiek	poniżej 1. r.ż.	3	15	0,01	0,01	0,03
	powyżej 1. r.ż.	20	16			
Stopień zaawansowania	4.	19	9	0,00001	-	0,00007
	2., 3. i 4s	4	22			
Amplifikacja onkogenu MYCN	obecna	7	4	0,03	-	0,01
	nieobecna	14	27			

Tabela 55. Znane dotąd czynniki prognostyczne istotnie statystycznie wpływające na występowanie niepowodzeń leczenia i na czas przeżycia wolnego od choroby dla wszystkich pacjentów z NBL – materiał własny

Badany parametr		Liczba dzieci		Wartość p		
		Niepowodzenie leczenia	Bez niepowodzeń leczenia	Test χ^2	Regresja logistyczna	Czas przeżycia wolnego od choroby test log rank
Wiek	poniżej 1. r.ż.	4	15	0,001	0,00008	0,006
	powyżej 1. r.ż.	28	13			
Stopień zaawansowania	4.	24	7	0,00004	-	0,00001
	2., 3. i 4s	7	22			
Amplifikacja onkogenu MYCN	obecna	8	4	0,2	-	0,042
	nieobecna	22	24			

Biochemiczne czynniki prognostyczne

Według danych z piśmiennictwa stężenie NSE w surowicy w analizie wieloczynnikowej nie korelowało z wiekiem ani płcią, ale stanowiło niezależny czynnik prognostyczny. Wykazano, że NSE jest markerem prognostycznym u pacjentów zarówno w stadiach zlokalizowanych, jak i rozsiaanych, przy czym wyższy poziom markera wskazuje na gorsze rokowanie zwłaszcza w postaciach rozsiaanych. Stężenie NSE jest również podwyższone w 4s stopniu zaawansowania, ale z reguły niższe niż w stopniu 4., a jego podwyższenie może świadczyć o progresji choroby. [8,9,19]

Wśród 60 badanych obecnie dzieci z NBL, stężenie NSE oznaczono tylko u 11 pacjentów, w tym u 3 stężenie przekraczające i nieprzekraczające 3-krotnie normę dla wieku stwierdzono odpowiednio w: 8 i 3 przypadkach. Oznaczanie stężenia NSE w naszym ośrodku jest rutynowo wykonywane przy podejrzeniu NBL dopiero od kilku lat. Spośród 11 analizowanych pacjentów zmarło 4, wszyscy z powodu NBL. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu zgonów spowodowanych NBL u pacjentów w zależności od stężenia NSE ($p=0,21$). W grupie 3 pacjentów ze

stężeniem NSE nieprzekraczającym 3-krotnej wartości normy nie było zgonów. Spośród 11 analizowanych pacjentów obserwowano 8 niepowodzeń leczenia, w tym 5 wznów. Nie wykazano również statystycznie istotnej różnicy w występowaniu wznowy lub progresji choroby u pacjentów w zależności od stężenia NSE stwierdzanego wstępnie w trakcie ustalania rozpoznania ($p=0,15$). Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego DFS (Rysunek 27) dla pacjentów z poziomem NSE poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku wynosiło odpowiednio: 0,62 i 0,12 ($p=0,23$). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa (Tabela 19, Tabela 22) wykazano istotnie niekorzystny wpływ wyższego stężenia NSE zarówno na OS ($p=0,04$), jak i na DFS ($p=0,006$), ale w analizie wieloczynnikowej nie potwierdzono istotnego wpływu tego markera (Tabela 20, Tabela 21, Tabela 23, Tabela 24)

Podwyższone stężenie ferrytyny świadczy o aktywnie rosnącym guzie NBL i związane jest z gorszą prognozą. [9,36]

W materiale własnym ocenie poddano 42 pacjentów, w tym 12 z poziomem ferrytyny nieprzekraczającym 3-krotnie normy dla wieku i 30 z poziomem ferrytyny powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu zgonów spowodowanych NBL u pacjentów w zależności od stężenia ferrytyny ($p=0,32$). Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego OS (Rysunek 28) dla pacjentów z poziomem ferrytyny poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku wynosiło odpowiednio: 0,6 i 0,38 ($p=0,53$). Nie wykazano również statystycznie istotnej różnicy w występowaniu wznowy lub progresji choroby u pacjentów w zależności od stężenia ferrytyny ($p=0,14$). Prawdopodobieństwo 5-letniego DFS (Rysunek 29) dla pacjentów z poziomem ferrytyny poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku wynosiło odpowiednio: 0,67 i 0,27 ($p=0,33$). W analizie z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa nie wykazano statystycznie znamiennej wpływu stężenia ferrytyny ani na OS, ani na DFS (Tabela 19, Tabela 22).

Stężenie LDH jest markerem niespecyficznym, charakterystycznym dla szybkiego wzrostu i rozpadu komórek. Podwyższenie stężenia LDH w surowicy świadczy o dużej masie guza i jest czynnikiem niekorzystnym prognostycznie. [5,9,18]

W materiale własnym ocenie poddano 56 pacjentów, w tym 30 z poziomem LDH przekraczającym 3-krotnie normę dla wieku i 26 z poziomem LDH poniżej 3-krotnej wartości normy dla wieku. Spośród 56 analizowanych pacjentów zmarło 27, w tym 22 z powodu NBL. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu zgonów spowodowanych przez NBL u pacjentów w zależności od stężenia LDH ($p=0,18$). Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego OS dla pacjentów z poziomem LDH poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku wynosiło odpowiednio: 0,65 i 0,48 (Rysunek 25). Różnice między grupami były na granicy istotności statystycznej ($p=0,05$). Spośród 56 analizowanych dzieci niepowodzenie leczenia obserwowano w 29 przypadkach, w tym 18 wznów. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w występowaniu wznowy lub progresji choroby u pacjentów w zależności od stężenia LDH ($p=0,058$). Prawdopodobieństwo ponad 5-letniego DFS dla pacjentów z poziomem LDH poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku wynosiło odpowiednio: 0,62 i 0,33 (Rysunek 26). Różnice między grupami były istotne statystycznie ($p=0,007$). W analizie

z użyciem jednoczynnikowego modelu regresyjnego Coxa wykazano statystycznie znamienny wpływ stężenia LDH zarówno na OS ($p=0,004$), jak i na DFS ($0,004$) (Tabela 19, Tabela 22). Jednakże zastosowanie wieloczynnikowej analizy nie wykazało niezależnego, istotnego znaczenia rokowniczego tego biochemicznego markera.

Znaczenie białka Id2 w neuroblastoma

Na podstawie badania materiału własnego, zarówno dla całej analizowanej grupy, jak i analiz dokonanych w podgrupach wyodrębnionych ze względu na wiek pacjentów, stopień zaawansowania klinicznego i obecność amplifikacji MYCN, nie można jednoznacznie stwierdzić, że poziom ekspresji białka Id2 w komórce NBL ma znaczenie rokownicze. W większości wykonanych jednoczynnikowych analiz z użyciem różnych testów, wykonanych zarówno dla intensywności ekspresji białka Id2, jak i dla odsetka komórek z obecną ekspresją tego białka, nie wykazano statystycznie istotnego wpływu tych parametrów na częstość występowania niepowodzeń leczenia oraz na OS i DFS (Tabela 56). Jedynie w analizie z zastosowaniem testu U Manna-Whitneya wykazano statystycznie znamienne obniżenie DFS u pacjentów z silną ekspresją białka Id2 w komórkach NBL dla całej badanej grupy pacjentów ($p=0,041$) oraz dla 46 pacjentów bez amplifikacji MYCN ($p=0,047$) (Tabela 16, Tabela 17). Ponadto w grupie pacjentów bez amplifikacji MYCN można przypuszczać istnienie trendu w kierunku obniżenia OS u pacjentów z wysoką ekspresją białka Id2 w komórkach NBL ($p=0,08$). Analiza porównawcza krzywych przeżycia dla podgrup pacjentów w 4. stopniu zaawansowania lub z amplifikacją MYCN pod względem znaczenia rokowniczego intensywności ekspresji białka Id2 nie była możliwa ze względu na niską liczbę przypadków z niską intensywnością ekspresji Id2 dla obu analizowanych podgrup. Może to pośrednio wskazywać na silniejszą ekspresję białka Id2 w guzach o bardziej złośliwym przebiegu. Należy podkreślić, że zarówno amplifikacja MYCN, jak i stopień zaawansowania są silnymi niezależnymi czynnikami prognostycznymi, a na podstawie nielicznych przypadków trudno jest ocenić rolę intensywności ekspresji białka Id2 jako niezależnego czynnika rokowniczego. Należy również zwrócić uwagę na obserwowaną w wielu obecnie przeprowadzonych analizach tendencję do stabilizowania OS i DFS po 3 latach w grupie pacjentów z niską ekspresją Id2 (Rysunek 78, Rysunek 79) co również może pośrednio świadczyć o związku niższej intensywności ekspresji tego białka z mniej agresywnym przebiegiem choroby. Wyższy odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 nie wpływał na występowanie niepowodzenia leczenia (Tabela 14, Tabela 15).

Tabela 56. Wpływ intensywności ekspresji białka Id2 i odsetka komórek NBL z obecną ekspresją Id2 na częstość występowania niepowodzeń leczenia i na czas przeżycia wolnego od choroby

Analizowana grupa	Wartość p		
	Test χ^2	Regresja logistyczna	Porównanie krzywych przeżycia wolnego od choroby test log-rank
Cała grupa	0,32	0,07	0,17

Pacjenci bez amplifikacji genu MYCN	0,28	0,05	0,11
Pacjenci w stopniu 2., 3. i 4s	0,56	0,12	0,82

W materiale własnym nie stwierdzono statystycznie znamiennych pozytywnych korelacji między stężeniem biochemicznych markerów NBL (LDH, ferrytyna, NSE) a odsetkiem komórek NBL z obecną ekspresją Id2, jak również odsetkiem pozytywnych komórek guza a obecną amplifikacją MYCN (Rysunek 92, Rysunek 93, Rysunek 94, Rysunek 95)

W jednoczynnikowej analizie regresji hazardu Coxa zarówno poziom ekspresji białka Id2, jak i odsetek komórek z obecną ekspresją tego białka nie miały niezależnego znaczenia rokowniczego (Tabela 19, Tabela 22). Jedynie w grupie 11 pacjentów z korzystną budową patologiczną guza, wyższy odsetek pozytywnych komórek NBL istotnie korzystnie wpływał na DFS (Tabela 22). Jednakże ze względu na małą liczebność porównywanych podgrup uzyskany wynik należy brać pod uwagę z dużą ostrożnością.

Na podstawie uzyskanych wyników analiz we własnym materiale nie można stwierdzić, że intensywność ekspresji białka Id2 w sposób istotny wpływała na prognozę, jednakże godny uwagi wydaje się być obecny we wszystkich testach stały trend do poprawy przeżyć wolnych od zdarzeń niekorzystnych przy niższej ekspresji białka Id2, zwłaszcza przy braku innych silnych markerów niekorzystnej prognozy (Tabela 16, Tabela 17, Tabela 56, Rysunek 35). Obecne uzyskane wyniki analiz są zgodne z wynikami większości dotąd przeprowadzonych badań dotyczących znaczenia ekspresji białka ID2 w NBL. [1,30,72,90,92]. Tak jak to już wcześniej przedstawiono jedynie Lasorella i wsp. wykazali, że odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 wyższy niż 25% istotnie statystycznie wpływał zarówno na OS, jaki na DFS i był niezależnym czynnikiem prognostycznym. [40,43,44,46,47]

Rokowanie w NBL zależy nie tylko od wieku dziecka, ale także od innych czynników, przede wszystkim genetycznych i molekularnych. Obecnie około 60% wszystkich dzieci z NBL może uzyskać wyleczenie. Wyleczalność niemowląt w 1-3 stopniu zaawansowania bez amplifikacji genu MYCN jest wyższa niż 90%, natomiast u dzieci starszych wynosi około 70%. U części niemowląt obserwuje się samoistną regresję choroby. Wyniki leczenia noworodków z zaawansowaną chorobą, z objawami niewydolności wielonarządowej są nadal niezadowalające. Pomimo stosowania coraz intensywniejszych programów chemioterapii, łącznie z radykalnymi operacjami i przeszczepieniami komórek krwiotwórczych, rokowanie w grupie wysokiego ryzyka (dzieci powyżej 1. r.ż. w 4. stopniu zaawansowania, w 2. i 3. stopniu z obecnością amplifikacji genu N-Myc oraz niemowlęta w 2.-4. stopniu zaawansowania z obecną amplifikacją genu N-Myc), stanowiącej ponad 50% wszystkich dzieci z NBL, jest nadal niepomysłne. Tylko około 1/3 dzieci należących do tej grupy uzyskuje długie przeżycia. [4,5,18] Uzyskane w materiale własnym wyniki leczenia dzieci w 4. stopniu zaawansowania są również bardzo złe. (Rysunek 22, Rysunek 23, Rysunek 24, Tabela 11), a w analizach z zastosowaniem zarówno jednoczynnikowego, jak wieloczynnikowego modelu

regresyjnego Coxa wykazano, że stopień zaawansowania i amplifikacja genu MYCN są najważniejszymi, niezależnymi czynnikami rokowniczymi. Obecna amplifikacja MYCN i 4. stopień zaawansowania choroby istotnie niekorzystnie wpływały zarówno na OS, jak i DFS (Tabela 20, Tabela 21, Tabela 23, Tabela 24).

Możliwość wyleczenia pacjentów, u których wystąpiła wznowa choroby po leczeniu NBL wysokiego ryzyka jest niewielka, pomimo stosowania różnych metod, z uwzględnieniem nowych leków cytotoksycznych, generacji retinoidów i różnych form immunoterapii oraz celowanej radioterapii. W celu poprawy wyników leczenia NBL konieczna jest m.in. weryfikacja czynników prognostycznych i poprawa stratyfikacji pacjentów do odpowiednich grup terapeutycznych. Zastosowanie nowych metod leczenia, dostosowanego nie tylko intensywnością do grupy ryzyka, ale także specyficznością do charakterystycznych zmian (m.in. cytogetycznych i molekularnych), występujących w danej postaci NBL oraz udoskonalenie terapii wspomagającej, może przyczynić się do zwiększenia wyleczalności, zwłaszcza w grupie wysokiego ryzyka oraz zmniejszenia powikłań terapii i poprawy jakości życia wszystkich dzieci z tym nowotworem. Wielokierunkowe badania nad nowymi preparatami leczniczymi dla NBL, napawają optymizmem. [5,33] Istotne jest również wcześniejsze rozpoznawanie NBL, co może przyczynić się do zmniejszenia częstości występowania źle rokującej, zaawansowanej choroby i również wpłynąć na poprawę wyników leczenia.

Dalsze badania dotyczące znaczenia ekspresji białka Id2 w NBL, ze względu na jego specyficzną wielokierunkową funkcję w komórce, może przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów odpowiadających za powstanie i progresję tego nowotworu. Ponadto, ze względu na kluczową rolę białka Id2 w proliferacji i różnicowaniu komórek, zahamowanie funkcji Id2 może stanowić potencjalny cel terapeutyczny, pozwalający na równoczesny wpływ na kilka istotnych mechanizmów, odpowiadających za utrzymanie złośliwego fenotypu nowotworu.

6. Wnioski

1. Ekspresja białka Id2 w komórkach neuroblastoma była stwierdzona w każdym z 60 preparatów sporządzonych z materiału guza pobranego od pacjentów z neuroblastoma, co może być wykorzystane w uzupełniającej diagnostyce tego nowotworu. Obserwowano różny odsetek komórek z obecną ekspresją białka Id2 (1-100%) oraz różną intensywność ekspresji, przy czym znacznie przeważała silna ekspresja i wysoki odsetek komórek pozytywnych.
2. Ekspresja białka Id2 w komórkach neuroblastoma pochodzących od pacjentów, oceniana zarówno jako intensywność ekspresji jak i odsetek komórek z obecną ekspresją nie miała istotnego statystycznie wpływu na występowanie niepowodzeń leczenia, takich jak: wczesna progresja oraz wznova choroby i zgonów spowodowanych neuroblastoma, nie może więc być traktowana jako czynnik prognostyczny.
3. Retrospektywna ocena częstości występowania zdefiniowanych czynników prognostycznych i markerów choroby u pacjentów z neuroblastoma wykazały zgodność z danymi literaturowymi, wskazując m. in. na wysoki odsetek pacjentów powyżej 1 roku życia z rozpoznawaną chorobą w 4 stopniu zaawansowania
4. Zastosowanie wieloczynnikowej analizy pozwoliło na wyodrębnienie wśród licznych znanych czynników prognostycznych, że 4 stopień zaawansowania choroby, wiek pacjenta powyżej 1.r.ż. oraz obecność amplifikacji genu MYCN mają istotny niezależny wpływ na występowanie zgonów spowodowanych NBL oraz niepowodzeń leczenia. Rola stopnia zaawansowania i amplifikacji MYCN została potwierdzona w analizie wieloczynnikowej.
5. Intensywność ekspresji białka Id2 ani odsetek komórek z obecną ekspresją tego białka nie wykazuje korelacji nie wiąże się z obecnością amplifikacji z amplifikacją onkogenu MYCN ani z innymi znanymi czynnikami rokowniczymi
6. Ze względu na kluczowe znaczenie białka Id2 w proliferacji komórek, ich różnicowaniu, funkcjonalnym blokowaniu proapoptotycznego działania białka pRb oraz znaczenie w angiogenezie, możliwe, że chociaż Id2 nie ma znaczenia prognostycznego, to jego deregulacja może stanowić kluczowe wydarzenie w powstawaniu nowotworu, a przez to, że powszechnie występuje w komórkach neuroblastoma, może w przyszłości stanowić potencjalny cel terapeutyczny
7. Kontynuowanie badań dotyczących zachowania się białka Id2 w komórkach neuroblastoma obejmujących większe grupy pacjentów z zastosowaniem tych samych warunków i metod oznaczeń, może przyczynić się do lepszego poznania etiopatogenezy tego nowotworu i opracowania nowych sposobów postępowania terapeutycznego.

7. Streszczenie

Wprowadzenie: Chociaż znanych jest już wiele czynników prognostycznych w NBL, precyzyjne określenie rokowania w tej chorobie nadal nie jest możliwe. Na podstawie dotąd poznanych licznych zaburzeń genetycznych w komórkach NBL oraz mechanizmów biorących udział w transformacji nowotworowej, nadal nie można wyjaśnić, dlaczego część guzów ulega samoistnej regresji, a w innych, pomimo intensywnego leczenia dochodzi do progresji choroby i zgonu pacjenta. Mimo intensywnej terapii, wyleczalność w grupie wysokiego ryzyka pozostaje bardzo niska (około 30%). Dlatego w celu wyboru odpowiedniej terapii powinny być kontynuowane badania nad zaburzeniami biorącymi udział w złożonym procesie nowotworzenia oraz nad istotnymi czynnikami wpływającymi na przebieg choroby. Określone zaburzenia molekularne mogą również stanowić cel terapeutyczny przez wprowadzenie leczenia hamującego lub korygującego skutki tych nieprawidłowości. W obecnej pracy podjęto badania nad ekspresją białka Id2 w komórkach NBL, w tym ocenę znaczenia prognostycznego i korelacji tej ekspresji ze znanymi już czynnikami rokowniczymi u dzieci w NBL. Dodatkowo, zbadano we własnym materiale częstość występowania wybranych znanych czynników prognostycznych i oceniono ich wpływ na OS i DFS.

Metody: Spośród 100 pacjentów z NBL leczonych w Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii w latach 1991-2005, u 60 wykonano ocenę ekspresji białka Id2 metodą immunohistochemiczną na materiale guza utrwalonym w parafinie. Amplifikację MYCN oceniono metodą FISH. Badano również występowanie delecji 1p i nadmiaru 17q. Wykorzystano wyniki badań wykonanych na świeżym materiale, a w przypadku ich braku wykonano badanie retrospektywne. Jednakże ze względu na trudności interpretacyjne związane z przekrojami przez jądro komórkowe w przypadku oceny 17q i 1p do badań włączono wyłącznie wyniki oznaczeń wykonanych wstępnie na świeżym materiale. Dokonano również weryfikacji wstępnej oceny histopatologicznej guzów zgodnie z klasyfikacją INPC. Charakterystykę kliniczną pacjentów, wyniki leczenia oraz wyniki badań laboratoryjnych opracowano na podstawie dokumentacji medycznej. Analizy statystyczne wykonano przy zastosowaniu pakietu Statistica®.

Wyniki: W obecnie przeprowadzonym badaniu ekspresja białka Id2 została stwierdzona we wszystkich 60 preparatach wykonanych z guzów pobranych od pacjentów z NBL. Oceniane preparaty różniły się intensywnością ekspresji (oszacowanej na podstawie porównania z kontrolą) oraz odsetkiem komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2. Odsetek pozytywnych komórek wahał się od 1–100% (średnia: 77,7%, mediana: 85%). Intensywność ekspresji białka Id2 była porównywalna w grupie dzieci powyżej i poniżej 1. r.ż. ($p=0,39$) oraz z i bez amplifikacji MYCN ($p=0,33$). Natomiast istotnie więcej dzieci z silną ekspresją białka Id2 było w grupie pacjentów w 4. stopniu w porównaniu z pacjentami w 2., 3. i 4s stopniu zaawansowania ($p=0,03$). W żadnej z analizowanych podgrup nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic w odsetku komórek z obecną ekspresją białka Id2. Nie stwierdzono również istotnych statystycznie korelacji między odsetkiem komórek NBL z obecną ekspresją Id2 a OS, DFS, ani ze stężeniami biochemicznych markerów choroby.

Zarówno w całej grupie pacjentów, jak i w podgrupach wyodrębnionych na podstawie obecności wybranych czynników prognostycznych (wiek, stopień zaawansowania, amplifikacja genu MYCN, delecja 1p, nadmiar 17q, budowa histopatologiczna guza), nie wykazano statystycznie znamienego wpływu intensywności białka Id2 na OS i DFS. W analizie regresji logistycznej nie stwierdzono wpływu odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 na częstość występowania zgonów z powodu NBL, wczesnej progresji i wznów choroby. Jednakże w grupie pacjentów bez amplifikacji MYCN można przypuszczać istnienie trendu w kierunku obniżenia OS u pacjentów z wysoką ekspresją białka Id2 w komórkach NBL ($p=0,08$), a w całej badanej grupie ($p=0,07$) oraz u pacjentów bez amplifikacji MYCN ($p=0,05$) obserwowano trend w kierunku większego ryzyka wystąpienia niepowodzeń leczenia u dzieci z wyższą ekspresją białka Id2. Natomiast odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 nie wpływał na występowanie niepowodzenia leczenia.

Retrospektywna analiza znanych czynników prognostycznych i markerów choroby wykazała zgodność z danymi epidemiologicznymi, wskazując na relatywnie wysoki odsetek pacjentów powyżej 1 r.ż. (68,3%) i w 4. stopniu zaawansowania (51,7%). Częstość występowania amplifikacji MYCN jest również zgodna z danymi podawanymi w literaturze (20%).

W jednoczynnikowej analizie Coxa wykazano, że wiek, stopień zaawansowania, amplifikacja MYCN i stężenie LDH miały statystycznie znamieny wpływ zarówno na OS, jak i DFS. Pozostałe analizowane czynniki (delecja 1p, nadmiar 17q, budowa histopatologiczna guza, stężenie ferrytyny i NSE) nie wpływały w sposób znamieny statystycznie na OS i DFS. Istotne statystycznie niekorzystne znaczenie 4. stopnia zaawansowania i obecnej amplifikacji MYCN zostało potwierdzone w wieloczynnikowej analizie proporcjonalnego hazardu Coxa.

Na podstawie uzyskanych wyników nie można stwierdzić, że ekspresja białka Id2 w istotny sposób wpływała na prognozę, jednakże godny uwagi wydaje się obecny we wszystkich testach stały trend do poprawy OS i DFS przy niższej ekspresji białka Id2, zwłaszcza przy braku innych silnych markerów niekorzystnej prognozy.

Wnioski: Ekspresja białka Id2 w komórkach NBL pochodzących od pacjentów, oceniana zarówno jako intensywność ekspresji jak i odsetek komórek z obecną ekspresją nie miała istotnego statystycznie wpływu na występowanie niepowodzeń leczenia, takich jak: wczesna progresja i wznowa choroby oraz zgony spowodowane przez NBL. Wobec tego nie może być traktowana jako czynnik prognostyczny. W analizach z zastosowaniem wieloczynnikowego modelu regresyjnego Coxa wykazano, że stopień zaawansowania i amplifikacja genu MYCN są najważniejszymi, niezależnymi czynnikami rokowniczymi.

Kontynuowanie badań dotyczących zachowania się białka Id2 w komórkach NBL obejmujących większe grupy pacjentów z zastosowaniem tych samych warunków i metod oznaczeń, może przyczynić się do lepszego poznania etiopatogenezy tego nowotworu i opracowania nowych sposobów postępowania terapeutycznego. Istotne jest również wcześniejsze rozpoznawanie NBL, co może przyczynić się do zmniejszenia częstości występowania źle rokującej, zaawansowanej choroby i również wpłynąć na poprawę wyników w uzupełniającej diagnostyce tego nowotworu.

8. Abstract

Background: Although many prognostic factors are known in NBL, there is still no possibility to precisely predict the prognosis and disease outcome. There is no explanation of spontaneous regression of NBL without treatment, as well as the rapid progression despite intensive therapy, on the basis of the current knowledge of genetic aberrations in NBL cells and the mechanisms of neoplastic transformation. In spite of intensive treatment, only 30% of patients in high risk group can be cured. For these reasons, it is necessary to continue studies concerning factors taking part in the complex process of oncogenesis and the crucial factors influencing disease outcome. The aim of this study was evaluation of the Id2 protein expression in NBL, including its influence on OS and DFS as well as its correlation with selected known prognostic factors. Additionally, the analysis of selected prognostic factors and their influence on OS and DFS was performed.

Methods: In the years 1991-2005, among 100 patients treated for NBL in Department of Pediatric Oncology and Hematology, Polish-American Institute of Pediatrics, 60 were retrospectively evaluated. Id2 protein expression was examined by immunohistochemistry on paraffin embedded tumor tissue. MYCN amplification was evaluated with FISH. The material of the patients with missing results of 1p deletion and 17q gain was also evaluated. Either the results obtained at diagnosis were analyzed or additional examinations were performed on paraffin embedded tumor sections. Due to the problems with 1p deletion and 17q gain results interpretation, caused by cell nuclei sections on preparations it was decided not to include the retrospective evaluation results to analysis. All tumors were re-evaluated by pathologist according to INPC classification. Clinical and laboratory data were worked out on the basis of the patients' medical documentation. Statistical analysis was done using Statistica® software.

Results: In the presented study, all 60 analyzed tumors showed the presence of Id2 protein expression. The evaluated tumors differed in the intensity of expression (estimated on the basis on comparison with positive control) and the percentage of NBL cells with positive Id2 protein expression. The percentage of positive cells ranged from 1-100% cells (mean: 77,7%, median: 85%). The intensity of Id2 protein expression was comparable in children over and under 1 year of age ($p=0,39$) as well as with and without MYCN amplification ($p=0,33$). However, patients in stage 4 NBL had higher intensity of Id2 protein expression than the patients in stage 2, 3 and 4s ($p=0,03$) Neither in the whole group of patients, nor in the selected subgroups, there were any differences in the percentage of cells with expression of Id2 protein. There was no statistically significant influence of the percentage of Id2 positive NBL cells on OS, DFS or the level of biochemical disease markers. Neither in the whole group of patients nor in the subgroups selected on the basis of the known prognostic factors (age, stage, MYCN amplification, 1p deletion, 17q gain, histopathology) statistically significant influence of Id2 protein intensity on OS and DFS was revealed. In logistic regression analysis, there was no influence of the percentage of the cells with the Id2 protein expression on deaths caused by NBL and the disease progression or relapse. However, in patients without MYCN amplification it can be supposed that there is a tendency to lower OS in patients with strong Id2 expression in NBL cells ($p=0,08$) and in

the whole group ($p=0,07$). In the group without MYCN amplification ($p=0,05$) there was a tendency to higher risk of disease relapse or progression in patients with stronger intensity of Id2 expression.

Retrospective evaluation of the established prognostic markers and risk factors is in concordance with epidemiological data, showing the relatively high number of the patients over 1 year of age (68,3%), with stage 4 NBL (51,7%). The presence of MYCN amplification was comparable with the data described in literature (20%).

In univariable Cox regression model it was shown that age, stage, MYCN amplification and LDH level had statistically significant influence on OS and DFS. The role of the other analyzed factors was not statistically significant (17q gain, 1p deletion, histopathology, ferritin and NSE level). The statistically significant adverse influence of stage and MYCN amplification on OS and DFS was confirmed in the multivariate Cox regression analysis.

On the basis of presented results it cannot be concluded that Id2 protein expression is a prognostic factor in NBL, although the constant tendency toward OS and DFS improvement in the patients with lower intensity of Id2 protein expression can be observed in all analyses, especially when other strong negative prognostic markers are not present.

Conclusions: Id2 expression, analyzed both as Id2 protein expression intensity and percentage of Id2 positive NBL cells, had no statistically significant influence on disease relapse and progression and deaths caused by NBL, so it cannot be considered a prognostic factor.

In the multivariate Cox regression analysis it was shown that stage and MYCN amplification are the most important independent prognostic factors.

Although Id2 may take part in the pathogenesis of NBL, it probably does not correlate with well established risk factors and it is not an independent risk factor. Because of the participation of Id2 protein in cell proliferation and differentiation, its role in functional blocking of pRb and its contribution to angiogenesis control, its deregulation may play crucial role in the NBL development. As it is abundantly present in NBL tumors, it might be a potential therapeutic target.

Continuation of studies concerning the role of Id2 protein in NBL cells including higher number of patients, with employment of comparable conditions and evaluation methods may contribute to better knowledge of the NBL etiopathogenesis and discover of new therapeutic options. It is crucial to improve NBL diagnosis as the early diagnosis can decrease frequency of advanced disease with poor prognosis and improve treatment results.

9. Piśmiennictwo

1. Alaminos M, Gerald WL, Cheung NKV: Prognostic value of MYCN and ID2 overexpression in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45: 909-915
2. Al-Haji M, Clarke MFL: Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 24: 7274-7282
3. Ambros PF. ISCN 1995. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Recommendations of the International Staging Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F. Basel, Karger, Switzerland; 2005: 83-92
4. Balwierz W: Strategie postępowania w nerwiaku zarodkowym współczulnym. *Przegl Lek* 2004; 61 (supl.2): 3-8
5. Balwierz W: Nerwiak zarodkowy współczulny. W: *Onkologia i hematologia dziecięca* (red.: Chybicka A, Sawicz-Birkowska K) PZWL, Warszawa 2008, 357-374
6. Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H: The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 1990; 61 (1): 49-59
7. Benezra R, Rafii S, Lyden D: The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene* 2001; 20: 8334-8341
8. Berthold F, Engelhardt FU, Schneider A et al.: Age dependence and prognostic impact of neurospecific enolase (NSE) in children with neuroblastoma. *In Vivo* 1991; 5: 1230-1234
9. Berthold F, Kassenbohmer R, Zieschang J: Multivariate evaluation of prognostic factors in localized neuroblastoma. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1994; 16: 107-115
10. Bordow SB, Norris MD, Haber PS, Marshall GM, Haber M: Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1998; 16 (10): 3286-94
11. Boriello A, Roberto R, Della Ragione F, Iolascon A: Proliferate and survive: cell division cycle and apoptosis in human neuroblastoma. *Haematologica* 2002; 87: 196-214
12. Bown N, Łastowska M, Cotterill S et al.: 17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. *Med Ped Oncol* 2001; 31: 14-19
13. Bown N: Neuroblastoma tumor genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol* 2001; 54: 897-910
14. Breit S, Schab M: Suppression of MYC by high expression of NMYC in human neuroblastoma Wells. *J Neurosci Res* 1989; 24: 21-28
15. Brinkschmidt C, Christiansen H, Terpe HJ et al.: Distal chromosome 17 gains in neuroblastomas detected by comparative genomic hybridization (CGH) are associated with a poor clinical outcome. *Med Ped Oncol* 2001; 31: 11-13

16. Brodeur GM, Fong CT, Morita M et al.: Molecular analysis and clinical significance of N-myc amplification and chromosome 1p monosomy in human neuroblastomas. *Prog Clin Biol Res* 1988; 271: 3-15
17. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ et al: Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19: 93-101
18. Brodeur GM, Maris JM: Neuroblastoma W: Principles and practice of pediatric oncology. Fourth edition. Edited by Pizzo PA and Poplack DG. Lippicott Williams & Wilkins, Philadelphia 2002; 895-937
19. Brodeur GM, Nakagawara A: Molecular basis of clinical heterogeneity in neuroblastoma. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992; 14: 111-116
20. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A et al.: International criteria for diagnosis, staging, and response treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1874-1881
21. Brodeur GM, Seeger RC, Schwabb M et al.: Amplification of N-myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; 224: 1121-1124
22. Caron H, Hogenbirk K, van Sluis P et al: Relative prognostic value of genetic factors in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36: 14-19
23. Cohn SL, London WB, Huang D et al.: MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advance-staged neuroblastoma with nonamplified MYCN. *J Clin Oncol* 2000; 18 (21): 3604-13
24. Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ et al.: Resistance to TRAIL-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Med Ped Oncol* 2000; 35: 603-607
25. Engel I, Murre C: The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. *Nat Rev Immunol* 2001; 1 (3): 193-9
26. Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J: A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's Cancer Study Group. *Cancer* 1971; 27: 374-378
27. Ferguson KL, Slacks RS: The Rb pathway in neurogenesis. *Neuroreport* 2001; 12(9): A55-62
28. Fraidenraich D, Stilwell D, Romero E et al.: Rescue of cardiac defects in ID knockout embryos by injection of embryonic stem cells. *Science* 2004; 306: 247-252
29. Funato N, Ohtani K, Ohyama K, Kuroda T, Nakamura M: Common regulation of growth arrest and differentiation of osteoblasts by helix-loop-helix factors. *Mol Cell Biol* 2001; 21 (21): 7416-7428
30. Gebauer S, Yu AL, Omura-Minamisawa M, Batova A, Diccianni M: Expression profiles and clinical relationship of ID2, CDKN1B and CDKN2A in primary neuroblastoma. *Genes Chrom Cancer* 2004; 41: 297-308.

31. Gilbert F: Solid tumors of children: chromosome abnormalities and the development of cancer. J Cell Physiol Suppl 1984; 3: 165-170
32. Gleichmann M, Buchheim G, El-Bizri H et al.: Identification of inhibitor-of-differentiation 2 (Id2) as a modulator of neuronal apoptosis. J Neurochem 2002; 80: 755-762
33. Goldsmith KC, Hogarty MD: Targeting programmed cell death pathways with experimental therapeutics: opportunities in high-risk neuroblastoma. Cancer Lett 2005; 228: 133-141
34. Gumireddy K, Ikegaki N, Phillips PC, Sutto LN, Reddy CD: Effect of 20-*epi*-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on the proliferation of human neuroblastoma: role of cell cycle regulators and Myc-Id2 pathway. Biochem Pharmacol 2003; 65: 1943-1955
35. Hacker C, Kirsch RD, Ju XS et al.: Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. www.nature.com/natureimmunology 2003
36. Hann HW, Evans AE, Siegel SE et al.: Prognostic importance of serum ferritin in patients with stage III and IV neuroblastoma: the Children's Cancer Study Group Experience. Cancer Res 1985; 45: 2843-2848
37. Hara E, Yamaguchi T, Nojima H et al.: Id related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. J Biol Chem 1994; 269 (3): 2139-45
38. Hickman ES, Moroni MC, Helin K: the role of p53 and pRb in apoptosis and cancer. Curr Opin in Genetics and Development 2002; 12: 60-66
39. Iavarone A, Garg A, Lasorella A, Hsu J, Israel M: The helix-loop-helix protein Id2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. Genes Dev 1994; 8: 270-284
40. Iavarone A, Lasorella A: Id proteins in neural cancer. Cancer Lett 2004; 204 (2): 186-96
41. Itahama Y, Singh J, Sumida T et al.: Role of Id-2 in the maintenance of a differentiated and noninvasive phenotype in breast cancer cells. Cancer Res 2003; 63: 7098-7105
42. Ladenstein R, Ambros IM, Potchger U et al.: Prognostic significance of DNA di – tetraploidy in neuroblastoma. Med Ped Oncol 2001; 36: 83-92
43. Lasorella A, Boldrini R, Dominici C et al.: Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of N-Myc in human neuroblastoma. Cancer Res 2002; 63: 301-306
44. Lasorella A, Iavarone A, Israel MA: Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins. Mol Cell Biol 1996; 16 (6): 2570-2578
45. Lasorella A, Iavarone A: The protein ENH is a cytoplasmic sequestration factor for Id2 in normal and tumor cells from the nervous system. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103 (13): 4976-4981
46. Lasorella A, Nosedà M, Beyna M, Yokota Y, Iavarone A: Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. Nature 2000; 407 (6804): 592-598

47. Lasorella A, Rothschild G, Yokota Y, Russel RG, Iavarone A: Id2 mediates tumor initiation, proliferation, and angiogenesis in *Rb* mutant mice. *Mol Cell Biol* 2005; 25 (9): 3563-3574
48. Lasorella A, Uo T, Iavarone A: Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene* 2001; 20: 8326-8333
49. Łastowska M, Cotterill S, Pearson ADJ et al: Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1627-33
50. Lee EY, Hu N, Yuan SS et al.: Dual roles of the retinoblastoma protein in cell cycle regulation and neuron differentiation. *Genes & Development* 1994; 8: 2008-2021
51. Liu Y, Encinas M, Comella JX, Aldea M, Gallego C: Basic helix-loop-helix proteins bind to *TrkB* and *p21^{Cip1}* promoters linking differentiation and cell cycle arrest in neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* 2004; 24(7): 2662-2672
52. Lofstedt T, Jogi A, Sigvardsson A et al: Induction of ID2 expression by hypoxia-inducible factor-1. A role in dedifferentiation of hypoxic neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2004; 279(38): 39223-39231
53. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ et al.: Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1991; 9: 581-591
54. Lopez-Carballo G, Morenos L, Masia S, Perez P, Barettino D: Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neuronal differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biochem* 2002; 277 (28): 25297-25304
55. Maris JM: Genetics of neuroblastoma. www.eurogene.org/etext/cancgen/lectures
56. Maris JM, Guo C, Blake D et al.: Comprehensive analysis of chromosome 1p deletions in neuroblastoma. *Med Ped Oncol* 2001; 36: 32-36
57. Maris JM, Guo C, White PS et al.: Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma. *Med Ped Oncol* 2001; 36: 24-27
58. Maris JM, Weiss MJ, Guo C 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
59. Massari ME, Murre C: Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 2000; 20 (2): 429-440
60. Mathew S, Chen W, Murty VV, Benezra R, Chaganti RS: Chromosomal assignment of human ID1 and ID2 genes. *Genomics* 1995; 30 (20): 385-387
61. Nagata Y, Shoji W, Obinata M, Todokoro K: Phosphorylation of helix-loop-helix proteins ID1, ID2 and ID3. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 207: 916-926

62. Nickoloff BJ, Chatuverdi V, Bacon P et al.: Id-1 delays senescence but not immortalize keratinocytes. *J Biol Chem* 2000; 275 (36): 27501-27504
63. Norton JD, Atherton GT: Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins. *Mol Cell Biol* 1998; 18 (4): 2371-2381
64. Norton JD, Deed RW, Craggs G, Sablitzky F: Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 58-65
65. Oppendal BR, Oien O, Jahnsen T, Brandtzaeg P: N-myc amplification in neuroblastoma: histopathological, DNA ploidy, and clinical variables. *J Clin Pathol* 1989; 42: 1148-1152
66. Oppendal BR, Storm MI, Lie SO, Brandtzaeg P: Prognostic factors in neuroblastoma. Clinical, histopathological, and immunohistochemical features and DNA ploidy in relation to prognosis. *Cancer* 1988; 62: 772-780
67. Oude Luttikhuis MEM, Powell JE, Rees SA et al.: Neuroblastoma with chromosome 11q loss and single copy MYCN comprise a biologically distinct group of tumours with adverse prognosis. *Brit J Cancer* 2001; 85 (4): 531-537
68. Pajic M, Norris MD, Cohn SL, Haber M: The role of the multidrug resistance-associated protein 1 gene in neuroblastoma biology and clinical outcome. *Cancer Letters* 2005; 228: 241-246
69. Parrinello S, Qiao Lin C, Murata K et al.: Id-1, ITF-2, and Id-2 comprise a network of helix-loop-helix proteins that regulate mammary epithelial cell proliferation, differentiation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276 (42): 39213-39219
70. Perez CA, Matthay KK, Atkinson JB et al.: Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 2000; 18: 18-26
71. Perk J, Iavarone A, Benezra R: Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5 (8): 603-614
72. Raetz EA, Kim MK, Moos P, Carlson M, Broggers C, Hooper DK, Foot L, Liu T, Seeger R, Carroll WL: Identification of genes that are regulated transcriptionally by Myc in childhood tumors. *Cancer* 2003; 98 (4): 841-53
73. Rothschild G, Zhao X, Iavarone A, Lasorella A: E proteins and Id2 converge on p57^{Kip2} to regulate cell cycle in neural cells. *Mol Cell Biol* 2006; 26 (11): 4351-4361
74. Sato Y, Kabayashi Y, Sasaki H et al.: Expression of Id2 mRNA in neuroblastoma and normal ganglion. *EJSO* 2003; 29: 284-287
75. Schleiermacher G, Raynal V, Janoueix-Lerosey I et al.: Variety and complexity of chromosome 17 translocations in neuroblastoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2004; 39: 143-150

76. Schramm A, Schulte JH, Astrahantseff K et al.: Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Letters* 2005; 228: 143-153
77. Seeger RC, Brodeur GM, Dather H et al.: Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastoma. *N Engl J Med* 1985; 313: 1111-1116
78. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP et al.: Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 1999; 86: 349-363
79. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP et al.: The International Neuroblastoma Pathology Classification (Shimada System). *Cancer* 1999; 86: 364-372
80. Shuster JJ, McWilliams NB, Castelberry R et al.: Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group recursive partitioning study. *Am J Clin Oncol* 1992; 15: 295-303
81. Slack A, Lozano G, Shohet JM: MDM2 as MYCN transcriptional target: implications for neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Letters* 2005; 228: 21-27
82. Takita J, Ishii M, Tsutsumi S et al.: Gene expression profiling and identification of novel prognostic marker genes in neuroblastoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2004; 40: 120-132
83. Takita J, Yang HW, Chen YY et al.: Allelic imbalance on chromosome 2q alterations of the caspase 8 gene in neuroblastoma. *Oncogene* 2001; 20: 4424-4432
84. Tanaka S, Tajiri T, Noguchi S et al.: Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of MYCN in neuroblastoma. *J Ped Surg* 2004; 39: 63-68
85. Tang XX, Zhao H, Kung B et al.: The MYCN enigma: significance of MYCN expression in neuroblastoma. *Cancer Res* 2006; 66 (5): 2826-33
86. Teitz T, Lahti JM, Kidd VJ: Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J Mol Med* 2001; 79: 428-436
87. Teitz T, Wei T, Valetine MB et al.: Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000; 6 (5): 529-35
88. Toma JG, El-Bizri H, Barnabe-Heider F, Aloyz R, Miler FD: Evidence that helix-loop-helix proteins collaborate with retinoblastoma tumor suppressor protein to regulate cortical neurogenesis. *J Neurosci* 2000; 20 (20): 7648-7656
89. Tzeng SF: Inhibitors of DNA binding in neural proliferation and differentiation. *Neurochem Res* 2003; 28 (1): 45-52
90. Vandesompele J, Edsjo A, De Preter K et al.: ID2 expression in neuroblastoma does not correlate to MYCN levels. *Oncogene* 2003; 22: 456-460

91. Vandesompele J, Speleman F, Van Roy N et al.: Multicentre analysis of patterns of DNA gains and losses in 204 neuroblastoma tumors: how many genetic subgroups are there? *Med Ped Oncol* 2001; 36: 5-10
92. Wang Q, Hii G, Shusterman S et al.: ID2 expression is not associated with MYCN amplification or expression in human neuroblastomas. *Cancer Res* 2003; 63: 1631-1635
93. www.cancerindex.org
94. www.siopen-r-net.org
95. Yokota Y, Mori S, Narumi O, Kitajima K: In vivo function of a differentiation inhibitor, Id2. *Life* 2001; 51: 207-214
96. Yokota Y: Id and development. *Oncogene* 2001; 20: 8290-8298

10. Spis tabel

Tabela 1. Stopień zaawansowania neuroblastoma według kryteriów INSS [18]	10
Tabela 2. Charakterystyka grup ryzyka w neuroblastoma [17]	12
Tabela 3. Kryteria odpowiedzi na leczenie [94]	13
Tabela 4. Klasyfikacja histopatologiczna guzów neuroblastycznych wg INPC [20,79]	14
Tabela 5. Korelacja obecności amplifikacji MYCN ze stopniem zaawansowania i odsetkiem przeżyć całkowitych [9]	22
Tabela 6. Znaczenie prognostyczne receptorów neurotropin w neuroblastoma	24
Tabela 7. Charakterystyka pacjentów z neuroblastoma (n=60)	40
Tabela 8. Występowanie zgonów z powodu NBL w zależności od wieku pacjenta	53
Tabela 9. Przyczyny zgonów z powikłań u pacjentów poniżej i powyżej 1. r.ż.	53
Tabela 10. Występowanie niepowodzenia leczenia w zależności od wieku pacjenta	55
Tabela 11. Wyniki leczenia 60 dzieci z neuroblastoma	83
Tabela 12. Wpływ liczby komórek z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie niepowodzeń leczenia	93
Tabela 13. Wpływ odsetka komórek z ekspresją białka Id2 na występowanie wznowy lub progresji choroby u pacjentów bez amplifikacji MYCN	100
Tabela 14. Wpływ odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie zgonów z powodu NBL	108
Tabela 15. Wpływ odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 na występowanie niepowodzenia leczenia	109
Tabela 16. Czas przeżycia całkowitego (zgony z NBL), a intensywność ekspresji białka Id2	111
Tabela 17. Czas przeżycia wolnego od choroby a intensywność ekspresji białka Id2	113
Tabela 18. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2, a obecna amplifikacja genu MYCN	115
Tabela 19. Wyniki jednoczynnikowej analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu poszczególnych parametrów na całkowite przeżycie dla całej grupy pacjentów (n=54) ..	117
Tabela 20. Wyniki analizy wieloczynnikowej proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na przeżycie całkowite w analizie jednoczynnikowej dla całej grupy (n=54)	118
Tabela 21. Parametry istotnie wpływające na przeżycie całkowite po zastosowaniu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa metodą regresji krokowej dla całej grupy (n=54)	119
Tabela 22. Wyniki jednoczynnikowej analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas wolny od choroby dla całej grupy pacjentów (n=60)	119
Tabela 23. Wyniki analizy wieloczynnikowej proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na przeżycia wolne od choroby w analizie jednoczynnikowej dla całej grupy (n=60)	120
Tabela 24. Parametry istotnie wpływające na czas wolny od choroby po zastosowaniu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa metodą regresji krokowej dla całej grupy (n=60)	121
Tabela 25. Wyniki jednoczynnikowej analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas całkowitego przeżycia dla pacjentów powyżej 1. r.ż. (n=36)	121
Tabela 26. Wyniki jednoczynnikowej analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów powyżej 1. r.ż. (n=41)	122
Tabela 27. Wyniki jednoczynnikowej analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na całkowity czas przeżycia dla pacjentów poniżej 1. r.ż. (n=18)	123
Tabela 28. Wyniki analizy wieloczynnikowej proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na całkowite przeżycie w analizie jednoczynnikowej dla dzieci poniżej 1. r.ż. (n=18)	123
Tabela 29. Wyniki jednoczynnikowej analizy regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolny od choroby dla pacjentów poniżej 1. r.ż. (n=19)	124
Tabela 30. Wyniki analizy wieloczynnikowej proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na przeżycie wolne od choroby w analizie jednoczynnikowej dla dzieci poniżej 1. r.ż. (n=19)	124

Tabela 31. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na całkowity czas przeżycia dla pacjentów w 4. stopniu zaawansowania (n=28)	125
Tabela 32. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na całkowity czas przeżycia w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów w 4. stopniu zaawansowania (n=31)	125
Tabela 33. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolny od choroby dla pacjentów w 4. stopniu zaawansowania (n=31)	126
Tabela 34. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas całkowitego przeżycia dla pacjentów w stopniu zaawansowania 2., 3. i 4s (n=29)	127
Tabela 35. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na całkowity czas przeżycia w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów w stopniu zaawansowania 2., 3. i 4s (n=26)	127
Tabela 36. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów w stopniu zaawansowania 2., 3. i 4s (n=29)	128
Tabela 37. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na czas przeżycia wolnego od choroby w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów w stopniu zaawansowania 2., 3. i 4s (n=29)	128
Tabela 38. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas całkowitego przeżycia dla pacjentów z amplifikacją genu MYCN (n=11)	129
Tabela 39. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów z amplifikacją genu MYCN (n=12)	129
Tabela 40. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas całkowitego przeżycia dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (n=41)	130
Tabela 41. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na całkowity czas przeżycia w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (n=41)	131
Tabela 42. Parametry wpływające na czas całkowitego przeżycia po zastosowaniu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa metodą regresji krokowej dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (n=41)	131
Tabela 43. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (n=46)	132
Tabela 44. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (n=46)	133
Tabela 45. Parametry wpływające na czas przeżycia wolnego od choroby po zastosowaniu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa metodą regresji krokowej dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (n=46)	133
Tabela 46. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas całkowitego przeżycia dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej (N=32)	133
Tabela 47. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na czas całkowitego przeżycia (zgony z NBL) w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej (n=32)	134
Tabela 48. Parametry wpływające na czas przeżycia całkowitego (zgony z NBL) po zastosowaniu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa metodą regresji krokowej dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej zgony z NBL (n=32)	135

Tabela 49. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej (n=36)	135
Tabela 50. Wyniki wieloczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa z uwzględnieniem parametrów istotnie statystycznie wpływających na czas przeżycia wolnego od choroby w analizie jednoczynnikowej dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej (n=36)	136
Tabela 51. Parametry wpływające na czas wolny od choroby po zastosowaniu wieloczynnikowej analizy proporcjonalnego hazardu Coxa metodą regresji krokowej dla pacjentów z guzem o niekorzystnej budowie histopatologicznej (n=36)	136
Tabela 52. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na całkowity czas przeżycia choroby dla pacjentów z guzem o korzystnej budowie histopatologicznej (n=15)	137
Tabela 53. Wyniki jednoczynnikowej analizy metodą proporcjonalnego hazardu Coxa w ocenie wpływu czynników na czas przeżycia wolnego od choroby dla pacjentów z guzem o korzystnej budowie histopatologicznej (n=16)	137
Tabela 54. Znane dotąd czynniki prognostyczne istotnie statystycznie wpływające na występowanie zgonów i na czas całkowitego przeżycia (zgony z powodu NBL) dla wszystkich pacjentów z NBL – materiał własny	146
Tabela 55. Znane dotąd czynniki prognostyczne istotnie statystycznie wpływające na występowanie niepowodzeń leczenia i na czas przeżycia wolnego od choroby dla wszystkich pacjentów z NBL – materiał własny	146
Tabela 56. Wpływ intensywności ekspresji białka Id2 i odsetka komórek NBL z obecną ekspresją Id2 na częstość występowania niepowodzeń leczenia i na czas przeżycia wolnego od choroby	148
Tabela 58. Występowanie zgonów z powodu NBL w zależności od wybranych czynników prognostycznych – cała grupa pacjentów (n=54)	179
Tabela 59. Występowanie niepowodzenia leczenia w zależności od wybranych czynników prognostycznych – cała grupa pacjentów (n=60)	180
Tabela 60. Występowanie zgonów z powodu NBL w zależności od wybranych czynników prognostycznych – pacjenci powyżej 1. r.ż. (n=36)	181
Tabela 61. Występowanie niepowodzenia leczenia w zależności od wybranych czynników prognostycznych – pacjenci powyżej 1 r.ż. (n=41)	181
Tabela 62. Występowanie zgonów z powodu NBL w zależności od wybranych czynników prognostycznych – pacjenci poniżej 1. r.ż. (n=18).....	182
Tabela 63. Występowanie niepowodzenia leczenia w zależności od wybranych czynników prognostycznych – pacjenci poniżej 1. r.ż. (n=19).....	182
Tabela 64. Wyniki analiz metodą regresji logistycznej dla wpływu odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 na wystąpienie zgonów z powodu NBL i niepowodzeń leczenia....	183

11. Spis rysunków

Rysunek 1. Model sekwencji zaburzeń genetycznych prowadzących do rozwoju różnych postaci NBL [3,18]	16
Rysunek 2. Potencjalny udział białka Id2 w onkogenezie [42]	33
Rysunek 3. Potencjalna zależność pomiędzy białkami Myc, Id2 i Rb w regulacji cyklu komórkowego [42]	35
Rysunek 4. Odsetek komórek z obecną ekspresją białka Id2 w całej grupie pacjentów	50
Rysunek 5. Występowanie zgonów (niezależnie od przyczyny) u pacjentów z NBL w dwóch grupach wiekowych (poniżej i powyżej 1. r.ż.)	53
Rysunek 6. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z powodu NBL) u dzieci NBL w zależności od wieku pacjentów (poniżej i powyżej 1. r.ż.)	54
Rysunek 7. Krzywe przeżycia wolnego od choroby u dzieci z NBL w zależności od wieku pacjentów (poniżej i powyżej 1. r.ż.)	56
Rysunek 8. Krzywe przeżycia całkowitego w NBL dla wszystkich pacjentów w 3. i 4. stopniu zaawansowania	58
Rysunek 9. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z powodu NBL) dla wszystkich pacjentów w zależności od stopnia zaawansowania choroby (stopień 4. vs pozostałe)	59
Rysunek 10. Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla wszystkich dzieci w zależności od stopnia zaawansowania	61
Rysunek 11. Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla wszystkich dzieci NBL w zależności od stopnia zaawansowania (stopień 4. vs pozostałe)	61
Rysunek 12. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z powodu NBL) dla wszystkich dzieci z NBL w zależności od obecności amplifikacji genu MYCN	63
Rysunek 13. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z powodu NBL) dla dzieci z NBL powyżej 1. r.ż. w zależności od obecności amplifikacji genu MYCN	63
Rysunek 14. Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla wszystkich dzieci z NBL w zależności od obecności amplifikacji MYCN	65
Rysunek 15. Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla dzieci z NBL powyżej 1. r.ż. w zależności od obecności amplifikacji MYCN	65
Rysunek 16. Krzywe przeżycia całkowitego dla 31 dzieci z (zgony z powodu NBL) w zależności od obecności delecji 1p36	67
Rysunek 17. Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla 31 dzieci z NBL w zależności od obecności delecji 1p36	69
Rysunek 18. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z powodu NBL) dla 19 dzieci z NBL w zależności od obecności nadmiaru 17q	71
Rysunek 19. Krzywe przeżycia wolnego od choroby dla 22 dzieci z NBL w zależności od obecności nadmiaru 17q	73
Rysunek 20. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z powodu NBL) dla wszystkich dzieci z NBL w zależności od budowy histologicznej guza (FU - budowa guza korzystna, UH - budowa guza niekorzystna)	75
Rysunek 21. Krzywe przeżycia wolnego od choroby w zależności budowy histologicznej guza	77
Rysunek 22. Krzywe przeżycia całkowitego dla pacjentów z NBL w 4. stopniu zaawansowania powyżej 1 r.ż. w zależności od sposobu leczenia	81
Rysunek 23. Krzywe przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń dla pacjentów z NBL w 4. stopniu zaawansowania powyżej 1. r.ż. w zależności od sposobu leczenia	81
Rysunek 24. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia dla pacjentów z NBL w 4. stopniu zaawansowania powyżej 1. r.ż. w zależności od sposobu leczenia	82
Rysunek 25. Krzywe przeżycia całkowitego dla całej grupy pacjentów (zgony z NBL) w zależności od wyjściowego stężenia LDH poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku	85
Rysunek 26. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia dla całej grupy dzieci w zależności od stężenia LDH poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku	86
Rysunek 27. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia w zależności od stężenia NSE poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku	88
Rysunek 28. Krzywe przeżycia całkowitego dla wszystkich dzieci z NBL w zależności od stężenia ferrytyny poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku	90

Rysunek 29. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia dla wszystkich dzieci z NBL w zależności od wyjściowego stężenia ferrytyny poniżej i powyżej 3-krotnej wartości normy dla wieku	91
Rysunek 30. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 u dzieci powyżej 1. r.ż	94
Rysunek 31. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 u dzieci poniżej 1. r.ż.....	96
Rysunek 32. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 u dzieci z obecną amplifikacją genu MYCN.....	98
Rysunek 33. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 u dzieci bez amplifikacji genu MYCN.....	99
Rysunek 34. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 u dzieci w 4. stopniu zaawansowania choroby.....	101
Rysunek 35. Porównanie częstości występowania silnej ekspresji białka Id2 u pacjentów w 4. i innym niż 4. stopniu zaawansowania.	102
Rysunek 36. Odsetek komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 u dzieci w 2.,3. i 4s stopniu zaawansowania.....	103
Rysunek 37. Korelacja stężenia enolazy neurospecyficznej w momencie diagnozy i odsetka komórek z ekspresją Id2 dla całej grupy	107
Rysunek 38. Korelacja stężenia enolazy neurospecyficznej w momencie diagnozy i odsetka komórek z ekspresją Id2 dla pacjentów powyżej 1 r.ż	107
Rysunek 39. Średnia odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2, a występowanie zgonów z NBL	109
Rysunek 40. Średnia odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2, a niepowodzenia leczenia (cała grupa, n=60).....	110
Rysunek 41. Średnia przeżycia całkowitego (zgony z NBL), a intensywność ekspresji białka Id2 (cała grupa pacjentów, n=54)	112
Rysunek 42. Średnia przeżycia całkowitego (zgony z NBL), a intensywność ekspresji białka Id2 dla pacjentów bez amplifikacji MYCN (n=41)	112
Rysunek 43. Średnia czasu do wystąpienia wznowy lub progresji choroby w zależności od poziomu ekspresji białka Id2 (cała grupa, n=60).....	114
Rysunek 44. Średnia czasu do wystąpienia wznowy lub progresji choroby w zależności od poziomu ekspresji białka Id2 dla pacjentów bez amplifikacji MYCN (n=46)	114
Rysunek 45. Średni odsetek komórek z obecną ekspresją białka Id2 w zależności od obecności amplifikacji genu MYCN.....	116
Rysunek 46. Budowa histopatologiczna – nowotwór o typie neuroblastoma	170
Rysunek 47. Budowa histopatologiczna – nowotwór o typie guzkowym (ganglioneuroblastoma nodulare); widoczny obszar o niższym zróżnicowaniu (budowa neuroblastoma, góra zdjęcia) i bardziej zróżnicowany obszar z przewagą komórek Schwanna	170
Rysunek 48. Budowa histopatologiczna – ganglioneuroblastoma intermixed	171
Rysunek 49. FISH. Amplifikacja onkogenu MYCN. Widoczne liczne jądra komórkowe (niebieskie) z licznymi sygnałami MYCN (zielone) i pojedynczymi sygnałami referencyjnymi (czerwone).	172
Rysunek 50. FISH. Prawidłowy status chromosomu 2. Widoczne liczne jądra komórkowe (niebieskie) z podwójnym sygnałem MYCN (zielony) i referencji (czerwony).....	173
Rysunek 51. FISH. Widoczne pojedyncze jądro komórkowe (niebieskie) z licznymi sygnałami MYCN (zielone). Na zdjęciu brak sygnału dla referencji.	173
Rysunek 52. FISH. Widoczne liczne jądra komórkowe (niebieskie), w większości z trzema sygnałami z MYCN (zielone) i referencji (czerwone).	174
Rysunek 53. Ocena ekspresji białka Id2 – komórki Sertoliego, prawidłowa gonada męska. Kontrola negatywna. Powiększenie 40x.....	175
Rysunek 54. Ocena ekspresji białka Id2 – komórki Sertoliego, prawidłowa gonada męska. Kontrola pozytywna. Powiększenie 40x	176
Rysunek 55. Ekspresja białka Id2 w komórkach neuroblastoma. Widoczne liczne komórki o jednorodnej ekspresji białka. Powiększenie 40x.....	176
Rysunek 56. Ekspresja białka Id2. W większości komórek widoczna jednorodna, silna ekspresja białka Id2. Powiększenie 10x.	177
Rysunek 57. Ekspresja białka Id2. Ekspresja w większości komórek, niejednorodna, Powiększenie 10x.	177
Rysunek 58. Ekspresja białka Id2. Widoczne pojedyncze komórki z silną ekspresją , w większości komórek ekspresja znacznie słabsza, widoczne komórki bez ekspresji Id2 . Powiększenie 40x.	178

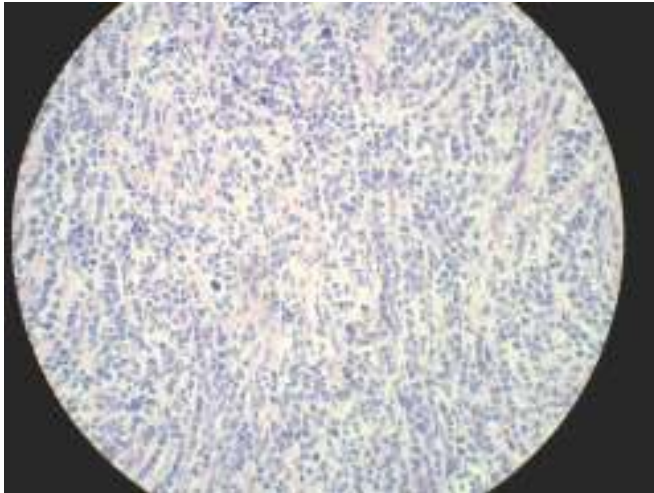
Rysunek 59. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla całej grupy pacjentów (p=NS)	184
Rysunek 60. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla całej grupy pacjentów (p=0,07)	184
Rysunek 61. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów powyżej 1. r.ż. (p=NS)	185
Rysunek 62. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów powyżej 1. r.ż. (p=NS)	185
Rysunek 63. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów poniżej 1. r.ż. (p=NS)	186
Rysunek 64. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów poniżej 1. r.ż. (p=NS)	186
Rysunek 65. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (p=NS)	187
Rysunek 66. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN (p=0,05)	187
Rysunek 67. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów z amplifikacją genu MYCN (p=NS)	188
Rysunek 68. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów z amplifikacją genu MYCN (p=NS)	188
Rysunek 69. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów w 2., 3. i 4s stopniu zaawansowania (p=NS)	189
Rysunek 70. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów w 2., 3. i 4s stopniu zaawansowania (p=NS)	189
Rysunek 71. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów w 4. stopniu zaawansowania (p=NS)	190
Rysunek 72. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów w 4. stopniu zaawansowania (p=NS)	190
Rysunek 73. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od wieku pacjenta	191
Rysunek 74. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od wieku pacjenta	191
Rysunek 75. Krzywe przeżycia całkowitego (zgonu z NBL) w zależności od intensywności ekspresji białka Id2	192
Rysunek 76. Krzywe przeżycia wolnego od choroby w zależności od intensywności ekspresji białka Id2	193
Rysunek 77. Krzywe przeżycia całkowitego w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów powyżej 1. r.ż.	193
Rysunek 78. Krzywe przeżycia wolnego od choroby w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów powyżej 1. r.ż.	194
Rysunek 79. Krzywe przeżycia całkowitego w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów poniżej 1. r.ż.	194
Rysunek 80. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów poniżej 1. r.ż.	195
Rysunek 81. Krzywe przeżycia całkowitego w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów bez amplifikacji MYCN	195

Rysunek 82. Krzywe przeżycia wolnego od choroby w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów bez amplifikacji MYCN	196
Rysunek 83. Krzywe przeżycia całkowitego w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 u pacjentów w 2., 3. i 4s stopniu zaawansowania klinicznego	196
Rysunek 84. Krzywe przeżycia wolnego od choroby w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów w 2., 3. i 4s stopniu zaawansowania	197
Rysunek 85. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z NBL) w zależności od stopnia zaawansowania dla pacjentów powyżej 1. r.ż.	198
Rysunek 86. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia w zależności od stopnia zaawansowania dla pacjentów powyżej 1. r.ż.	198
Rysunek 87. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z NBL) w zależności od obecności delecji 1p dla pacjentów powyżej 1. r.ż.	199
Rysunek 88. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia w zależności od obecności delecji 1p dla pacjentów powyżej 1. r.ż.	199
Rysunek 89. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z NBL) w zależności od budowy histopatologicznej dla pacjentów powyżej 1. r.ż.	200
Rysunek 90. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia w zależności od budowy histopatologicznej dla pacjentów powyżej 1. r.ż.	200
Rysunek 91. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia w zależności od budowy histopatologicznej dla pacjentów poniżej 1. r.ż.	201
Rysunek 92. Korelacja czasu przeżycia całkowitego z odsetkiem komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 w całej grupie pacjentów	202
Rysunek 93. Korelacja czasu przeżycia wolnego od choroby i odsetka komórek z ekspresją białka Id2 dla całej grupy	203
Rysunek 94. Korelacja poziomu dehydrogenazy mleczanowej w momencie diagnozy i odsetka komórek z ekspresją Id2 dla całej grupy.....	203
Rysunek 95. Korelacja stężenia ferrytyny w momencie diagnozy i odsetka komórek z ekspresją Id2 dla całej badanej grupy	204

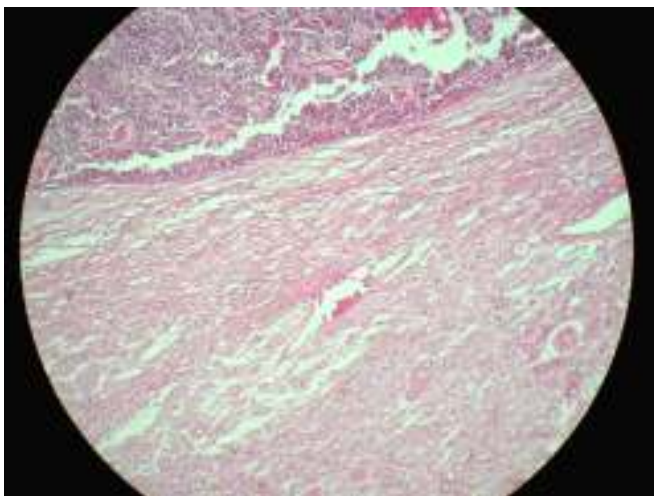
12. Fotografie

12.1. Budowa histopatologiczna

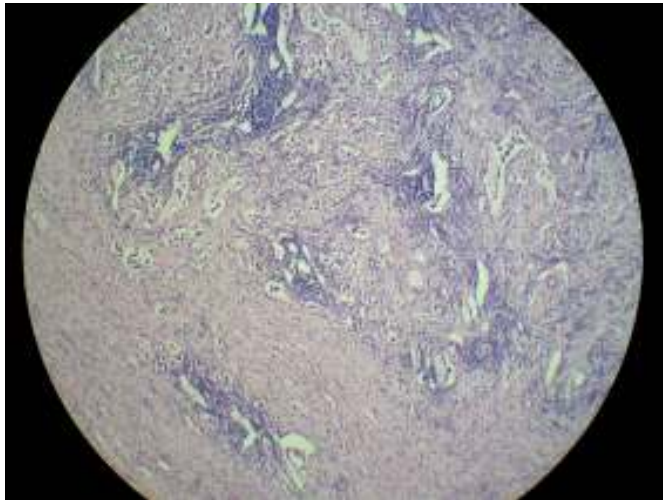
Rysunek 46. Budowa histopatologiczna – nowotwór o typie neuroblastoma



Rysunek 47. Budowa histopatologiczna – nowotwór o typie guzkowym (ganglioneuroblastoma nodulare); widoczny obszar o niższym zróżnicowaniu (budowa neuroblastoma, góra zdjęcia) i bardziej zróżnicowany obszar z przewagą komórek Schwanna



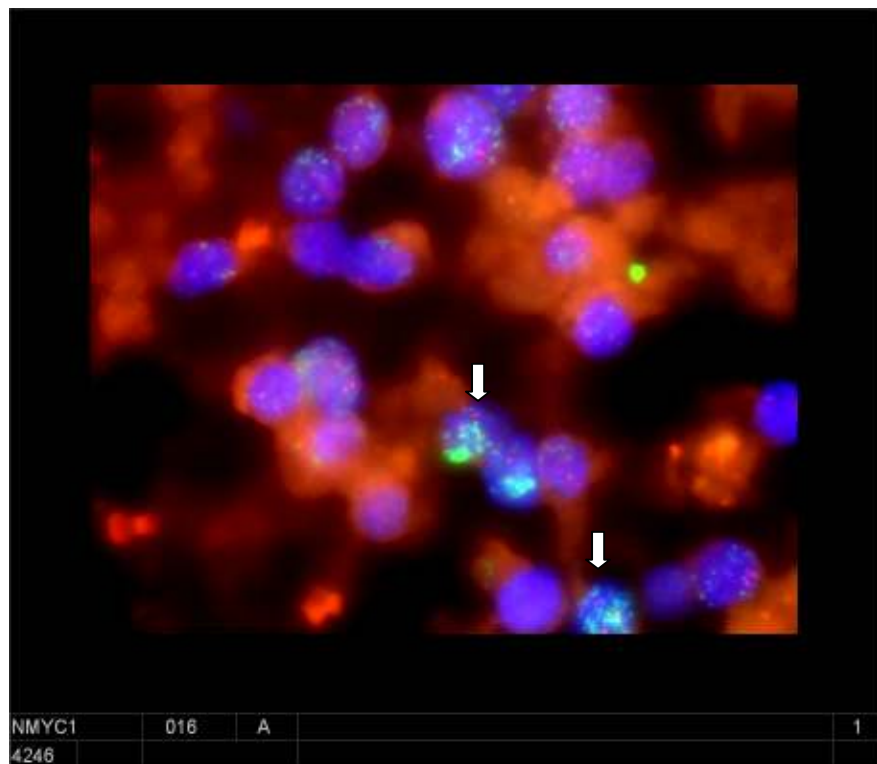
Rysunek 48. Budowa histopatologiczna – ganglioneuroblastoma intermixed



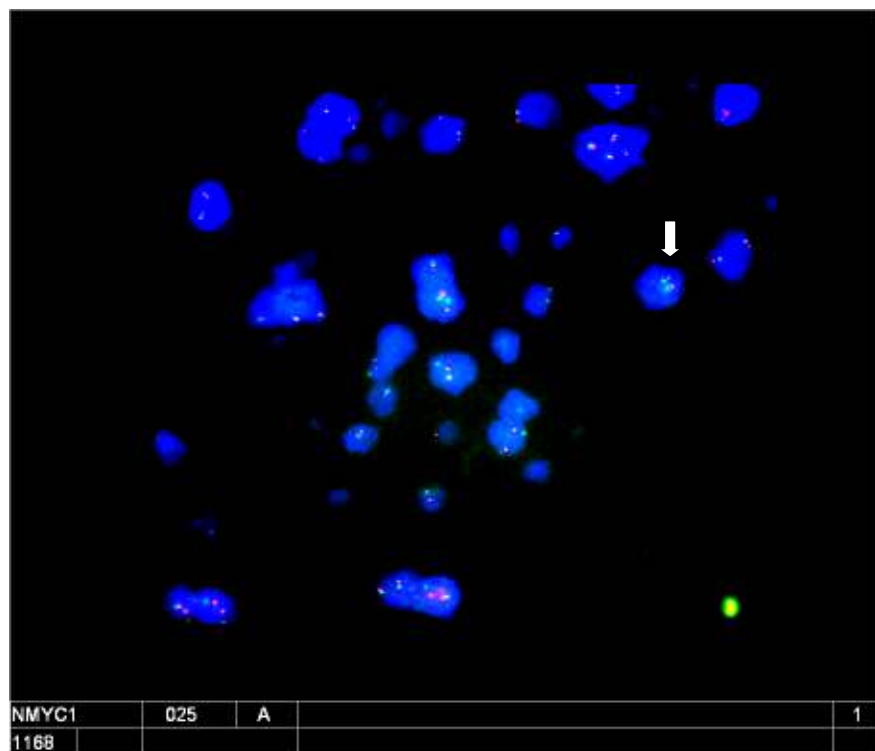
Fotografie obrazów histopatologicznych (materiał własny Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii UJ, Collegium Medicum) pozyskano w czasie weryfikacji wyników, dzięki uprzejmości Pana doktora Przemysława Kluge, Centrum Zdrowia Dziecka, Warszawa

12.2. Ocena amplifikacji onkogenu MYCN metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ

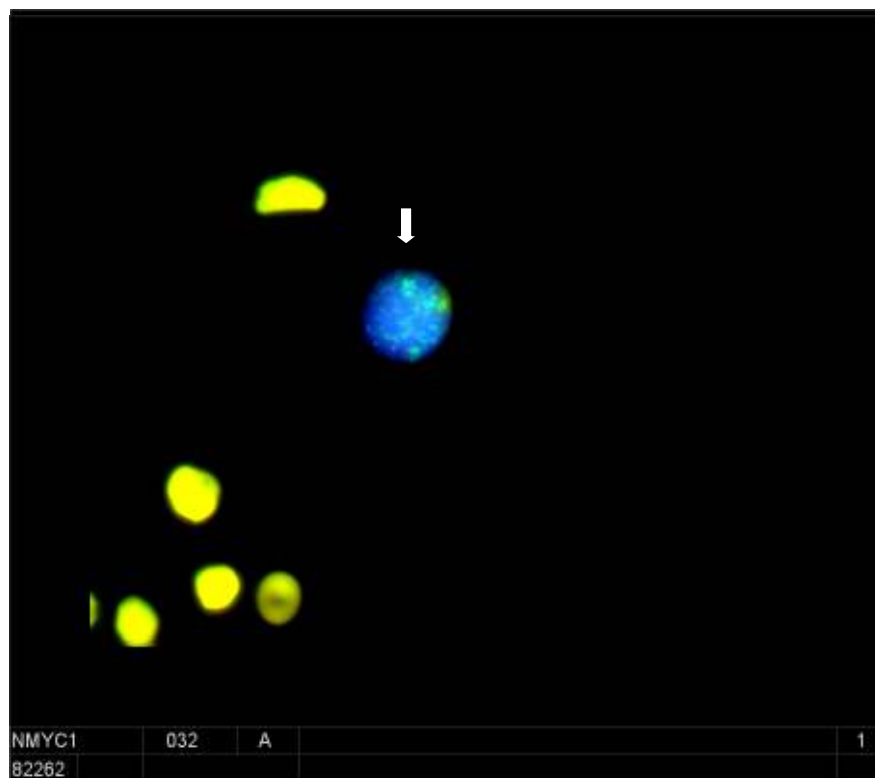
Rysunek 49. FISH. Amplifikacja onkogenu MYCN. Widoczne liczne jądra komórkowe (niebieskie) z licznymi sygnałami MYCN (zielone) i pojedynczymi sygnałami referencyjnymi (czerwone). Materiał własny Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii UJ, Collegium Medicum



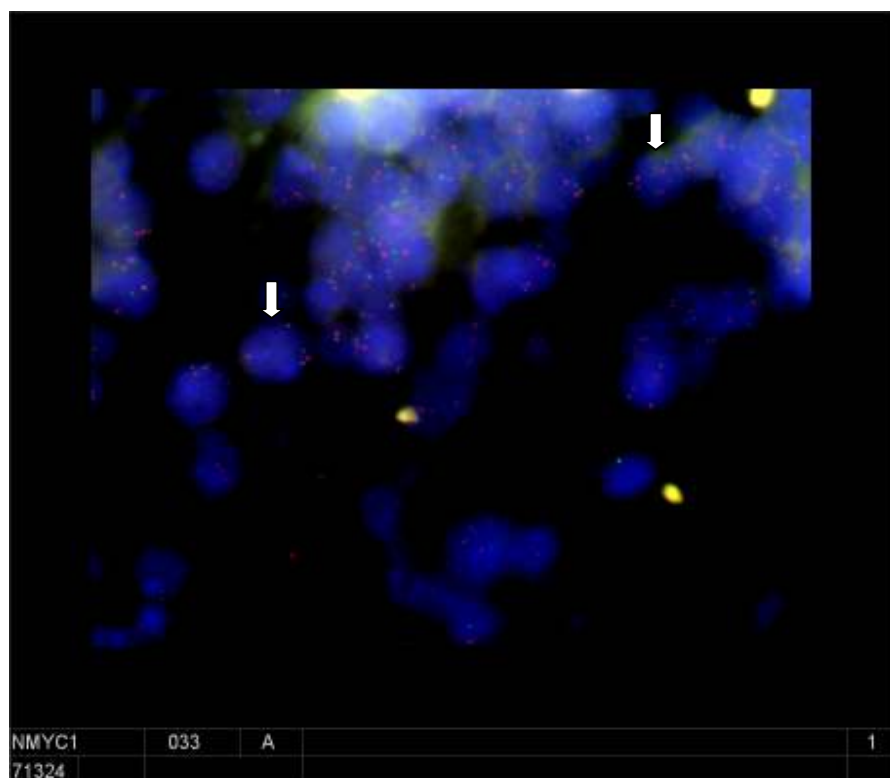
Rysunek 50. FISH. Prawidłowy status chromosomu 2. Widoczne liczne jądra komórkowe (niebieskie) z podwójnym sygnałem MYCN (zielony) i referencji (czerwony). Materiał własny Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii UJ, Collegium Medicum



Rysunek 51. FISH. Widoczne pojedyncze jądro komórkowe (niebieskie) z licznymi sygnałami MYCN (zielone). Na zdjęciu brak sygnału dla referencji. Materiał własny Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii UJ, Collegium Medicum

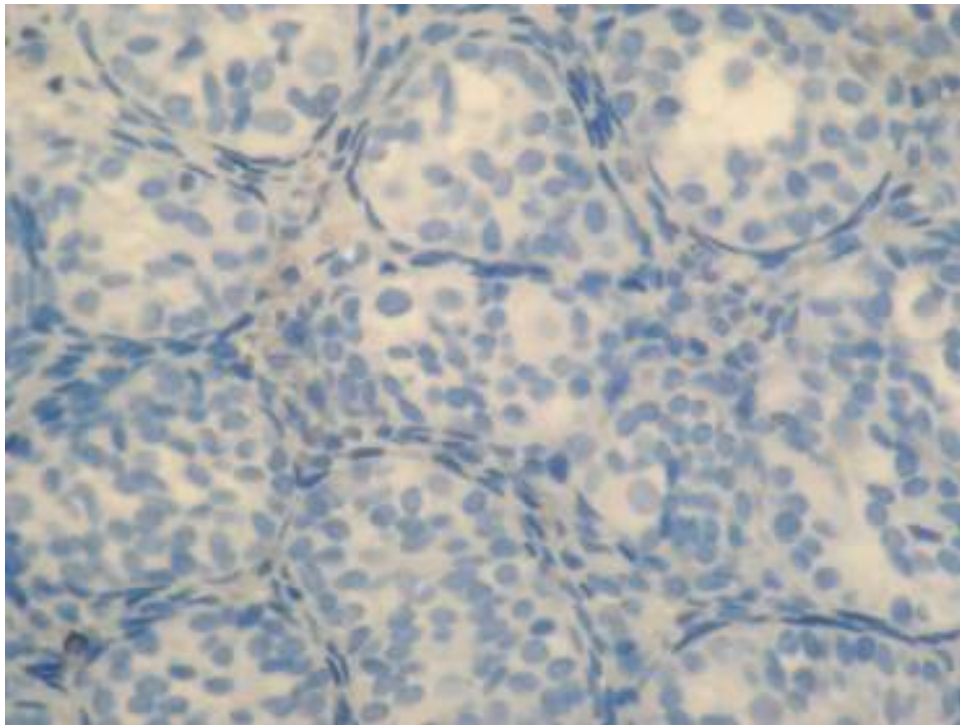


Rysunek 52. FISH. Widoczne liczne jądra komórkowe (niebieskie), w większości z trzema sygnałami z MYCN (zielone) i referencji (czerwone). Materiał własny Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii UJ, Collegium Medicum

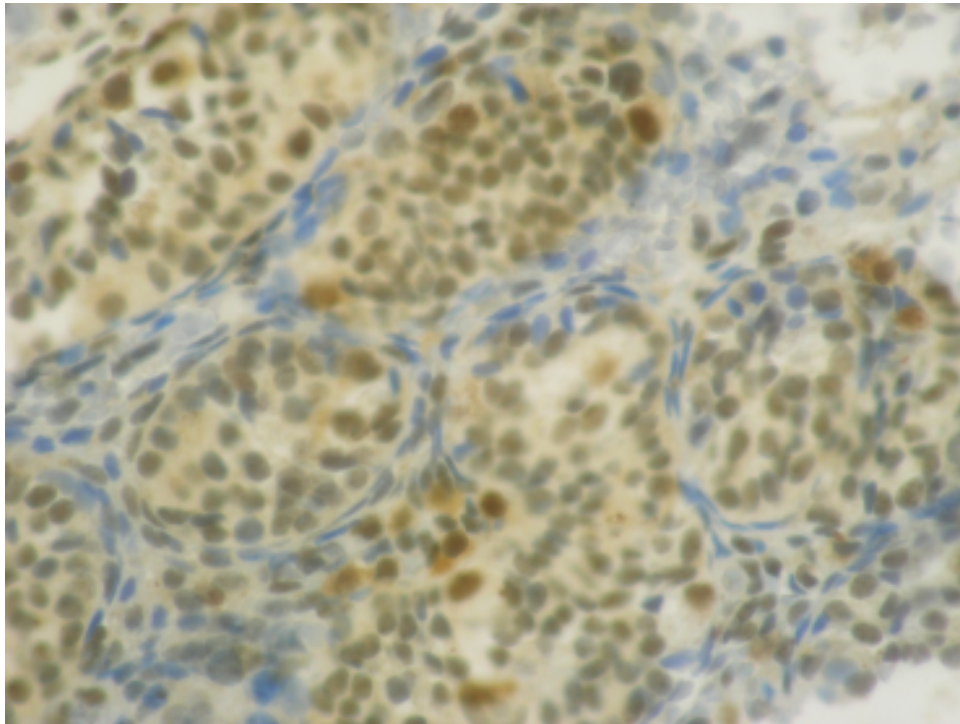


12.3. Ocena immunohistochemiczna w kierunku obecności ekspresji białka Id2

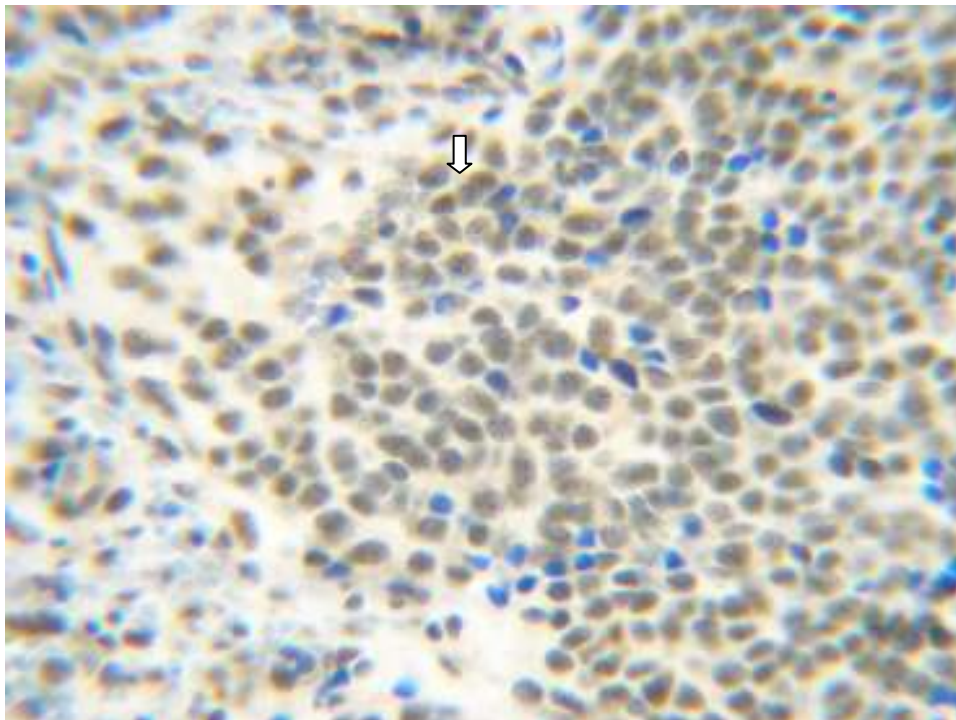
Rysunek 53. Ocena ekspresji białka Id2 – komórki Sertoliego, prawidłowa gonada męska. Kontrola negatywna. Powiększenie 40x. Materiał własny Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii UJ, Collegium Medicum



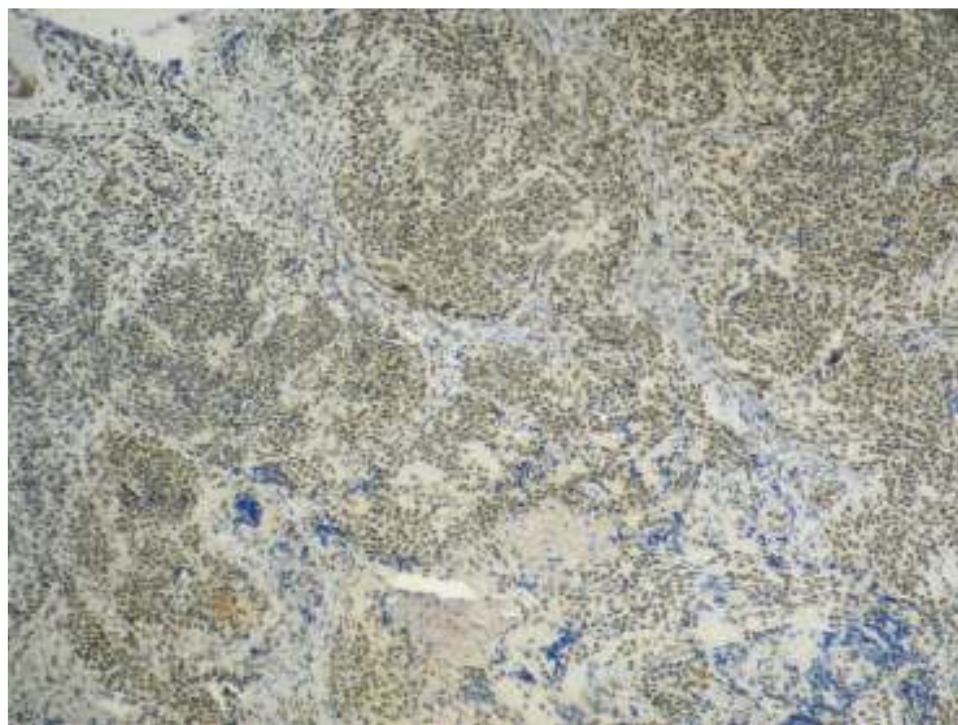
Rysunek 54. Ocena ekspresji białka Id2 – komórki Sertoliego, prawidłowa gonada męska. Kontrola pozytywna. Powiększenie 40x. Materiał własny Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii UJ, Collegium Medicum



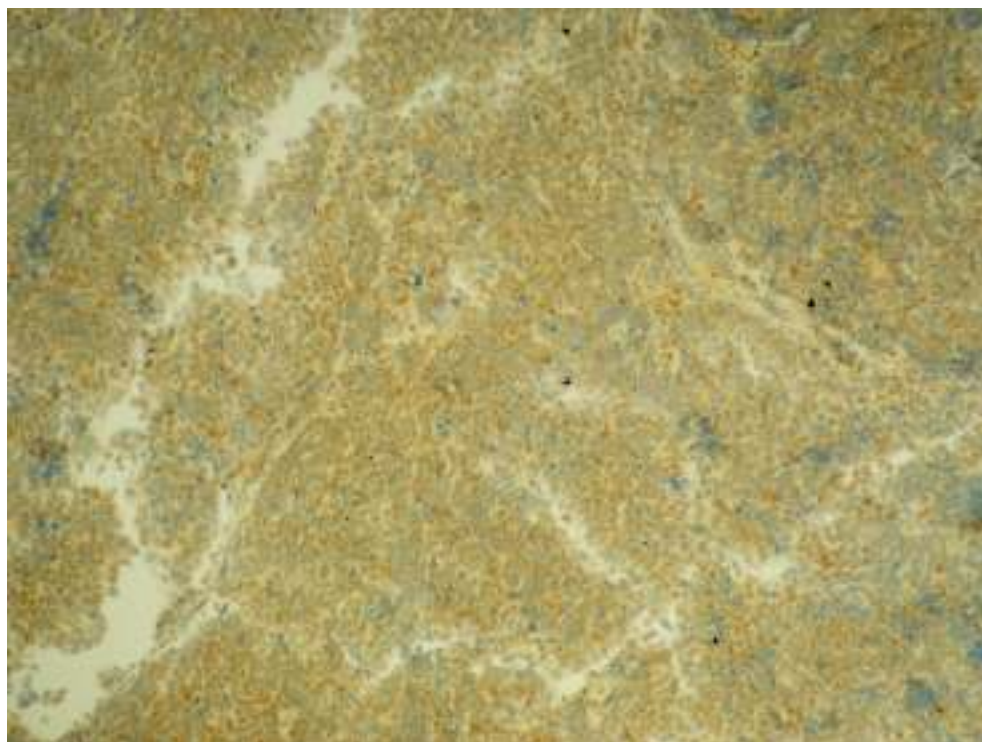
Rysunek 55. Ekspresja białka Id2 w komórkach neuroblastoma. Widoczne liczne komórki o jednorodnej ekspresji białka. Powiększenie 40x. Materiał własny Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii UJ, Collegium Medicum



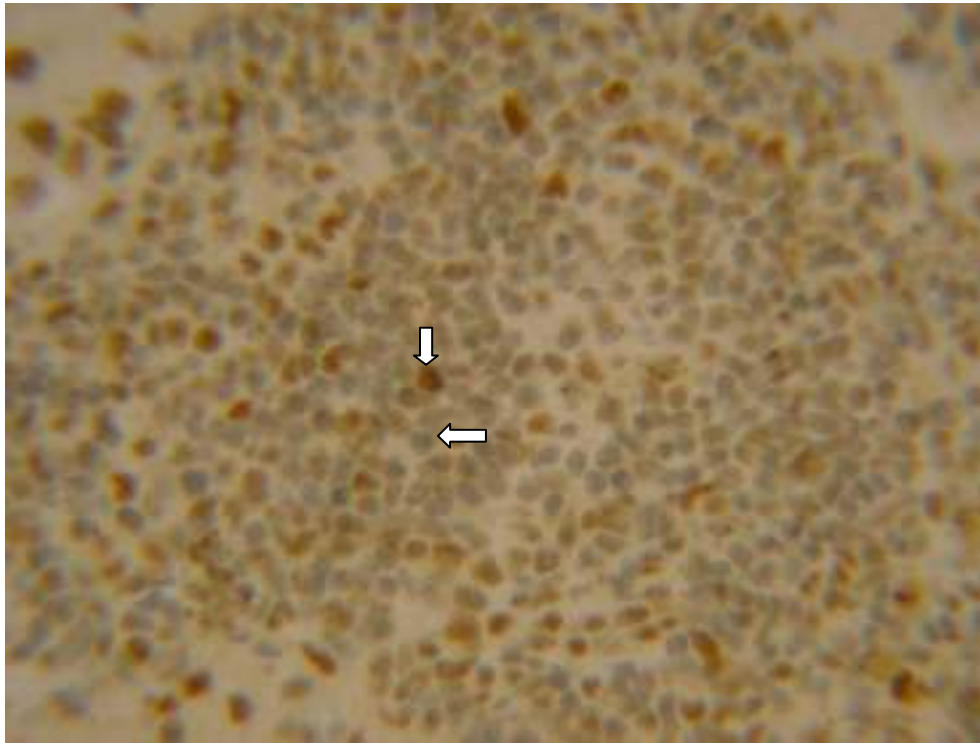
Rysunek 56. Ekspresja białka Id2. W większości komórek widoczna jednorodna, silna ekspresja białka Id2. Powiększenie 10x. Materiał własny Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii UJ, Collegium Medicum



Rysunek 57. Ekspresja białka Id2. Ekspresja w większości komórek, niejednorodna, Powiększenie 10x. Materiał własny Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii UJ, Collegium Medicum



Rysunek 58. Ekspresja białka Id2. Widoczne pojedyncze komórki z silną ekspresją w większości komórek ekspresja znacznie słabsza, widoczne komórki bez ekspresji Id2. Powiększenie 40x. Materiał własny Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii UJ, Collegium Medicum



13. Aneks 1. Wyniki analiz statystycznych

Wyniki testu χ^2 (dla liczebności >5) lub χ^2 z poprawką Fishera (dla liczebności <5)

Tabela 57. Występowanie zgonów z powodu NBL w zależności od wybranych czynników prognostycznych – cała grupa pacjentów (n=54)

Badana cecha		Liczba dzieci		Wartość p
		żyjących	zmarłych	
Wiek	Poniżej 1. r.ż.	15	3	0,01
	Powyżej 1. r.ż.	16	20	
Stopień zaawansowania	2., 3. i 4s	22	4	0,00001
	4.	9	19	
Amplifikacja genu MYCN	Nieobecna	27	14	0,03
	Obecna	3	8	
Delecja 1p	Nieobecna	15	3	0,07
	Obecna	6	6	
Nadmiar 17q	Nieobecny	5	1	0,15
	Obecny	6	7	
Budowa histopatologiczna	Korzystna	12	3	0,1
	Niekorzystna	18	14	
Stężenie LDH	Poniżej 3x norma	18	10	0,18
	Powyżej 3x norma	12	12	
Stężenie NSE	Poniżej 3x norma	3	0	0,21
	Powyżej 3x norma	4	4	
Stężenie ferrytyny	Poniżej 3x norma	6	4	0,32
	Powyżej 3x norma	13	15	

Tabela 58. Występowanie niepowodzenia leczenia w zależności od wybranych czynników prognostycznych – cała grupa pacjentów (n=60)

Badana cecha		Liczba dzieci		Wartość p
		Bez niepowodzenia	Z niepowodzeniem	
Wiek	Poniżej 1. r.ż.	15	4	0,001
	Powyżej 1. r.ż.	14	27	
Stopień zaawansowania	2., 3. i 4s	22	7	0,00004
	4.	7	24	
Amplifikacja genu MYCN	Nieobecna	23	23	0,2
	Obecna	4	8	
Delecja 1p	Nieobecna	10	7	0,3
	Obecna	6	8	
Nadmiar 17q	Nieobecny	5	2	0,11
	Obecny	5	10	
Budowa histopatologiczna	Korzystna	10	6	0,3
	Niekorzystna	17	19	
Stężenie LDH	Poniżej 3x norma	18	12	0,058
	Powyżej 3x norma	19	17	
Stężenie NSE	Poniżej 3x norma	2	1	0,15
	Powyżej 3x norma	1	7	
Stężenie ferrytyny	Poniżej 3x norma	7	5	0,14
	Powyżej 3x norma	10	20	

Tabela 59. Występowanie zgonów z powodu NBL w zależności od wybranych czynników prognostycznych – pacjenci powyżej 1. r.ż. (n=36)

Badana cecha		Liczba dzieci		Wartość p
		żyjących	zmarłych	
Stopień zaawansowania	2., 3. i 4s	7	3	0,03
	4.	4	17	
Amplifikacja genu MYCN	Nieobecna	12	12	0,54
	Obecna	3	7	
Delecja 1p	Nieobecna	7	3	0,18
	Obecna	4	6	
Nadmiar 17q	Nieobecny	2	1	----
	Obecny	6	6	
Budowa histopatologiczna	Korzystna	5	2	0,22
	Niekorzystna	11	13	

Tabela 60. Występowanie niepowodzenia leczenia w zależności od wybranych czynników prognostycznych – pacjenci powyżej 1 r.ż. (n=41)

Badana cecha		Liczba dzieci		Wartość p
		Bez niepowodzenia	Z niepowodzeniem	
Stopień zaawansowania	2., 3. i 4s	8	5	0,04
	4.	7	21	
Amplifikacja genu MYCN	Nieobecna	10	18	0,25
	Obecna	4	7	
Delecja 1p	Nieobecna	6	6	0,26
	Obecna	4	7	
Nadmiar 17q	Nieobecny	2	2	0,62
	Obecny	3	11	
Budowa histopatologiczna	Korzystna	4	4	0,25
	Niekorzystna	11	16	

Tabela 61. Występowanie zgonów z powodu NBL w zależności od wybranych czynników prognostycznych – pacjenci poniżej 1. r.ż. (n=18)

Badana cecha		Liczba dzieci		Wartość p
		żyjących	zmarłych	
Stopień zaawansowania	2., 3. i 4s	15	0	0,06
	4.	1	2	
Amplifikacja genu MYCN	Nieobecna	15	2	----
	Obecna	0	1	
Delecja 1p	Nieobecna	5	0	----
	Obecna	2	1	
Nadmiar 17q	Nieobecny	3	0	----
	Obecny	0	1	
Budowa histopatologiczna	Korzystna	7	1	----
	Niekorzystna	7	1	

Tabela 62. Występowanie niepowodzenia leczenia w zależności od wybranych czynników prognostycznych – pacjenci poniżej 1. r.ż. (n=19)

Badana cecha		Liczba dzieci		Wartość p
		Bez niepowodzenia	Z niepowodzeniem	
Stopień zaawansowania	2., 3. i 4s	14	2	0,097
	4.	1	2	
Amplifikacja genu MYCN	Nieobecna	15	3	----
	Obecna	0	1	
Delecja 1p	Nieobecna	3	2	----
	Obecna	2	1	
Nadmiar 17q	Nieobecny	2	1	----
	Obecny	0	1	
Budowa histopatologiczna	Korzystna	6	2	0,45
	Niekorzystna	7	2	

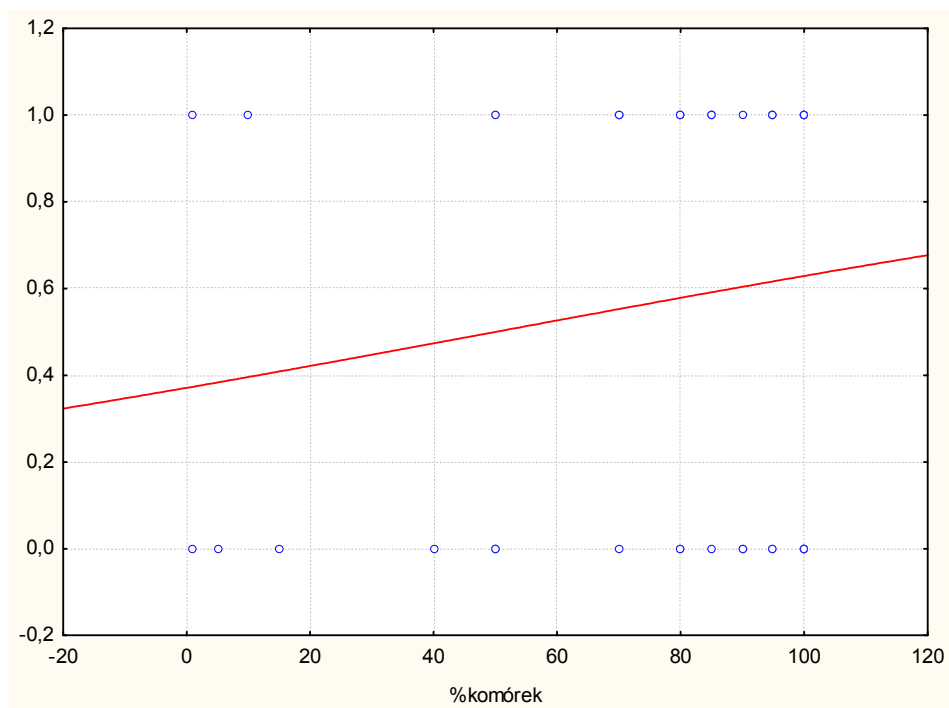
Regresja logistyczna

Tabela 63. Wyniki analiz metodą regresji logistycznej dla wpływu odsetka komórek z obecną ekspresją białka Id2 na wystąpienie zgonów z powodu NBL i niepowodzeń leczenia

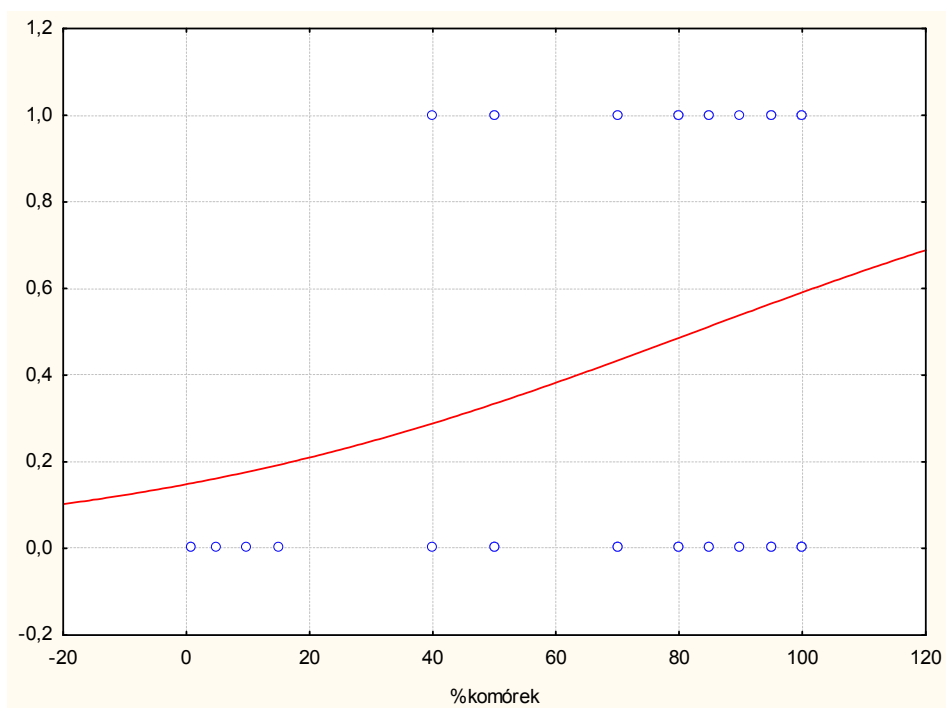
Badany parametr	Beta	SE (beta)	Chi ²	p
Cała grupa pacjentów				
Zgon z NBL	0,01	0,009	1,13	0,29
Niepowodzenia leczenia	0,02	0,01	3,25	0,07
Pacjenci powyżej 1. r.ż.				
Zgony z NBL	0,05	0,01	0,24	0,62
Niepowodzenia leczenia	0,02	0,01	1,9	0,17
Pacjenci poniżej 1. r.ż.				
Zgony z NBL	-0,01	0,05	0,06	0,81
Niepowodzenia leczenia	-0,007	0,04	0,03	0,86
Pacjenci bez amplifikacji genu MYCN				
Zgony z NBL	0,01	0,01	1,34	0,2
Niepowodzenia leczenia	0,03	0,01	3,8	0,05
Pacjenci z amplifikacją genu MYCN				
Zgony z NBL	0,008	0,03	0,1	0,75
Niepowodzenia leczenia	0,01	0,02	0,43	0,51
Pacjenci w 2., 3. i 4s stopniu zaawansowania				
Zgony z NBL	0,002	0,02	0,009	0,92
Niepowodzenia leczenia	0,03	0,02	2,42	0,12
Pacjenci w 4. stopniu zaawansowania				
Zgony z NBL	0,01	0,02	0,0008	0,95
Niepowodzenia leczenia	0,01	0,01	0,43	0,51

Krzywe regresji logistycznej

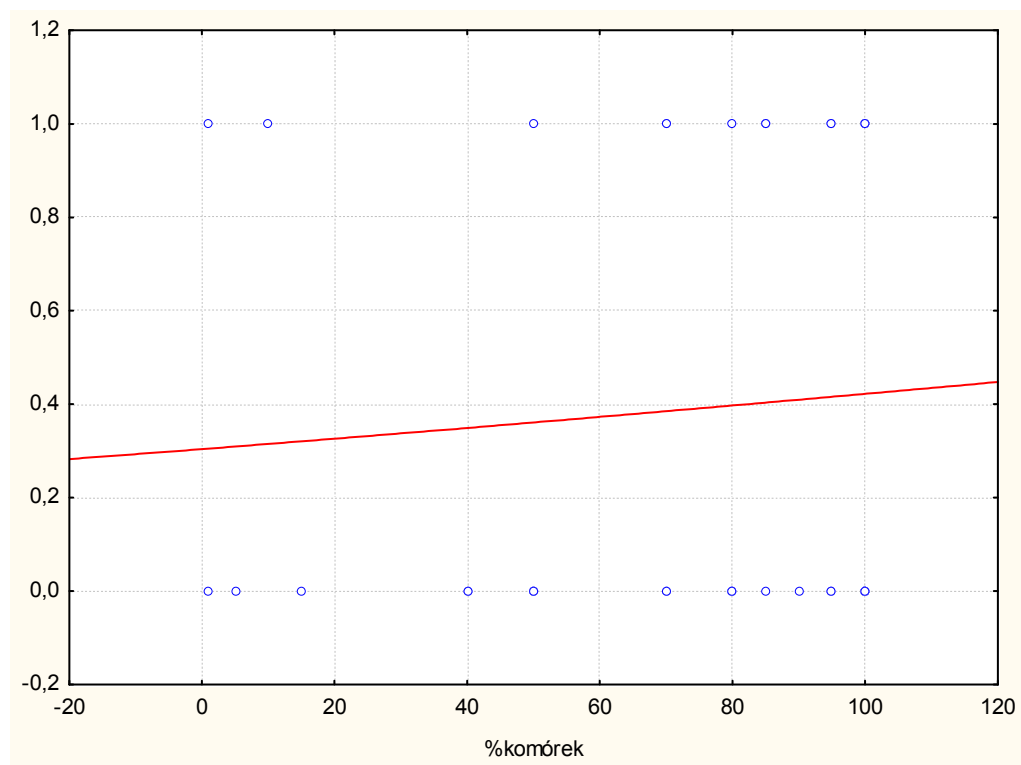
Rysunek 59. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla całej grupy pacjentów ($p=NS$)



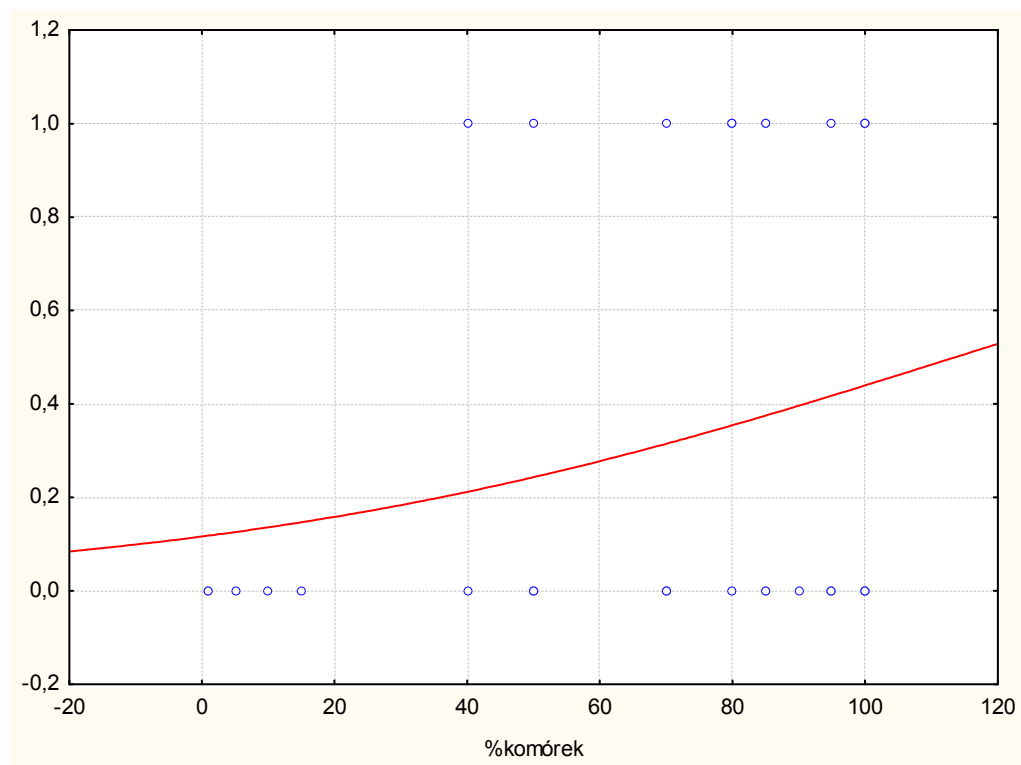
Rysunek 60. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla całej grupy pacjentów ($p=0,07$)



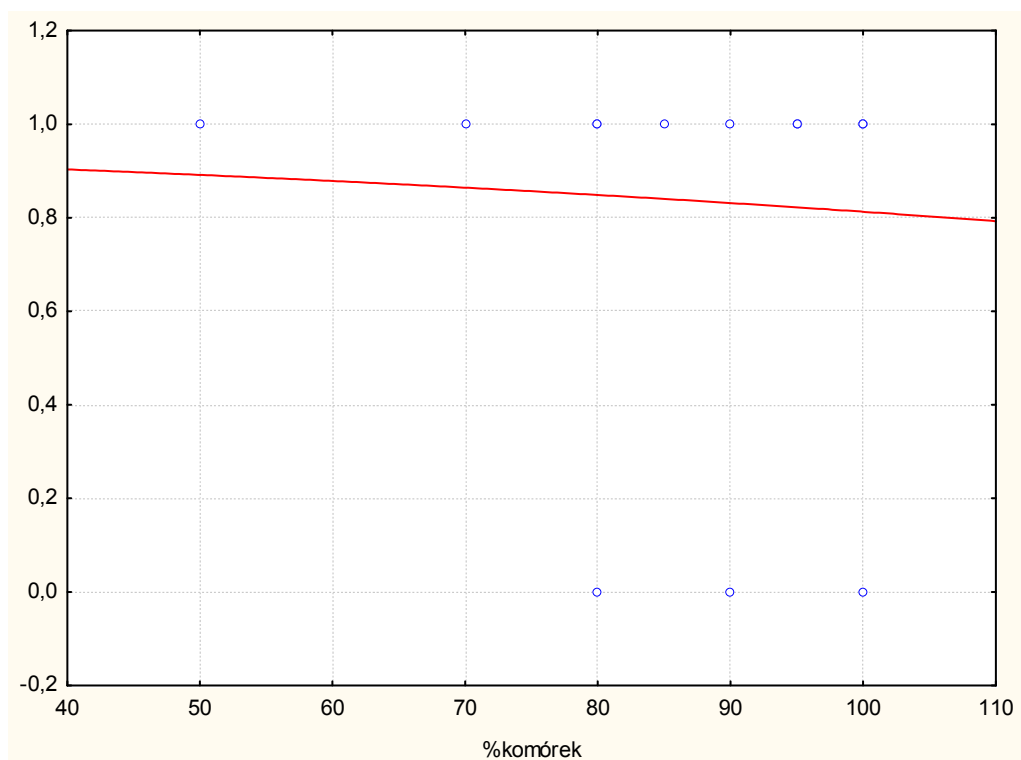
Rysunek 61. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów powyżej 1. r.ż. (p=NS)



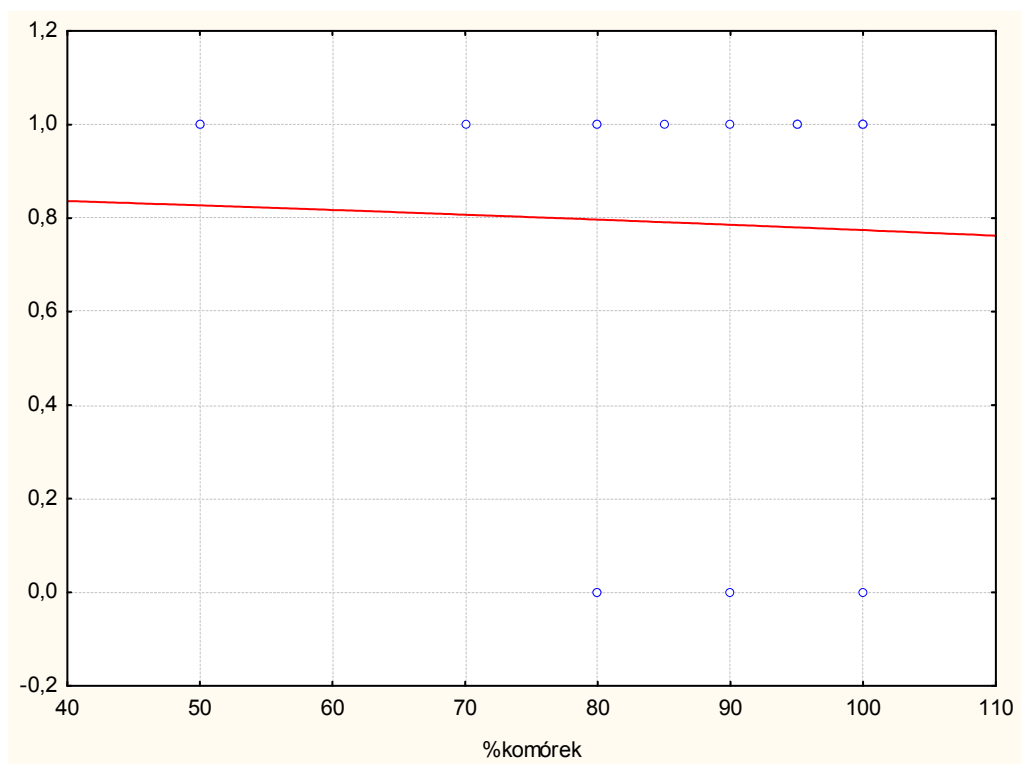
Rysunek 62. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów powyżej 1. r.ż. (p=NS)



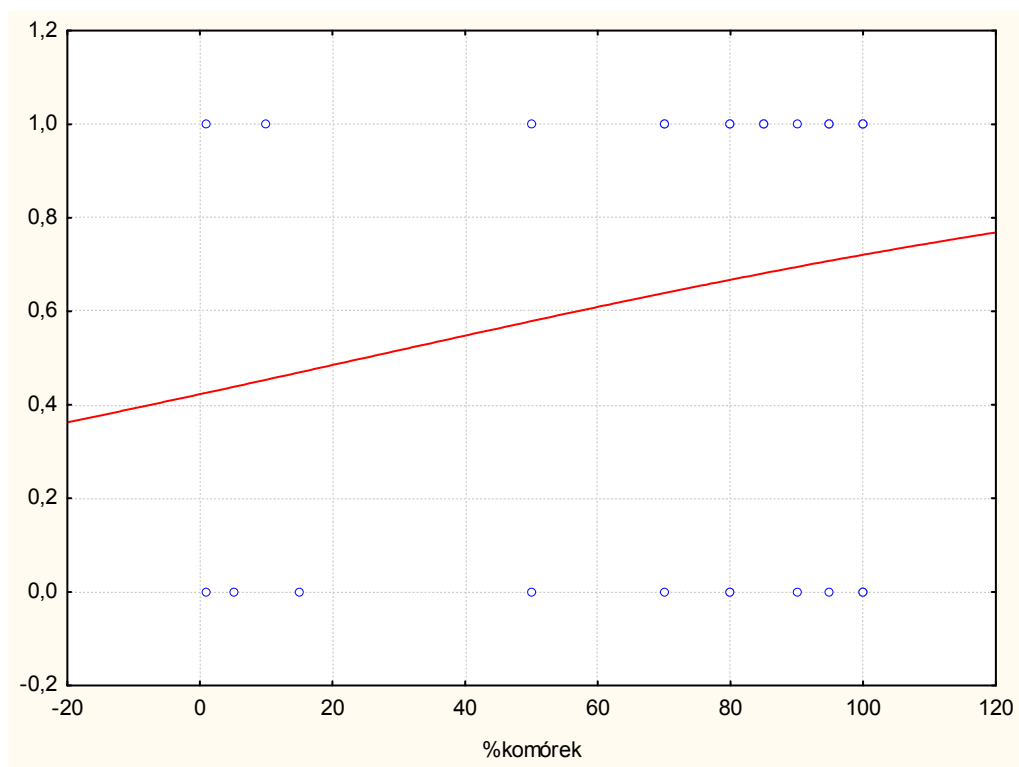
Rysunek 63. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów poniżej 1. r.ż. (p=NS)



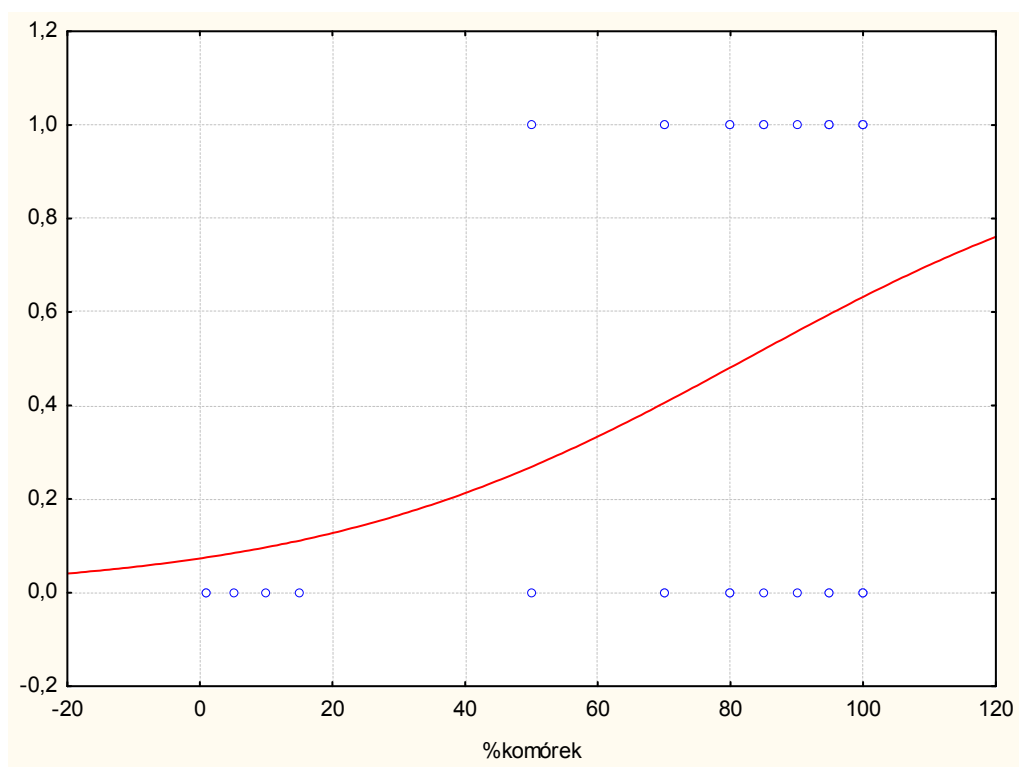
Rysunek 64. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów poniżej 1. r.ż. (p=NS)



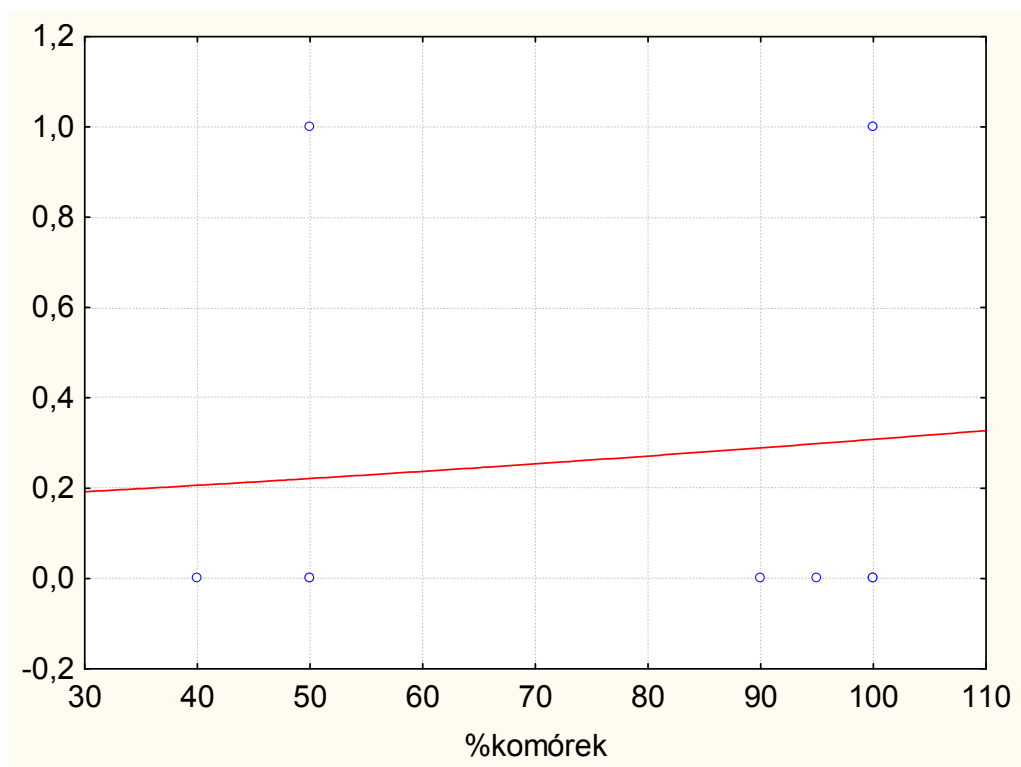
Rysunek 65. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN ($p=NS$)



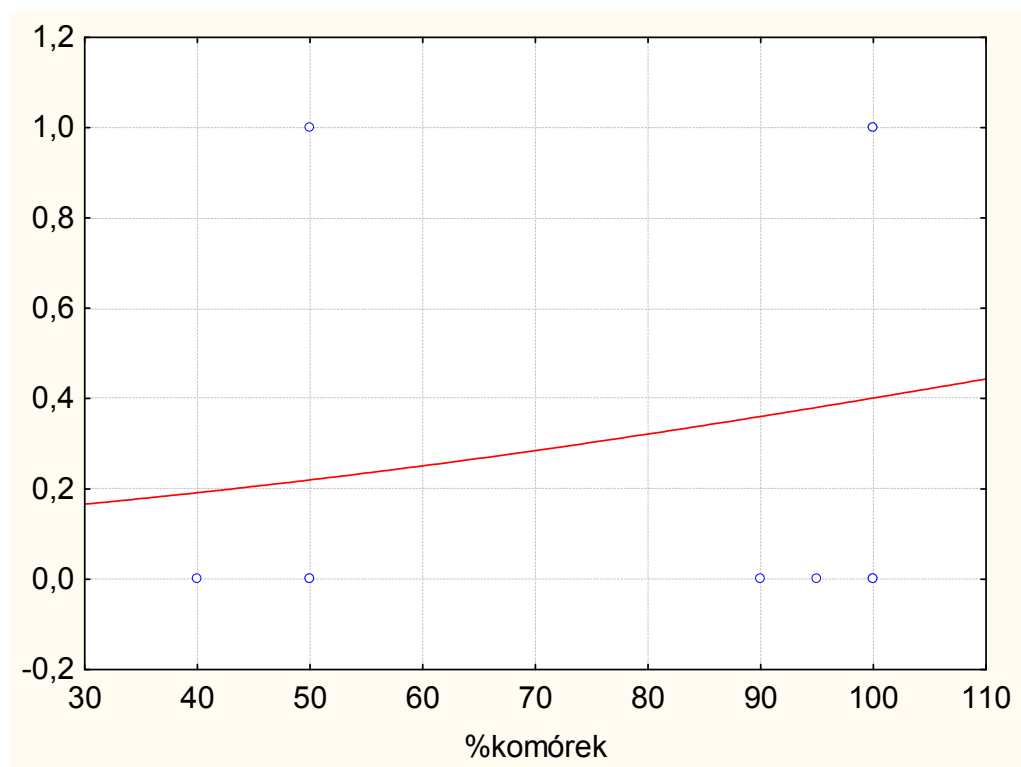
Rysunek 66. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów bez amplifikacji genu MYCN ($p=0,05$)



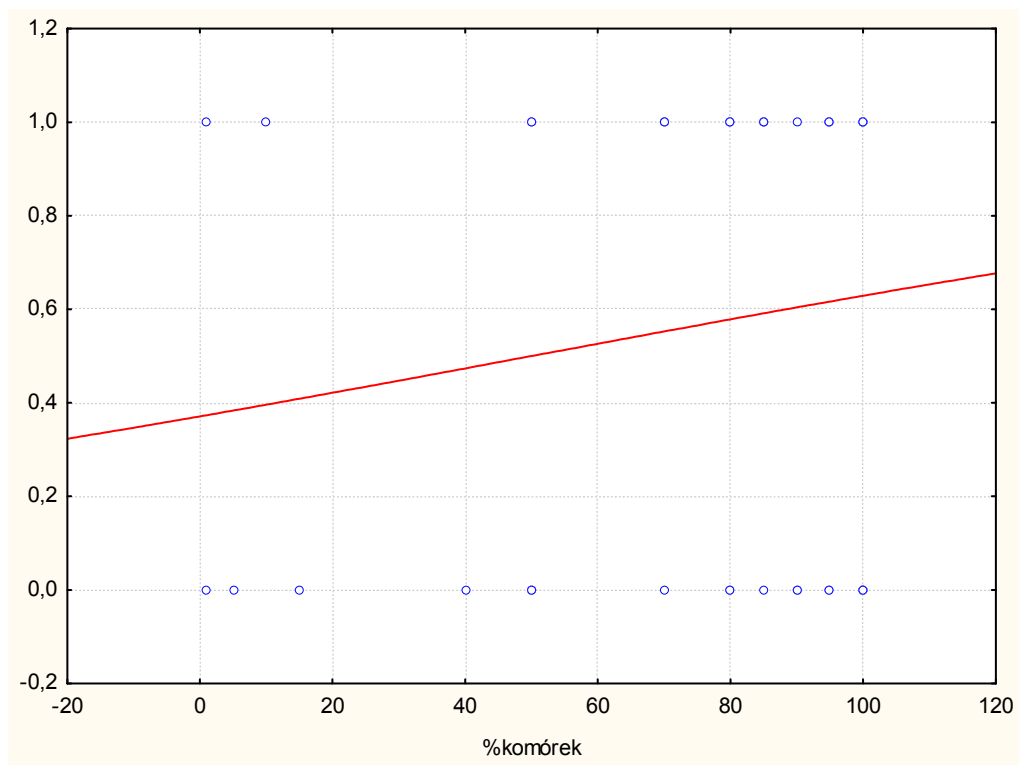
Rysunek 67 Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów z amplifikacją genu MYCN (p=NS)



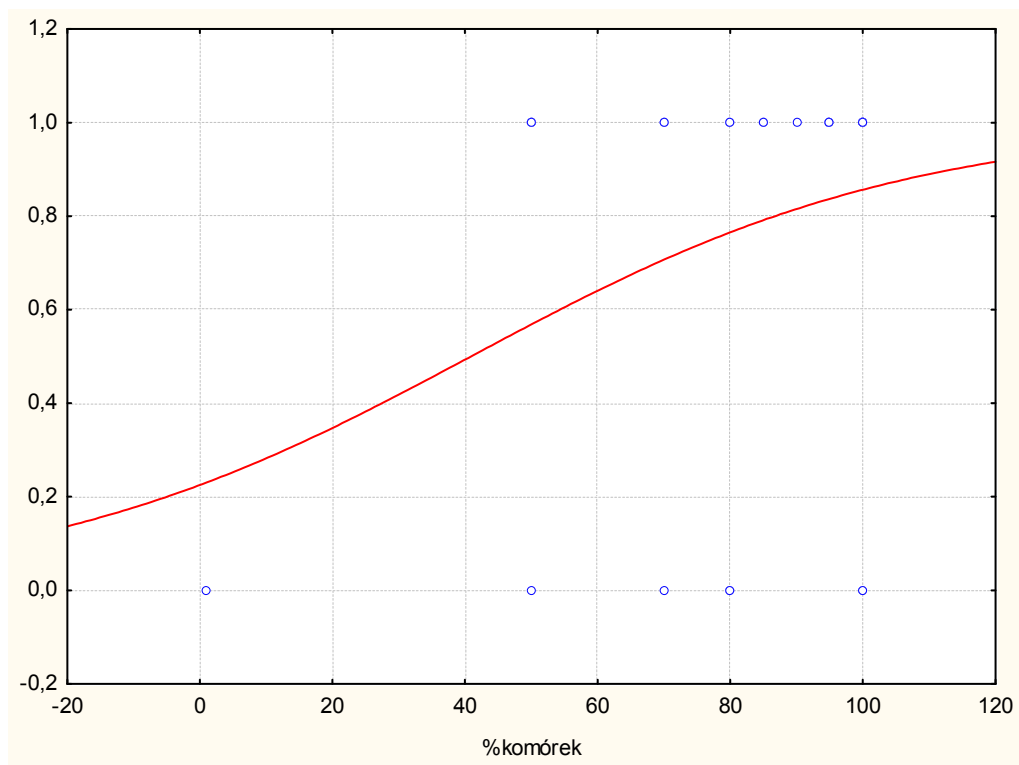
Rysunek 68. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów z amplifikacją genu MYCN (p=NS)



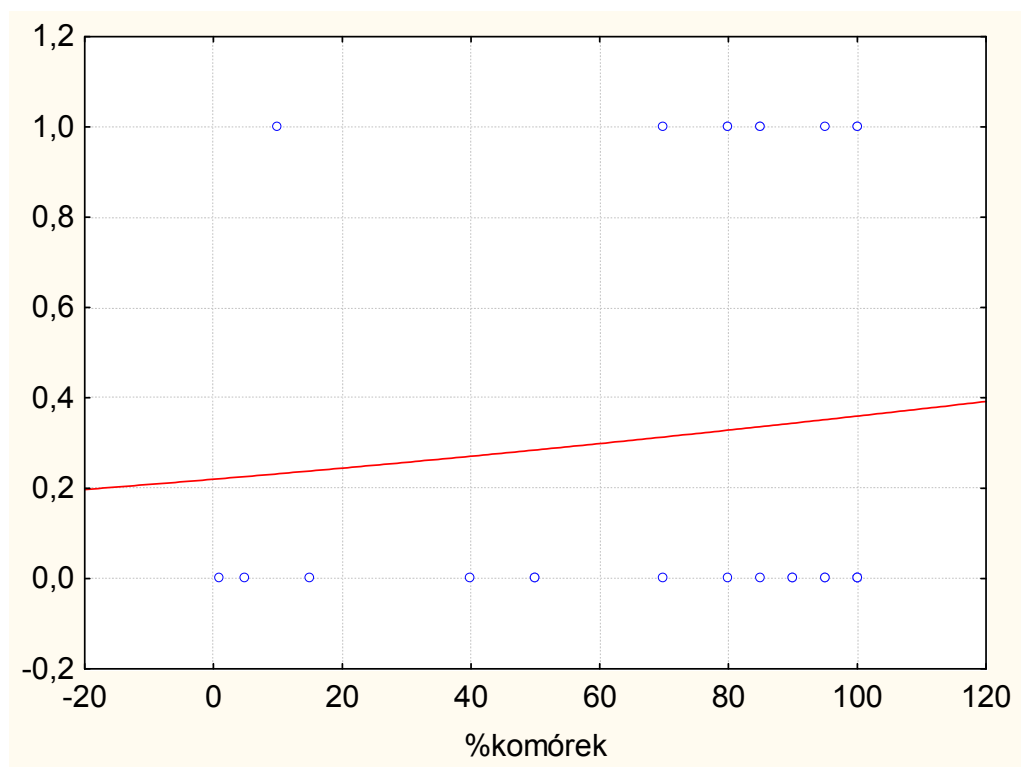
Rysunek 69. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów w 2., 3. i 4s stopniu zaawansowania (p=NS)



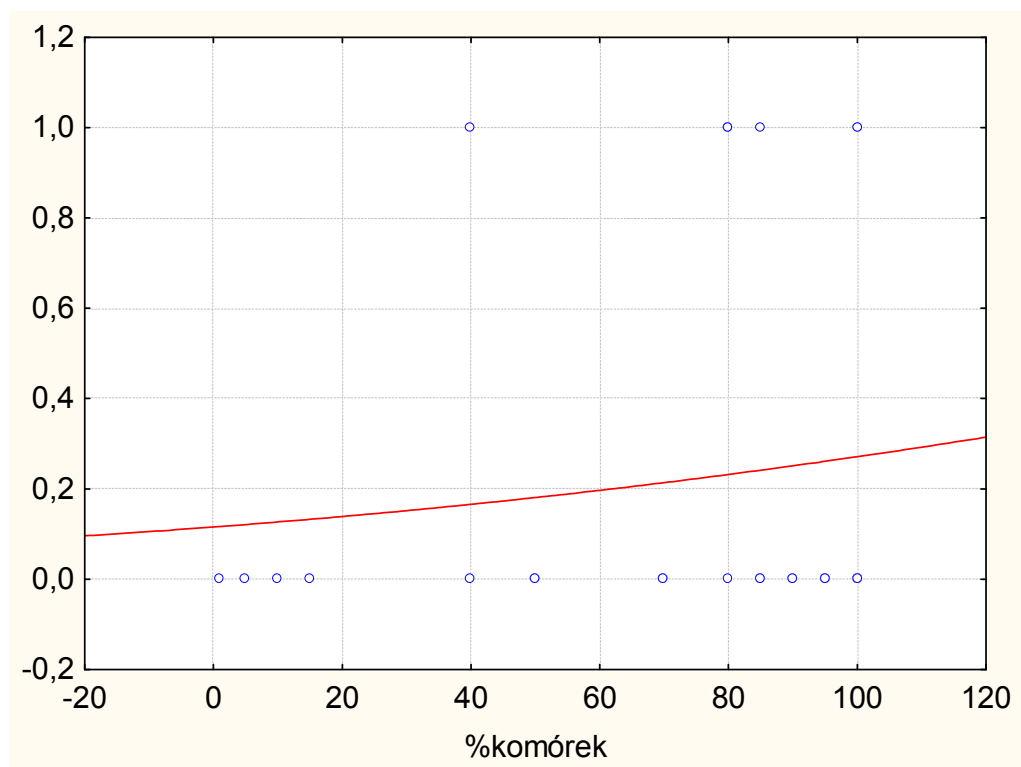
Rysunek 70. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów w 2., 3. i 4s stopniu zaawansowania (p=NS)



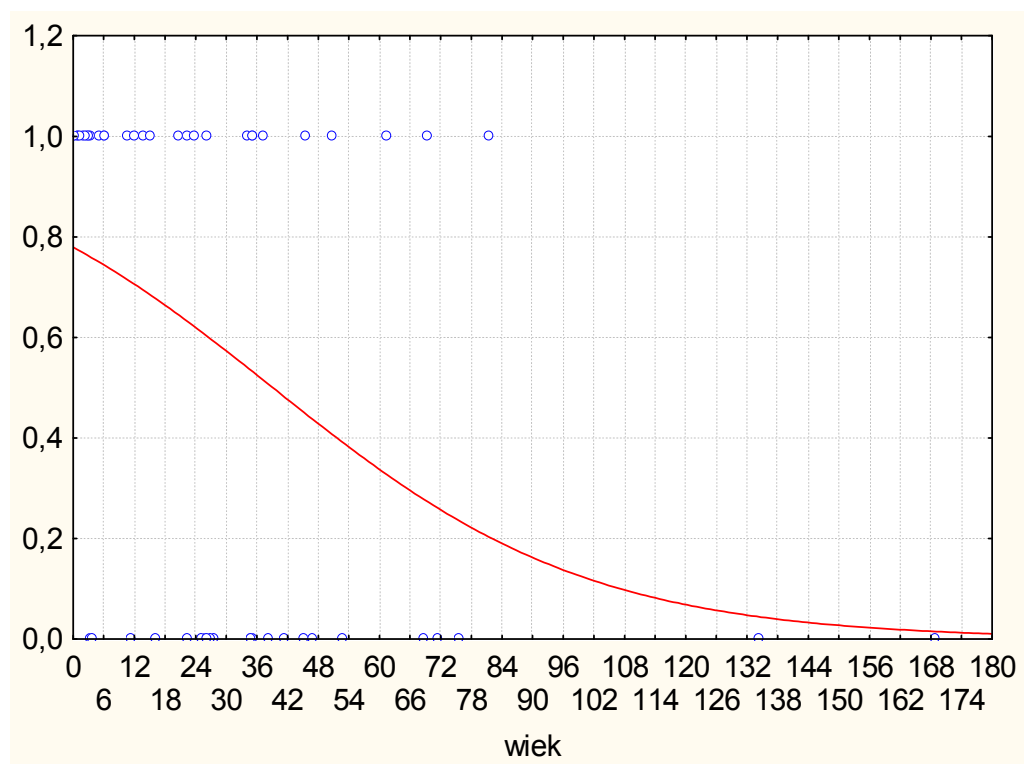
Rysunek 71. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów w 4. stopniu zaawansowania (p=NS)



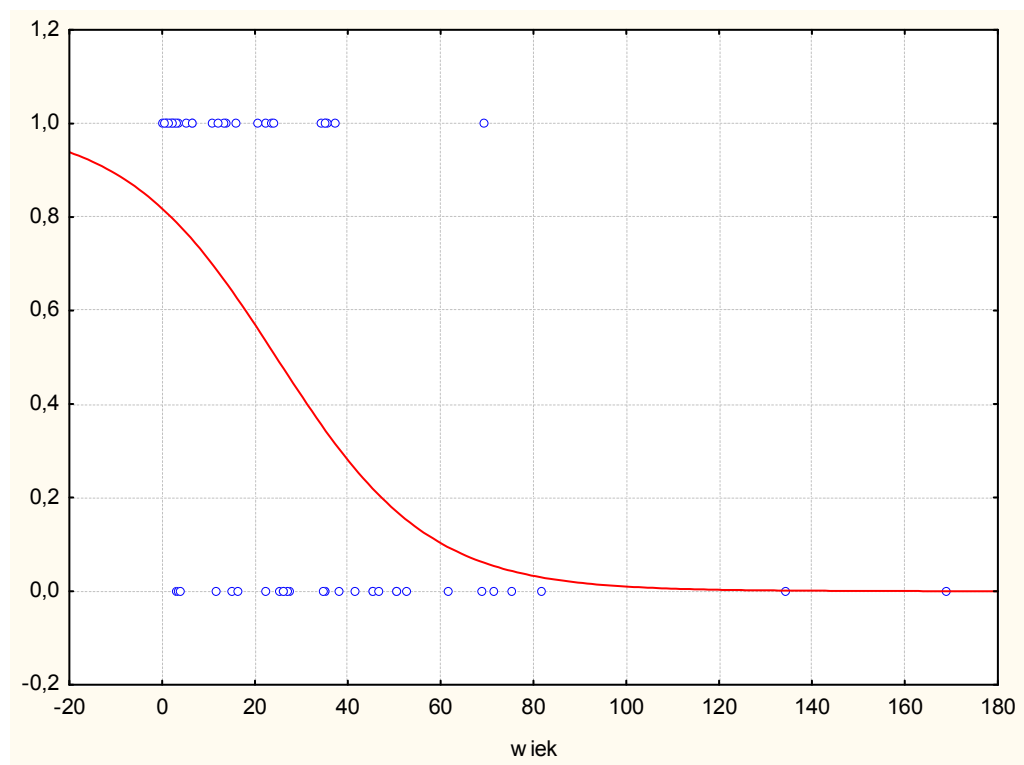
Rysunek 72. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 dla pacjentów w 4. stopniu zaawansowania (p=NS)



Rysunek 73. Krzywa logistyczna ryzyko wystąpienia zgonu z powodu NBL w zależności od wieku pacjenta ($p=0,01$)

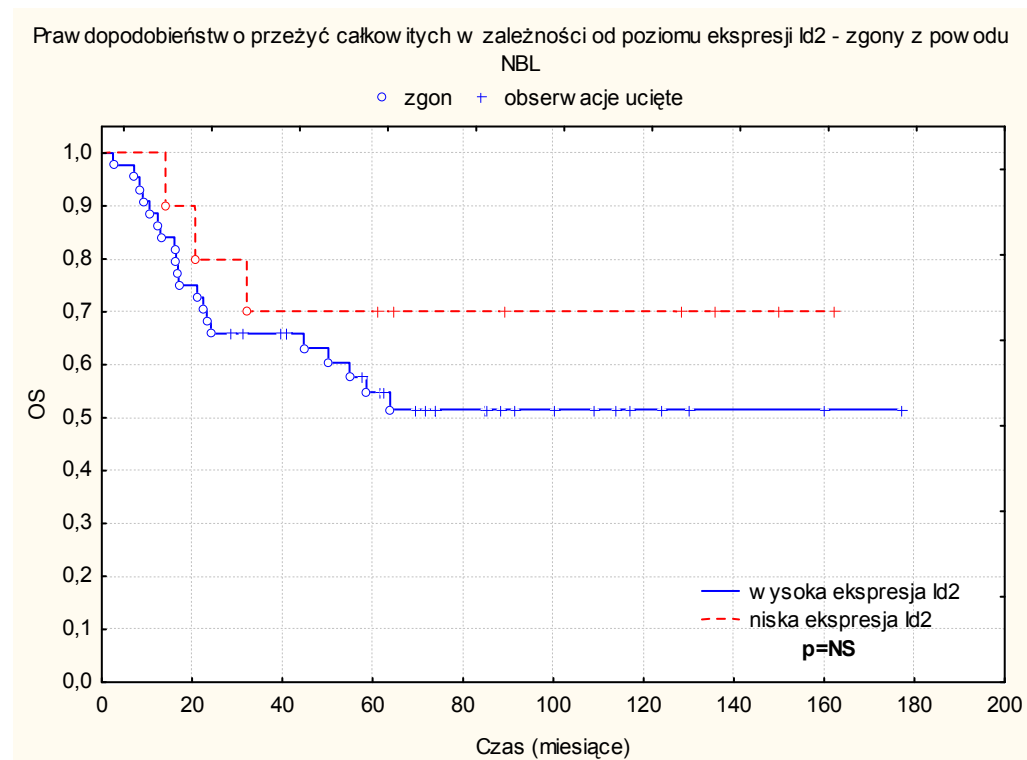


Rysunek 74. Krzywa logistyczna określająca ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia w zależności od wieku pacjenta ($p=0,00008$)

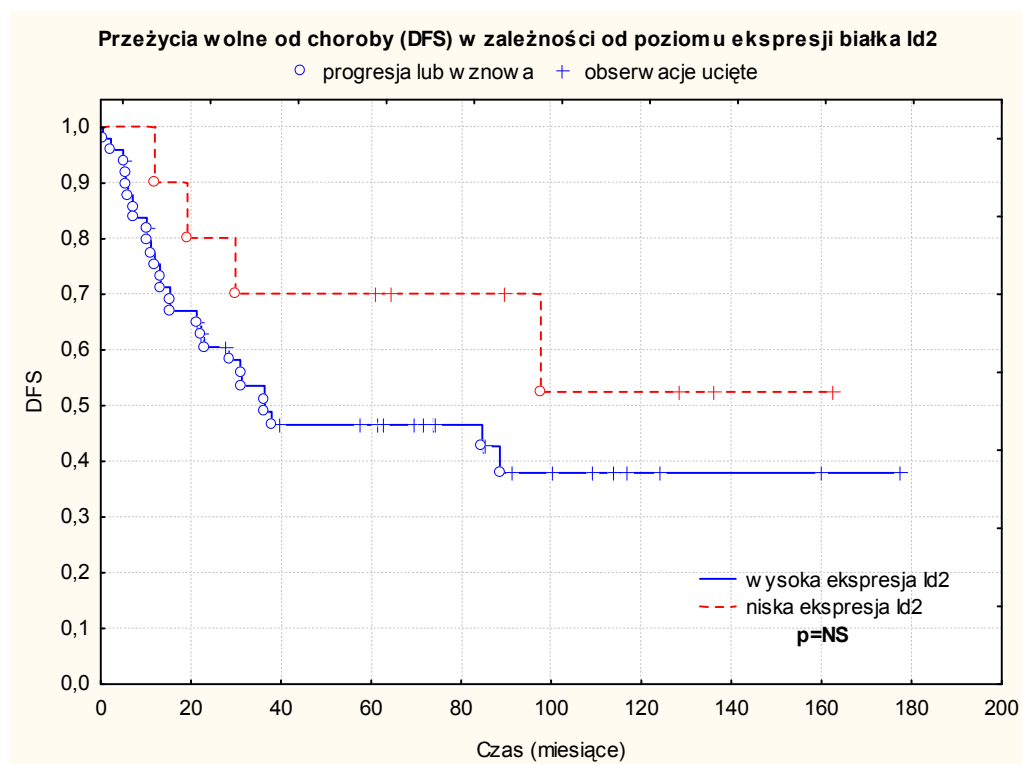


Krzywe przeżycia Kaplana-Meiera w zależności od intensywności ekspresji białka Id2

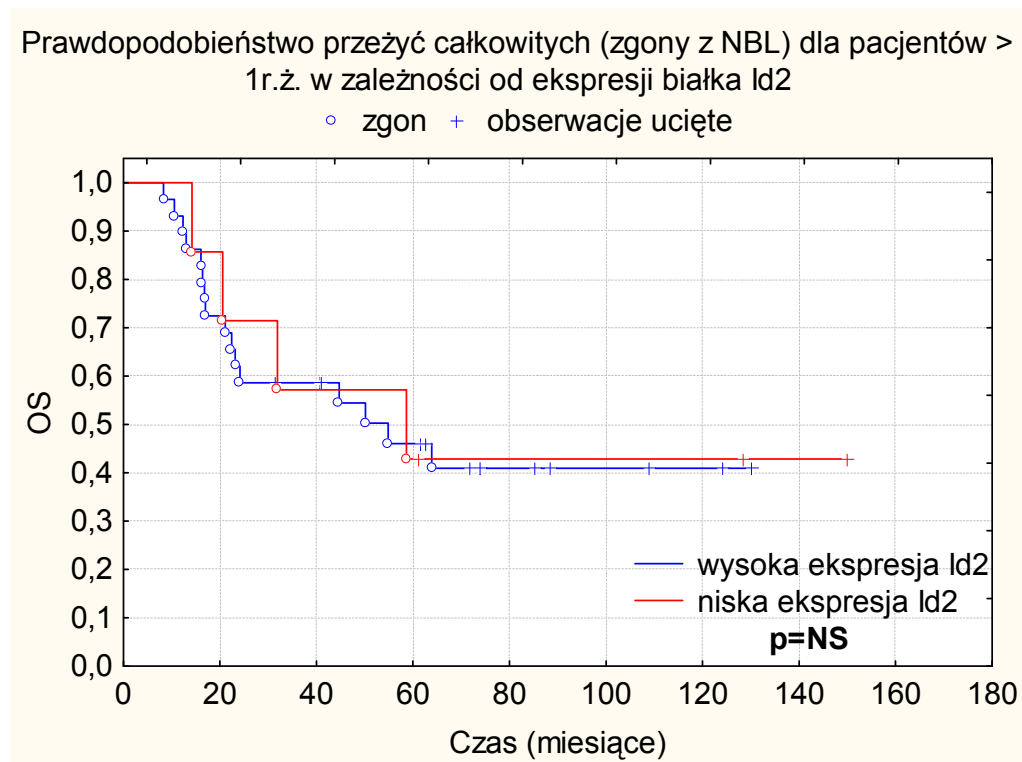
Rysunek 75. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z NBL) w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 w całej grupie pacjentów



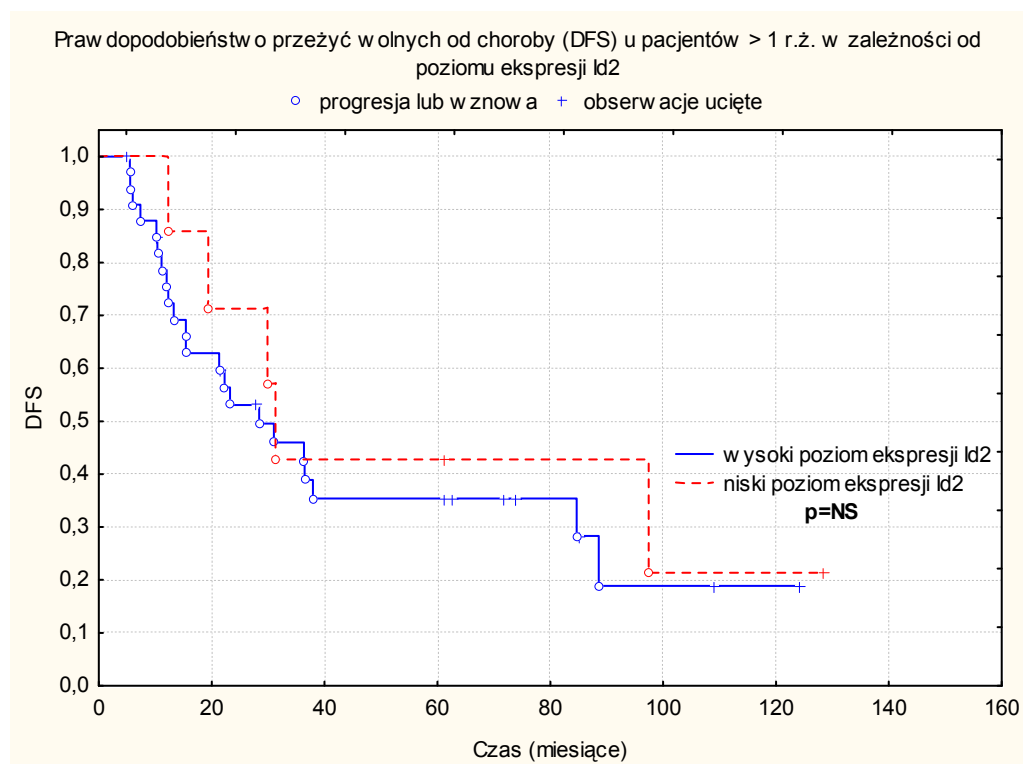
Rysunek 76. Krzywe przeżycia wolnego od choroby w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 w całej grupie pacjentów



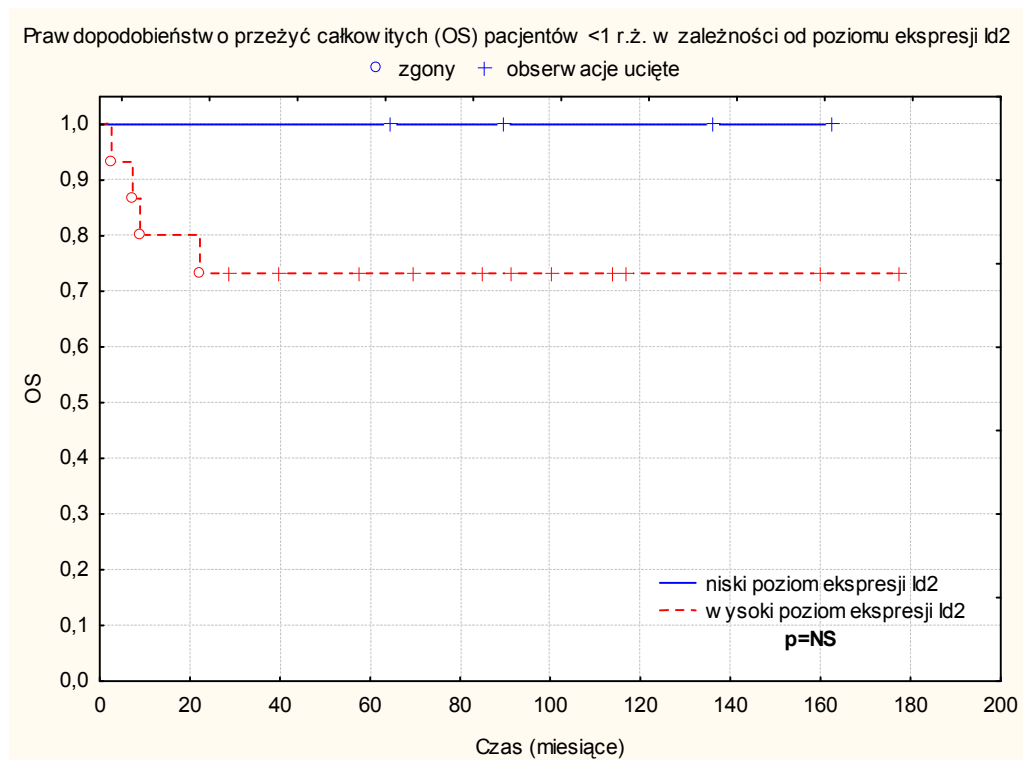
Rysunek 77. Krzywe przeżycia całkowitego w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów powyżej 1. r.ż.



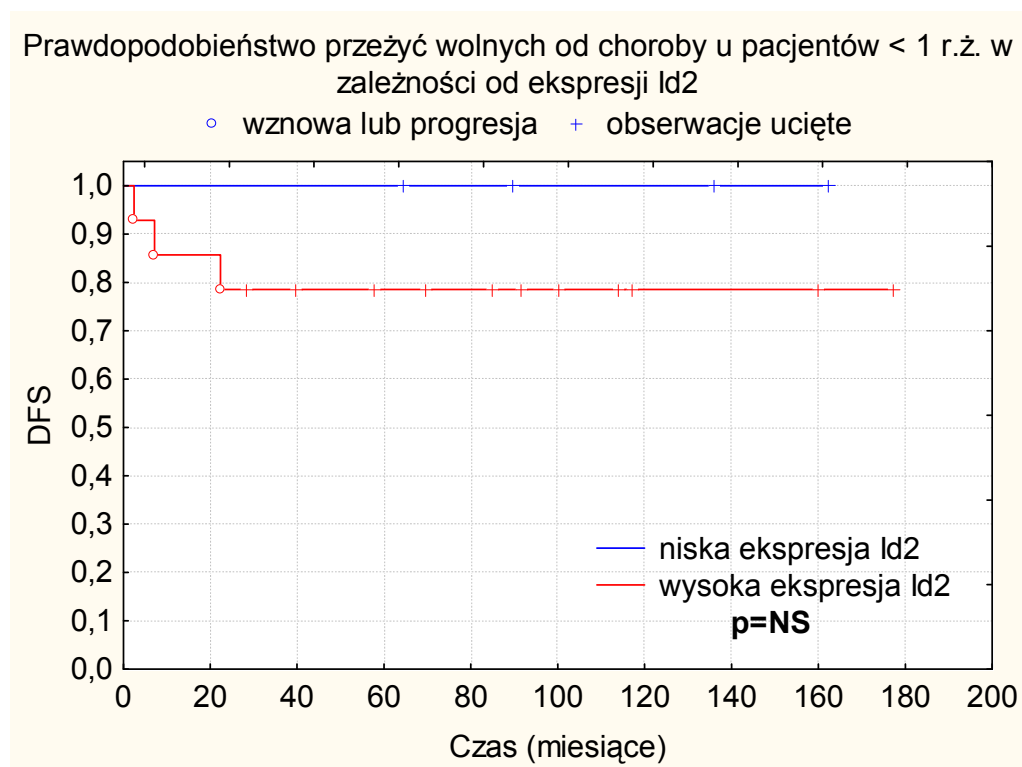
Rysunek 78. Krzywe przeżycia wolnego od choroby w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów powyżej 1. r.ż



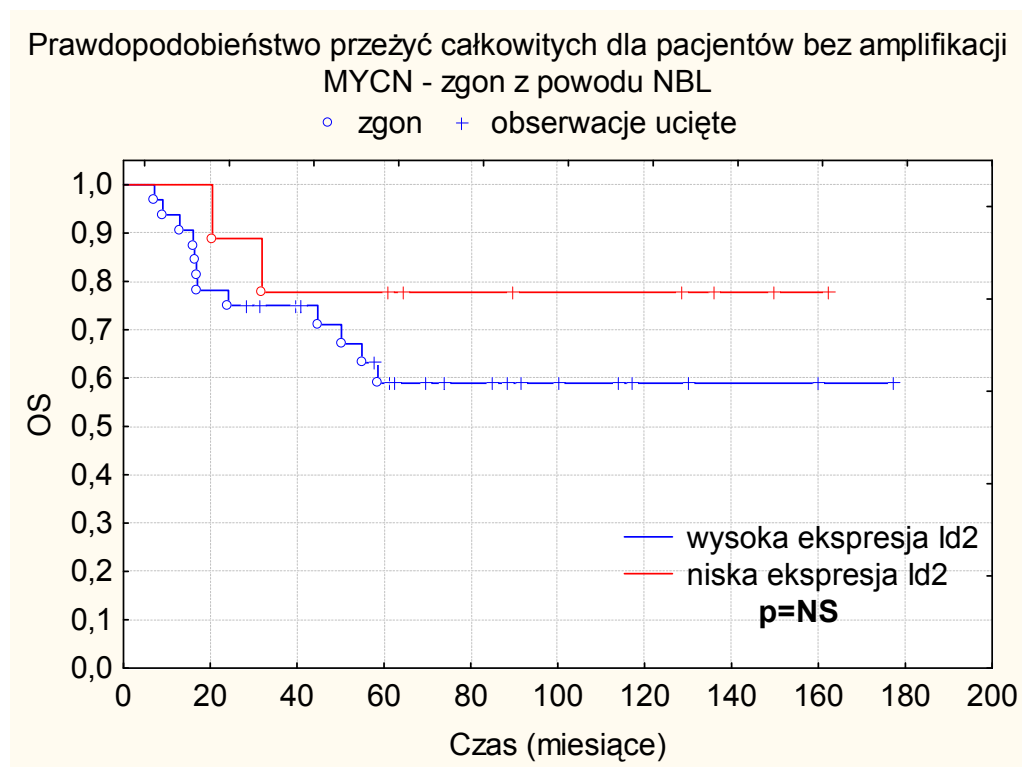
Rysunek 79. Krzywe przeżycia całkowitego w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów poniżej 1. r.ż



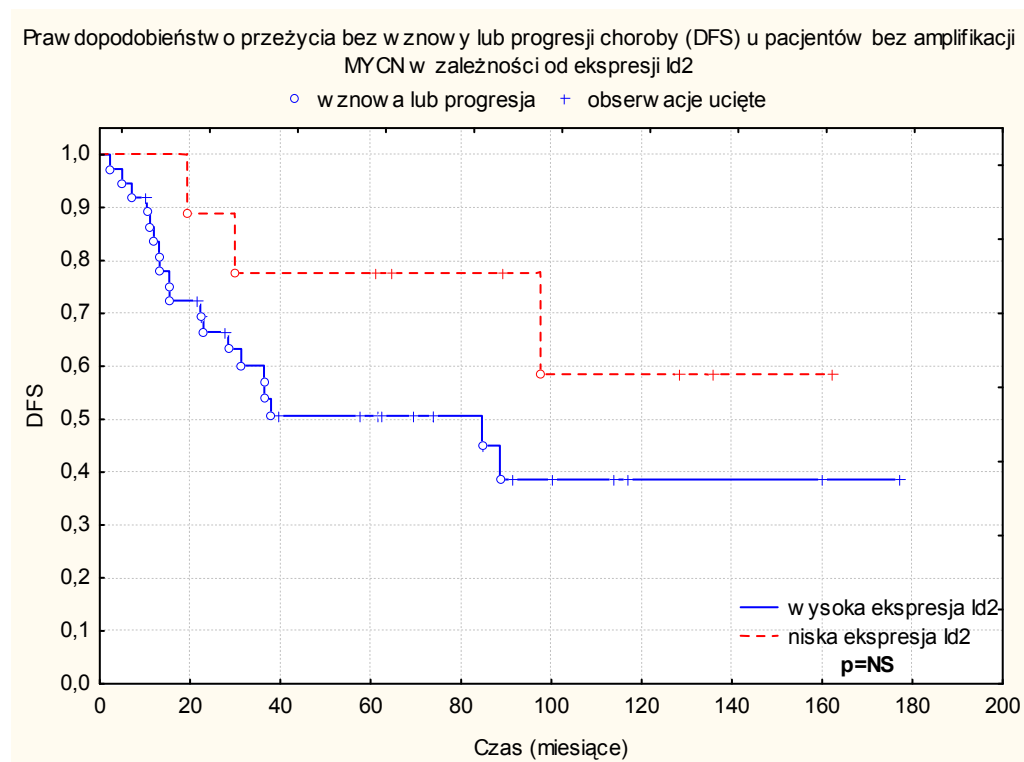
Rysunek 80. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów poniżej 1. r.ż



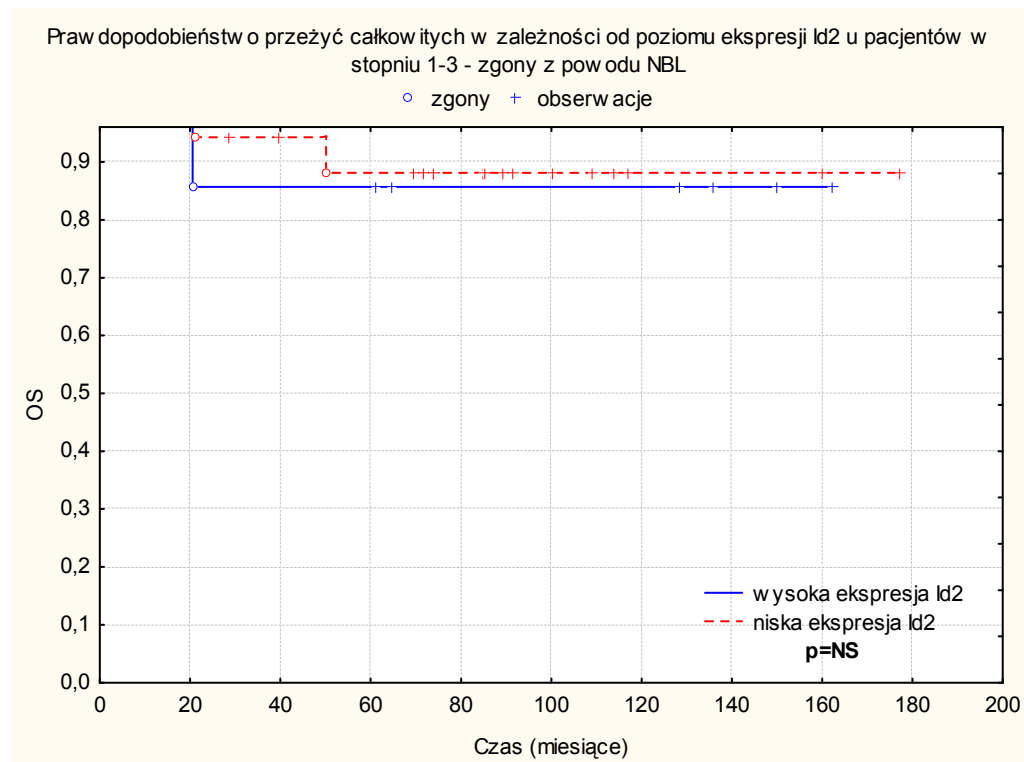
Rysunek 81. Krzywe przeżycia całkowite w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów bez amplifikacji MYCN



Rysunek 82. Krzywe przeżycia wolnego od choroby w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów bez amplifikacji MYCN

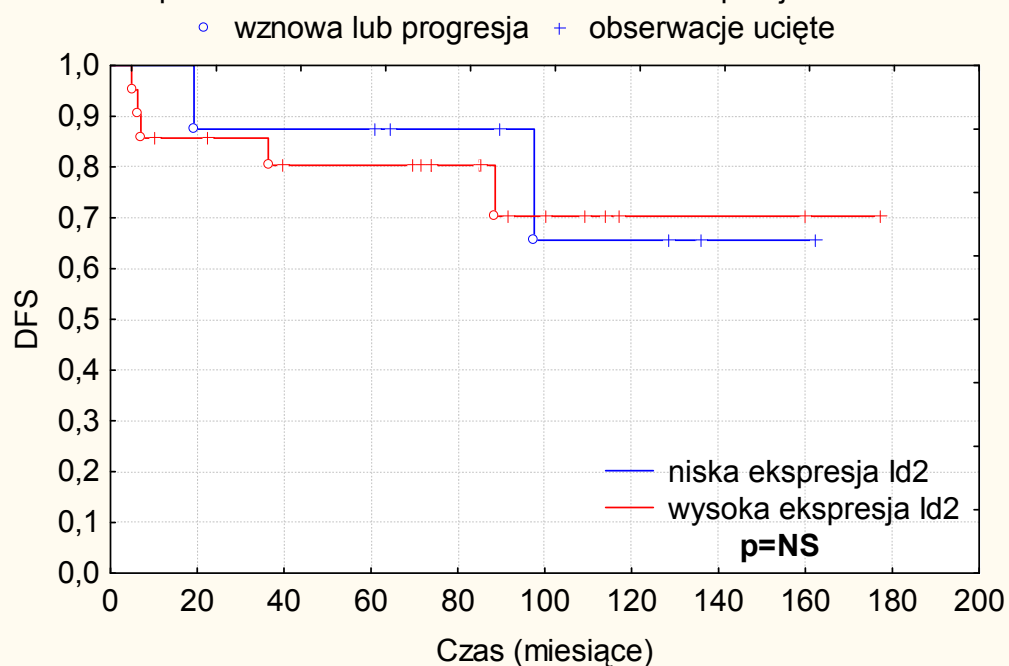


Rysunek 83. Krzywe przeżycia całkowitego w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 u pacjentów w 2., 3. i 4s stopniu zaawansowania klinicznego



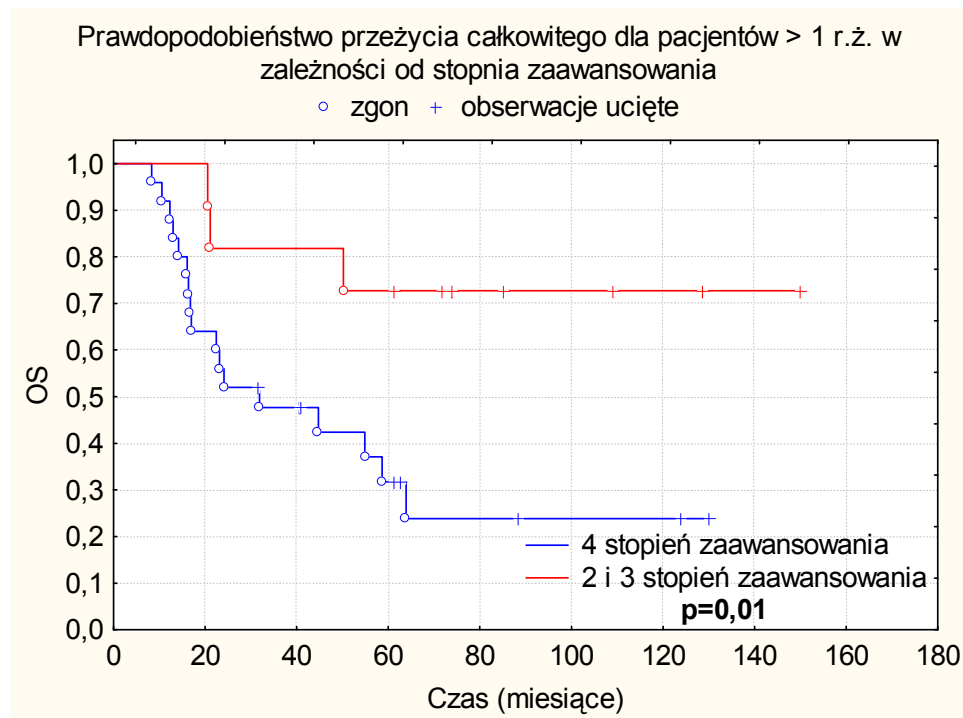
Rysunek 84. Krzywe przeżycia wolnego od choroby w zależności od intensywności ekspresji białka Id2 dla pacjentów w 2., 3. i 4s stopniu zaawansowania

Prawdopodobieństwo przeżyć wolnych od choroby dla pacjentów w 2, 3 i 4s stopniu zaawansowania w zależności od ekspresji białka Id2

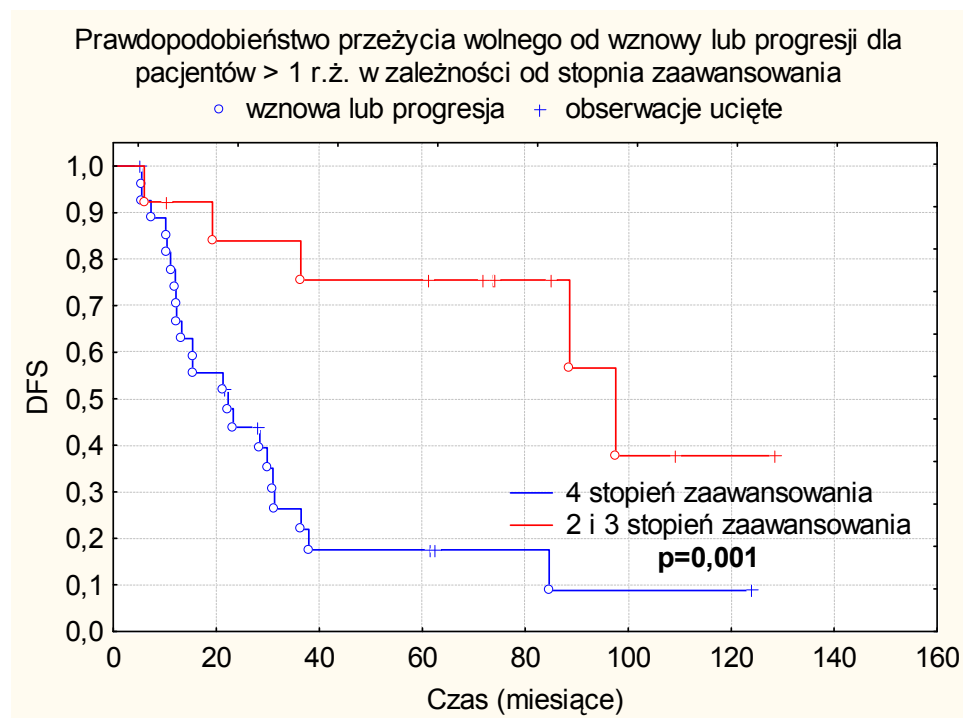


Krzywe przeżycia Kaplana-Meiera dla znaczenia poszczególnych czynników rokowniczych dla pacjentów poniżej i powyżej 1. r.ż.

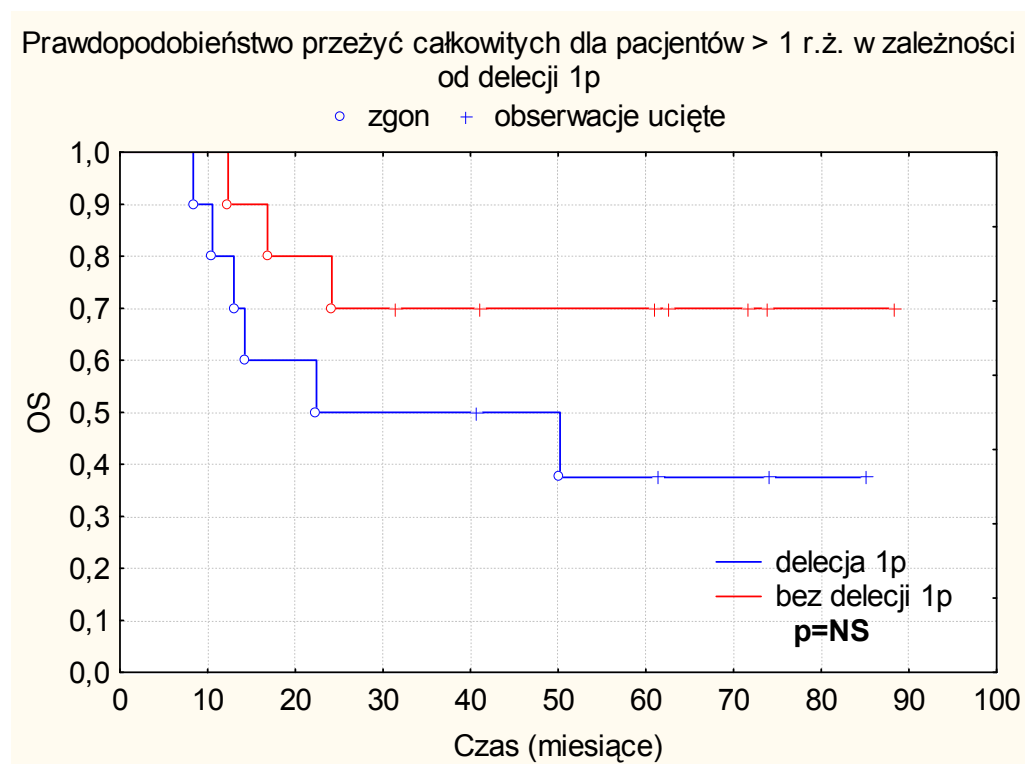
Rysunek 85. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z NBL) w zależności od stopnia zaawansowania dla pacjentów powyżej 1. r.ż.



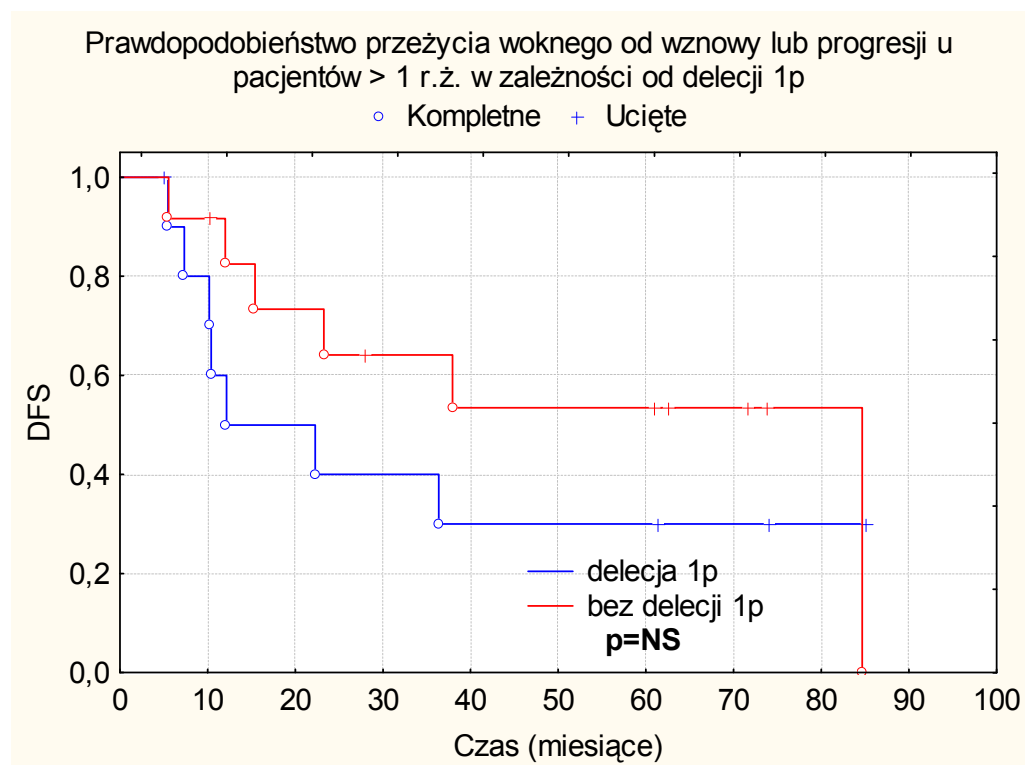
Rysunek 86. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia w zależności od stopnia zaawansowania dla pacjentów powyżej 1. r.ż.



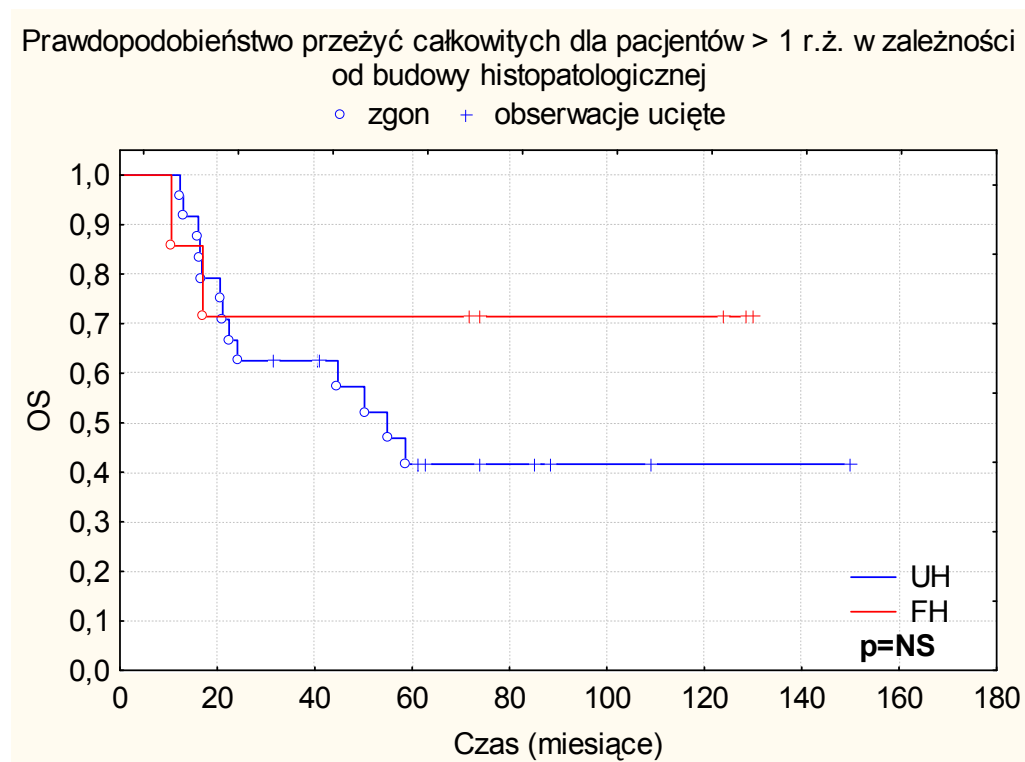
Rysunek 87. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z NBL) w zależności od obecności delekcji 1p dla pacjentów powyżej 1. r.ż.



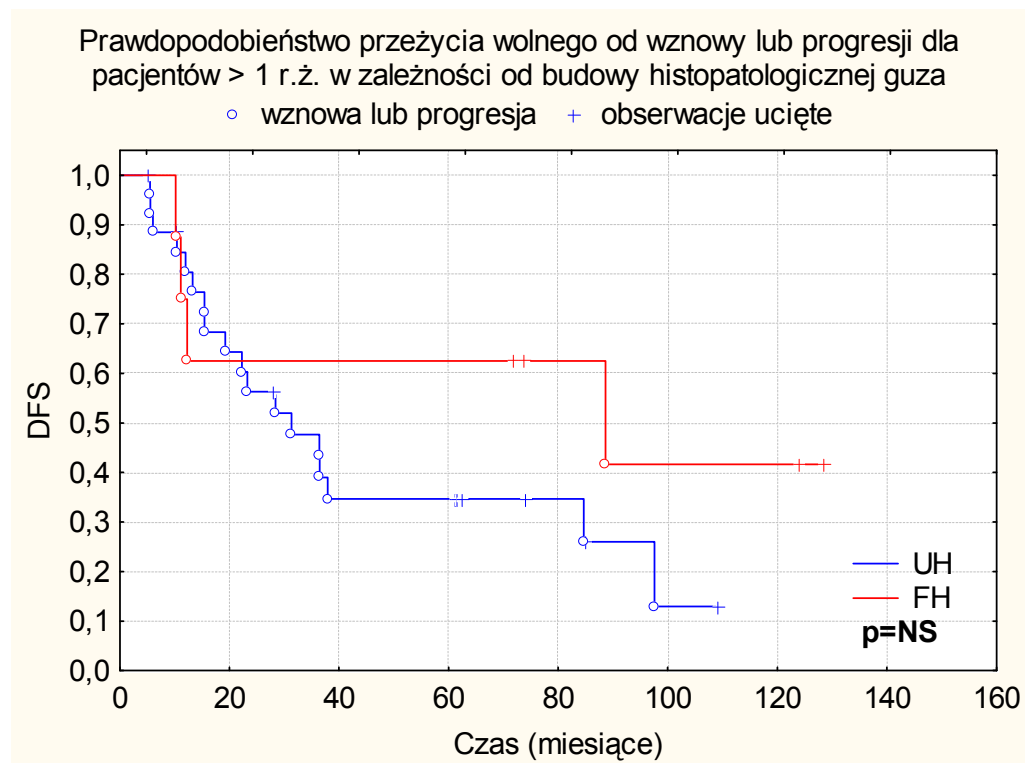
Rysunek 88. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia w zależności od obecności delekcji 1p dla pacjentów powyżej 1. r.ż.



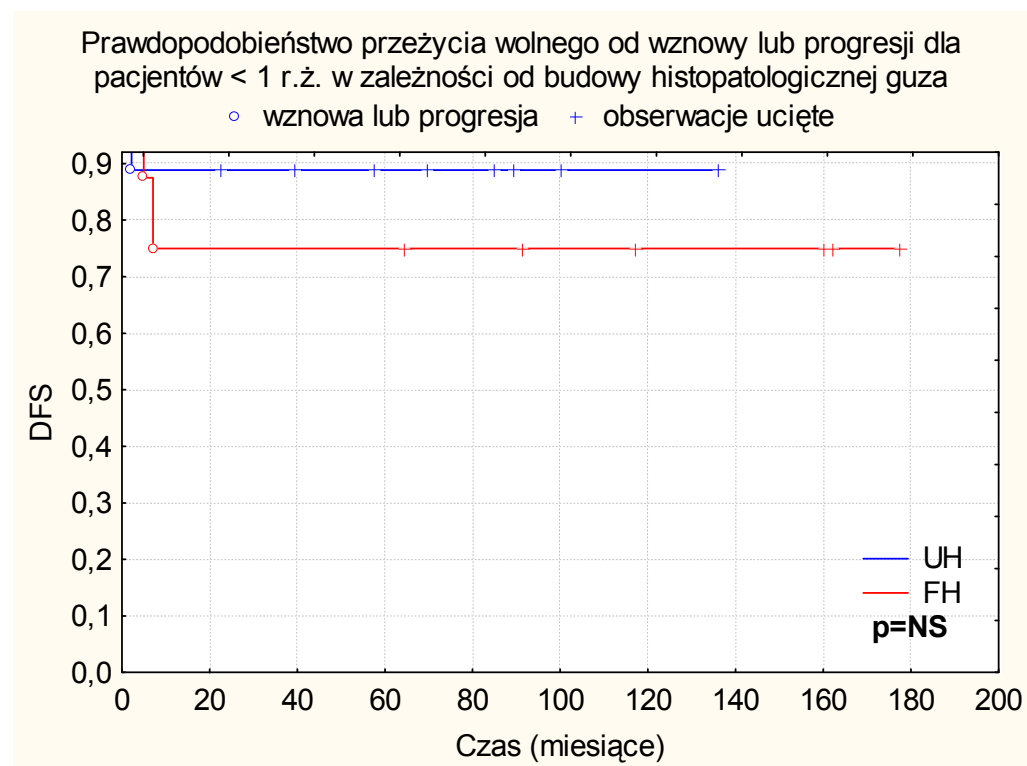
Rysunek 89. Krzywe przeżycia całkowitego (zgony z NBL) w zależności od budowy histopatologicznej dla pacjentów powyżej 1. r.ż.



Rysunek 90. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia w zależności od budowy histopatologicznej dla pacjentów powyżej 1. r.ż.

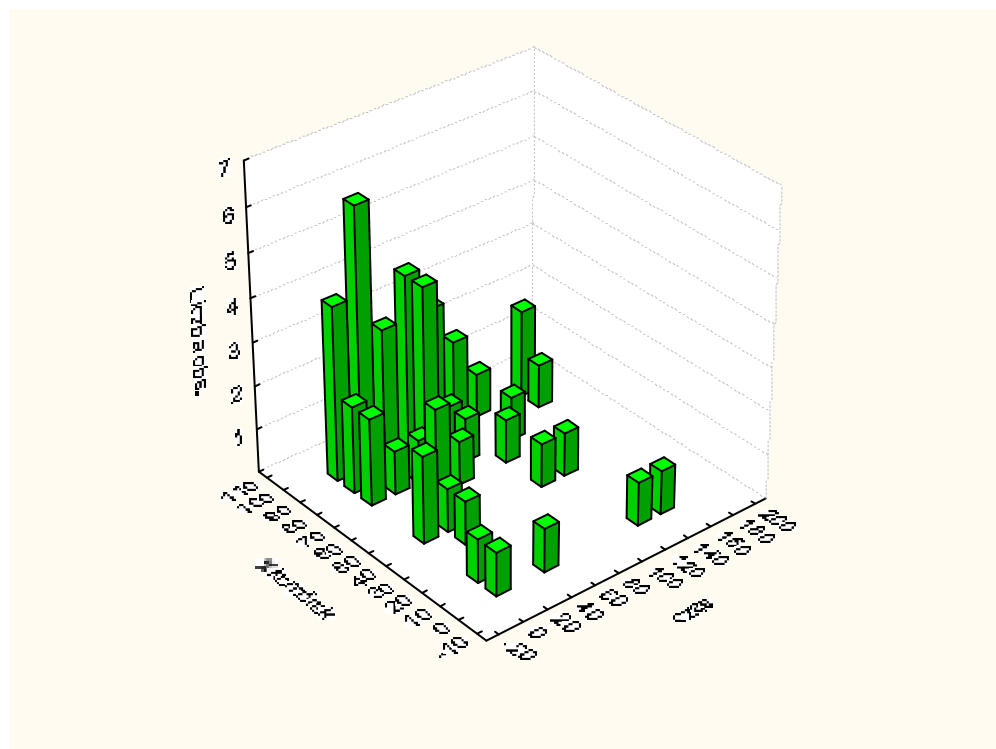


Rysunek 91. Krzywe przeżycia wolnego od niepowodzenia leczenia w zależności od budowy histopatologicznej dla pacjentów poniżej 1. r.ż.

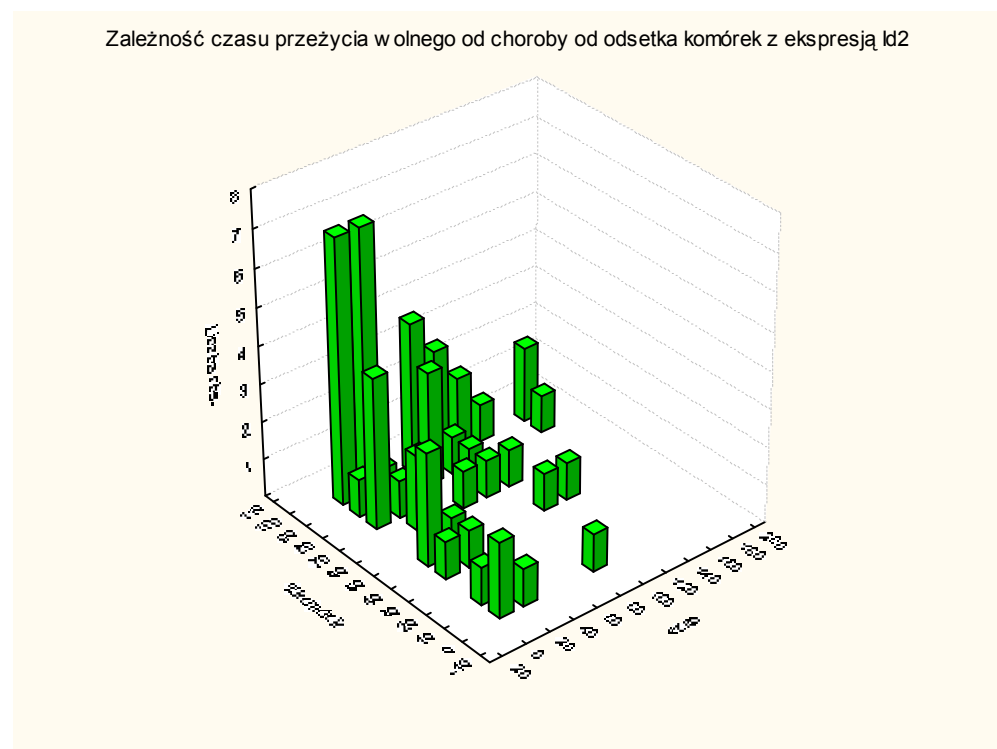


Analiza korelacji odsetka komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 z OS, DFS i wybranymi markerami biochemicznymi

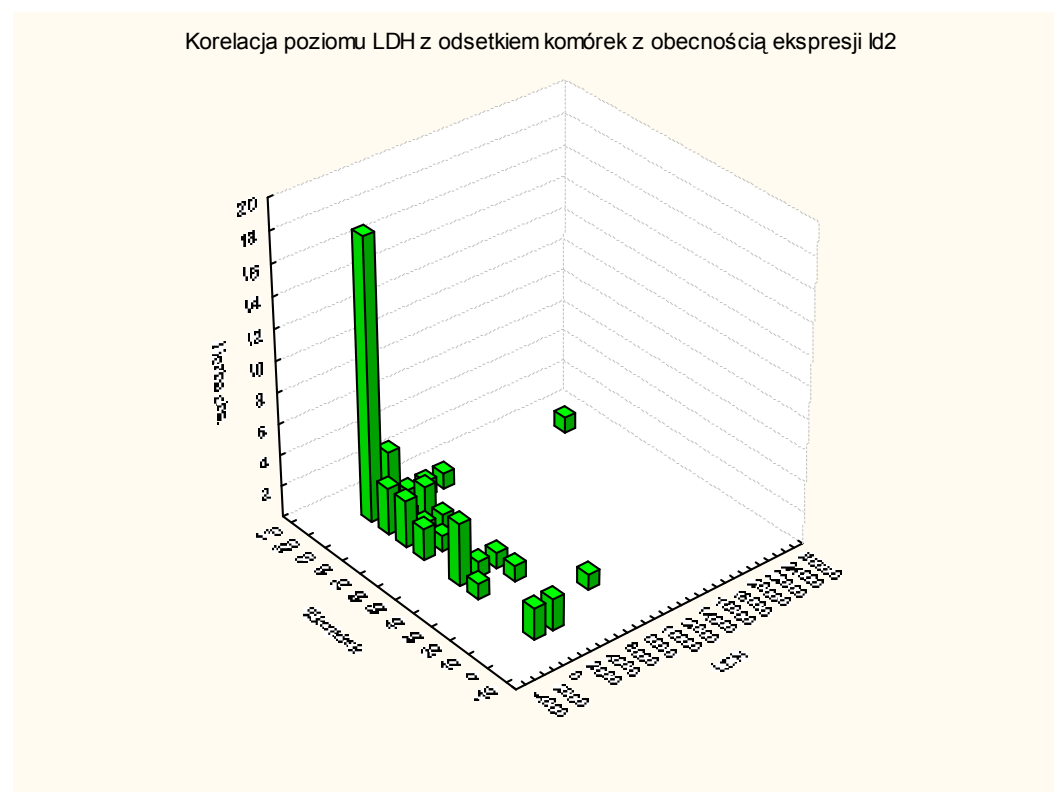
Rysunek 92. Korelacja czasu przeżycia całkowitego z odsetkiem komórek NBL z obecną ekspresją białka Id2 w całej grupie pacjentów



Rysunek 93. Korelacja czasu przeżycia wolnego od choroby i odsetka komórek z ekspresją białka Id2 dla całej grupy



Rysunek 94. Korelacja poziomu dehydrogenazy mleczanowej w momencie diagnozy i odsetka komórek z ekspresją Id2 dla całej grupy



Rysunek 95. Korelacja stężenia ferrytyny w momencie diagnozy i odsetka komórek z ekspresją Id2 dla całej badanej grupy

