

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

HERMINA ČIBEJ

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

HERMINA ČIBEJ

**DOLOČANJE KLINIČNO POMEMBNIH
KROMOSOMSKIH PREUREDITEV PRI
NEUROBLASTOMU**

**DETERMINATION OF CLINICALY IMPORTANT
CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS IN
NEUROBLASTOMA**

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana (Oddelek za hematologijo, Specializirani hematološki laboratorij) pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem. in somentorstvom prof. dr. Janeza Jazbeca, dr. med.

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Heleni Podgornik za strokovno pomoč, vodenje in nasvete pri nastajanju magistrske naloge.

Zahvaljujem se Otroški bolnišnici Zagreb za posredovane vzorce in podatke, da sem nalogo lahko izvedla.

Zahvaljujem se svojim najdražjim. Svojim staršem, Luku, Timu in Filipu za potrpežljivost, pomoč, ter vzpodbudne nasmeh in besede.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem. in somentorstvom prof. dr. Janeza Jazbeca, dr. med.

Podpis:

Ljubljana, 2014

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Mentorica: doc. dr. Helena Podgornik

Somentor: prof. dr. Janez Jazbec

Član komisije: doc. dr. Igor Locatelli

KAZALO

KAZALO SLIK.....	III
------------------	-----

KAZALO PREGLEDNIC.....	IV
------------------------	----

SEZNAM OKRAJŠAV.....	V
----------------------	---

POVZETEK.....	VI
---------------	----

ABSTRACT	VIII
----------------	------

1 UVOD	1
--------------	---

1.1 NEVROBLASTOM.....	1
-----------------------	---

1.1.1 Mednarodni sistem razvrščanja nevroblastoma - INSS (International Neuroblastoma Staging System)	2
---	---

1.1.2 Mednarodni sistem razvrščanja nevroblastomov z upoštevanjem faktorjev tveganja-INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System)	3
---	---

1.1.3 Zdravljenje.....	4
------------------------	---

1.2 GENETIKA NEVROBLASTOMA	4
----------------------------------	---

1.2.1 MYCN amplifikacija	4
--------------------------------	---

1.2.2 Ponavljajoče kromosomske spremembe pri nevroblastomu	7
--	---

1.2.3 Ploidnost	7
-----------------------	---

1.3 Fluorescenčna »in situ« hibridizacija	8
---	---

1.3.1 FISH na tkivih fiksiranih v formalinu in tkivih vklopljenih v parafin	9
---	---

1.4 DNA-sonde	10
---------------------	----

2 NAMEN DELA	12
--------------------	----

3 MATERIALI IN METODE.....	14
----------------------------	----

3.1 MATERIALI ZA IZVEDBO FISH	14
-------------------------------------	----

3.1.1 Priprava raztopin za FISH	15
---------------------------------------	----

3.1.2 DNA sonde, uporabljene za FISH	16
--	----

3.2	APARATURE	19
3.3	PREDPRIPRAVA STEKEL Z VZORCEM IN FISH METODA	19
3.4	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	23
4	REZULTATI	24
4.1	PREISKOVANCI	24
4.2	OPTIMIZACIJA FISH.....	25
4.3	FISH ANALIZA TARČNIH SPREMEMB	28
4.4	REZULTATI FISH ANALIZE NA VZORCIH NEVROBLASTOMA.....	30
4.4.1	Stopenjska FISH ananliza.....	30
4.4.2	Tehnično neprimerni preparati	31
4.4.3	Pogostost ponavljajočih klinično pomembnih kromosomskih sprememb	33
4.5	PREŽIVETJE BOLNIKOV GLEDE NA DOLOČENE KROMOSOMSKE SPREMEMBE	35
4.5.1	Vpliv amplifikacije <i>MYCN</i> na preživetje.....	35
4.5.2	Vpliv ostalih preureditev na preživetje.....	36
5	RAZPRAVA	37
5.1	VPELJAVA METODE	37
5.2	POJAVNOST CITOGENETSKIH SPREMEMB.....	38
5.3	VPLIV DOLOČENIH KROMOSOMSKIH SPREMEMB NA PREŽIVETJE..	39
6	SKLEP	40
7	LITERATURA	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Intrakromosomska in ekstrakromosomska amplifikacija <i>MYCN</i>	5
Slika 2: Razvoj podskupin nevroblastoma glede na kromosomske preureditve in ploidnost	6
Slika 3: Fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija.....	9
Slika 4: DNA-sonde	11
Slika 5: Področje vezave DNA-sonde ON 1q21/SRD1p36.....	17
Slika 6: Področje vezave DNA-sonde LSI N-MYC(2p24)/CEP2.....	18
Slika 7: Področje vezave DNA-sonde LSI MLL.....	18
Slika 8: Starost arhivskega vzorca tumorskega tkiva ob analizi	24
Slika 9: Starost otrok z nevroblastomom ob postavitvi diagnoze	25
Slika 10: Shematski prikaz FISH.	26
Slika 11: Preverjanje uspešnosti pepsinizacije pod fluorescenčnim mikroskopom z barvanjem jeder z DAPI: A) nezadostna pepsinizacija, B) ustrezna pepsinizacija	27
Slika 12: Področja vzorca neprimerna za štetje: A) avtofluorescenca tkiva, B) prekrivanje celic.....	28
Slika 13: DNA-sonda ON 1q21/SRD1p36. A) Celica z delecijo na kratkem kraku kromosoma 1	29
Slika 14: DNA sonda LSI MLL: Celica z delecijo na dolgem kraku kromosoma 11.....	29
Slika 15: DNA-sonda LSI N-MYC(2p24)/CEP2: Celica z amplifikacijo <i>MYCN</i>	30
Slika 16: Normalna celica. A) DNA-sonda LSI N-MYC(2p24)/CEP2, B) DNA-sonda LSI MLL.....	30
Slika 17: Shematski prikaz števila analiziranih vzorcev in izbor DNA-sonde za FISH metodo	31
Slika 18: Določanje amplifikacije gena <i>MYCN</i>	33
Slika 19: Ponavljajoče kromosomske preureditve, pri bolnikih z nevroblastomom	34
Slika 20: Krivulji preživetja bolnikov z amplifikacijo in brez amplifikacije <i>MYCN</i>	35
Slika 21: Krivulje preživetja bolnikov s ponavljajočimi kromosomskimi spremembami ..	36

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela I: Seznam uporabljenih materialov za izvedbo FISH.	14
Tabela II: Pričakovani signali za uporabljene DNA-sonde.	19
Tabela III: Seznam uporabljenih aparatov za izvedbo FISH metode.....	19
Tabela IV: Priporočila za terminologijo nevroblastoma s strani ENQUA.....	22
Tabela V: Tehnično neprimerni preparati za oceno pod fluorescenčnim mikroskopom. ...	32
Tabela VI: Pojavnost testiranih kromosomskih preureditev pri nevroblastomu.	34
Tabela VII: Preglednica spola, starosti, časa preživetja in kromosomskih sprememb pri bolnikih z nevroblastomom	44

SEZNAM OKRAJŠAV

bp – bazni par

BSA - goveji serumski albumin

CEP – DNA-sonda specifična za centromero kromosoma

DAPI - 4', 6'-diamidino-2-fenil-indol

DNA - deoksiribonukleinska kislina

FISH - fluorescenčna *in situ* hibridizacija

FITC - fluorescein izotiocianat

HSR – *Homogeneously staining regions*; homogeno obarvane regije

IDRF-*Image Defined Risk Faktors*; dejavniki tveganja za neuroblastom opredeljeni s slikovno diagnostiko

INSS - *International Neuroblastoma Staging System*; mednarodni sistem razvrščanja neuroblastomov v stadije

INRGSS-*International Neuroblastoma Risk Group Staging System*; mednarodni sistem razvrščanja neuroblastomov v stadije z upoštevanjem dejavnikov tveganja

LSI – lokus specifična DNA-sonda

LOH - *Loss of heterozygosity*- izguba heterozigotnosti

NP-40 - Nonidet P-40

PBS – fosfatno pufrana slanica

PBT – fosfatno pufrana slanica s Tweenom

SSC - citratni pufer z NaCl

SRD - *The smallest region of consistent deletion*; najmanjše področje delecije

TEL – telomerno specifična DNA-sonda

WCP – DNA-sonda za obarvanje celotnega kromosoma

POVZETEK

Pri bolnikih z nevroblastomom smo s fluorescenčno *in situ* hibridizacijo s komercialno dostopnimi DNA-sondami določali klinično pomembne kromosomske preureditve: amplifikacijo gena *MYCN*, delecijo 1p, delecijo 11q23 in ploidnost tumorja. Preiskavo smo uvedli na arhivskih parafinskih rezinah tumorja in jo preizkusili na diagnostičnih vzorcih novih bolnikov. Ugotavljali smo pogostost posameznih kromosomskih preureditev in jih primerjali s preživetjem bolnikov.

FISH smo izvedli z že pripravljenim kompletom za parafinske rezine in s pomočjo raztopin, ki smo jih pripravili sami. Uspešno smo uvedli postopek, pri katerem smo raztopine pripravili sami. Ugotovili smo, da arhivske parafinske rezine potrebujejo daljšo pepsinizacijo z višjo koncentracijo pepsina kot preparati predhodno gojenih celic tumorskih infiltratov.

V preiskavo smo vključili 61 bolnikov. 54 vzorcev je bilo arhivskih parafinskih rezin tumorjev bolnikov iz Otroške bolnišnice Zagreb in 7 vzorcev tumorjev novih bolnikov, ki so bili poslani na diagnostično obravnavo v Specializiran hematološki laboratorij UKC Ljubljana.

Odločili smo se za stopenjsko diagnostiko sprememb glede na njihovo pomembnost, analizo posameznih sprememb pa je omejevala tudi tehnična primernost preparatov. Amplifikacijo *MYCN* z DNA-sondo LSI N-MYC(2p24)/CEP2 smo določali pri 53/54 (98%) arhivskih vzorcev in 7/7 (100 %) svežih vzorcev bolnikov. Delecijo 1p in triploiden kariotip smo določali z DNA-sondo ON 1q21/SRD1p36 pri 46/48 (96 %) vzorcev brez amplifikacije *MYCN* oziroma pri 46/61 (75 %) vseh vzorcev. Delecijo 11q smo določali z DNA-sondo LSI MLL pri 26/32 (81 %) diploidnih tumorjev oziroma pri 26/61 (43 %) vseh vzorcev.

Amplifikacijo *MYCN* smo našli pri 12/61 (19,7 %) analiziranih vzorcev. Delecijo 1p smo analizirali samo pri vzorcih brez amplifikacije *MYCN* in jo našli pri 6/48 (12,5 %), triploiden kariotip pa pri 14/48 (29,2 %) vzorcev. Diploidne vzorce smo nato analizirali še na izgubo heterozigotnosti - delecijo 11q23, ki smo jo našli pri 16/32 (50 %) vzorcev. Strukturne spremembe kromosomov smo našli pri 22/32 (69 %) diploidnih tumorjev. Naši rezultati se dobro ujemajo z literaturnimi podatki.

Analizo preživetja smo naredili pri 60 bolnikih. Najdaljše preživetje imajo bolniki, pri katerih s tarčnimi sondami nismo našli kromosomskih sprememb in diploidnim tumorjem

ter pri bolnikih s triploidnim kariotipom. Najslabše preživetje pa smo določili pri bolnikih z delecijo 1p in, pričakovano, z amplifikacijo gena *MYCN*.

Ključne besede: nevroblastom, klinično pomembne kromosomske preureditve, arhivske parafinske rezine, fluorescenčna *in situ* hibridizacija, DNA sonda.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine clinically significant chromosome rearrangements in neuroblastoma patients: *MYCN* amplification, 1p deletion, 11q23 deletion, and tumor ploidy. Chromosomal rearrangements were determined with fluorescence *in situ* hybridization using commercially available DNA probes. The research was implemented on archived paraffin sections and diagnostic samples of new patients. The frequency of individual chromosomal rearrangements was observed and compared in terms of patient survival.

FISH was implemented with commercially available paraffin pre-treatment kit as well as solutions prepared in the laboratory. The procedure using our own solutions was implemented successfully. Our study has shown that archived paraffin sections require a longer pepsinization with a higher concentration of pepsin compared to cultivated tumor's cells.

Our study included 61 patients. 54 of the samples were archived tumor paraffin sections from patients of a Children's hospital Zagreb, while the remaining 7 samples came from patients referred for routine diagnostics to the Specialized Hematology Laboratory in UMC Ljubljana.

The chromosomal aberrations were analysed stepwise regarding their clinical significance. The analysis of individual changes was limited by the technical adequacy of the preparations used. *MYCN* amplification was analysed using LSI N-MYC(2p24)/CEP2 DNA probe in 53/54 (98 %) of the archived samples, and in 7/7 (100 %) of the samples from new patients. 1p deletion and triploid karyotype were analysed by ON 1q21/SRD1p36 DNA probe in 46/48 (96 %) of samples without *MYCN* amplification, or in 46/61 (75 %) of all samples. 11q deletion was analysed using LSI MLL DNA probe in 26/31 (81 %) of diploid tumors, or in 26/61 (43 %) of all samples.

MYCN amplification was found in 12/61 (19,7 %) of the analysed samples. 1p deletion was analysed only in samples without *MYCN* amplification and found in 6/48 (12,5 %) of the samples, while the triploid karyotype was found in 14/48 (29,2 %) of the samples. The diploid samples were further analysed for loss of heterozygosity (11q23 deletion), which was determined in 16/32 (50 %) of the samples. Structural chromosome changes were found in 22/32 (69 %) of the diploid samples. Our results are consistent with already published data.

Survival was analysed for 60 patients. The longest survival was found in patients without chromosomal changes and diploid tumors, and in those with triploid karyotype. The survival was shortest in patients with 1p deletion and, as expected, with *MYCN* amplification.

Key words: neuroblastoma, clinically significant chromosome rearrangements, archived paraffin sections, fluorescence *in situ* hybridization, DNA probe.

1 UVOD

1.1 NEVROBLASTOM

Nevroblastom je genetsko in klinično heterogena maligna novotvorba, ki se pojavlja v otroštvu. Letna incidenca je 1 na 100,000 otrok mlajših od 15 let. Najvišja incidenca je v starosti 0-5 let. Predstavlja 8-10 % vseh malignih rakavih obolenj v otroštvu. Okoli 90 % otrok zboli v prvih 5-ih letih življenja (1,2).

Nevroblastom je maligni tumor, ki vznikne iz matičnih celic simpatičnega živčnega sistema. Izhaja iz primitivnega nevralnega grebena. Tumor se lahko pojavi kjerkoli ob poteku struktur simpatičnega živčnega sistema. Pri 70 % bolnikov se pojavi v trebuhu, pri 25 % na vratu ali v prsnem košu ter pri 5 % v medenici. Zaseva lahko limfogeno v področne bezgavke ali hematogeno, najpogosteje v kostni mozeg, kosti, redkeje v kožo, jetra, pljuča (1,2,8).

Klinični znaki bolezni so odvisni od lokacije tumorja in od prisotnosti morebitnih metastaz. Pri lokalizaciji v trebuhu ga spremljajo trebušne bolečine, prebavne motnje in povečan obseg trebuha. Pri lokalizaciji v prsnem košu lahko povzroča oteženo požiranje in težave pri dihanju. Tumor, ki pritiska na hrbtenjačo, lahko povzroči mišično oslabelost in posledično nezmožnost, da otrok sam stoji, se plazi ali hodi. Zasevki v kosteh povzročajo bolečine in šepanje. Za nevroblastom so značilni zasevki v kosteh orbite, ki lahko povzročijo nastanek očalnega hematoma in otekline. Infiltracija tumorja v kostni mozeg lahko povzroči bledico in anemijo. Pojavi se lahko tudi paraneoplastična vročina in hipertenzija, ki je posledica tvorbe in nereguliranega izločanja kateholaminov (3).

Bolezen je glede na potek zelo heterogena, od spontane remisije brez terapevtskih posegov, do hitrega napredovanja in smrtjo kljub zdravljenju z agresivno kemoterapijo. Klinični izid je kljub temu predvidljiv, glede na prisotnost metastaz (stadij M), starost bolnika ob postavitvi diagnoze, histopatoloških značilnosti tumorja in prisotnosti ali odsotnosti več genetskih sprememb, kot so amplifikacija *MYCN*, delecija 11q in ploidnost tumorja (1,2).

Bolniki stari več kot 1,5 leta ob postavitvi diagnoze imajo precej slabši izid kot dojenčki. Prisotnost metastaz pomeni slabo napoved ne glede na starost bolnika. Posebna podskupina bolnikov mlajših od 18 mesecev z metastazami v jetrih, koži ali kostnem mozgu, ne glede na slabo napoved (stadij Ms) lahko preide v spontano remisijo. Pri mlajših otrocih lahko tumor spontano dozori v benigni ganglionevrom. Pri starejših otrocih je potek ponavadi agresiven in hiter (2).

1.1.1 Mednarodni sistem razvrščanja nevroblastoma - INSS (International Neuroblastoma Staging System)

Obstajata dva sistema razvrščanja nevroblastomov v stadije. INSS (International Neuroblastoma Staging System), ki je bil objavljen leta 1986 in INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System), ki je bil objavljen leta 2005 (3, 4).

Stadiji mednarodnega sistema razvrščanja nevroblastomov (INSS stadiji):

- **Stadij 1:** Lokaliziran tumor, ki ga lahko v celoti kirurško odstranimo.
- **Stadij 2:** 2A: Lokaliziran tumor, ki ga kirurško ne moremo v celoti odstraniti, ne vključuje bezgavke, 2B: Lokaliziran tumor, ki ga lahko kirurško odstranimo v celoti ali delno in vključuje ipsilateralne neadherentne bezgavke.
- **Stadij 3:** Kirurško neizrekljiv tumor, ki s širjenjem sega preko mediane in lahko vključuje tudi kontralateralne bezgavke.
- **Stadij 4:** Vsak primaren tumor z metastazami v oddaljenih bezgavkah, kosteh, kostnem mozgu, jetrih in drugih organih.
- **Stadij 4S:** Lokaliziran primarni tumor (stadij 1, 2A ali 2B), ki je z razširjenjem omejen le na kožo, jetra in kostni mozeg, in je značilen za otroke mlajše od enega leta (3).

INSS temelji predvsem na uspešnosti kirurške odstranitve tumorja. Zaradi razlik v razvrščanju nevroblastomov v stadije se je pojavila potreba po novi klasifikaciji. Mednarodni sistem razvrščanja nevroblastomov v stadije z upoštevanjem faktorjev tveganja (INRGSS) je bil razvit, da bi bil pristop k razvrščanju in zdravljenju nevroblastomov bolj enoten. Razvrščanje v INGRSS temelji na kliničnih kriterijih, genetskih spremembah (amplifikacija *MYCN*, delecija 11q23, ploidnost tumorja) in faktorjih tveganja (IDRF-Image Defined Risk Factors) (4, 6).

1.1.2 Mednarodni sistem razvrščanja nevroblastomov z upoštevanjem faktorjev tveganja-INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System)

Razvrščanja nevroblastomov v stadije z upoštevanjem faktorjev tveganja (INRGSS):

- **Stadij L1:** Lokaliziran tumor, ki ne vključuje opredeljenih dejavnikov tveganja (IDRF-Image Defined Risk Factors). IDRF so faktorji tveganja pri nevroblastomu pridobljeni z različnimi slikovnimi tehnikami pred kirurško odstranitvijo in drugimi terapijami. Od slikovnih tehnik se uporablja ultrazvok, računalniška tomografija, scintigrafija telesa z J-¹³¹ meta-jod benzilgvanidinom in rentgen. IDRF opisujejo anatomsko lokacijo in razširjenost tumorja. Namen je predvsem bolj prirejeno zdravljenje z ozirom na dejavnike tveganja. V skupini z nizkim tveganjem se zdravljenje zmanjša, v skupini z visokim tveganjem pa zdravljenje poteka bolj intenzivno (5, 6).
- **Stadij L2:** Lokalizirani tumor ob prisotnosti enega ali več opredeljenih dejavnikov tveganja.
- **Stadij M:** Daljnja metastatskega bolezen.
- **Stadij Ms:** Metastatska bolezen omejena na kožo, jetra in kostni mozeg, značilna za bolnike mlajše od 18 mesecev (4).

1.1.3 Zdravljenje

Pri lokalizirani bolezni z ugodnimi napovednimi kazalci zadostuje le operativno zdravljenje. Pri razširjeni ali napovedno neugodni bolezni pa je potrebno intenzivno zdravljenje s kemoterapijo, avtologno presaditvijo krvotvornih matičnih celic, operacijo, obsevanjem in vzdrževalnim zdravljenjem s 13-cis-retinoično kislino. Pri bolnikih starih manj kot 18 mesecev z ugodnimi genetskimi značilnostmi tumorja (stadij Ms), pa tumor lahko spontano regredira in je minimalno zdravljenje potrebno le v primeru kliničnih težav (7).

1.2 GENETIKA NEVROBLASTOMA

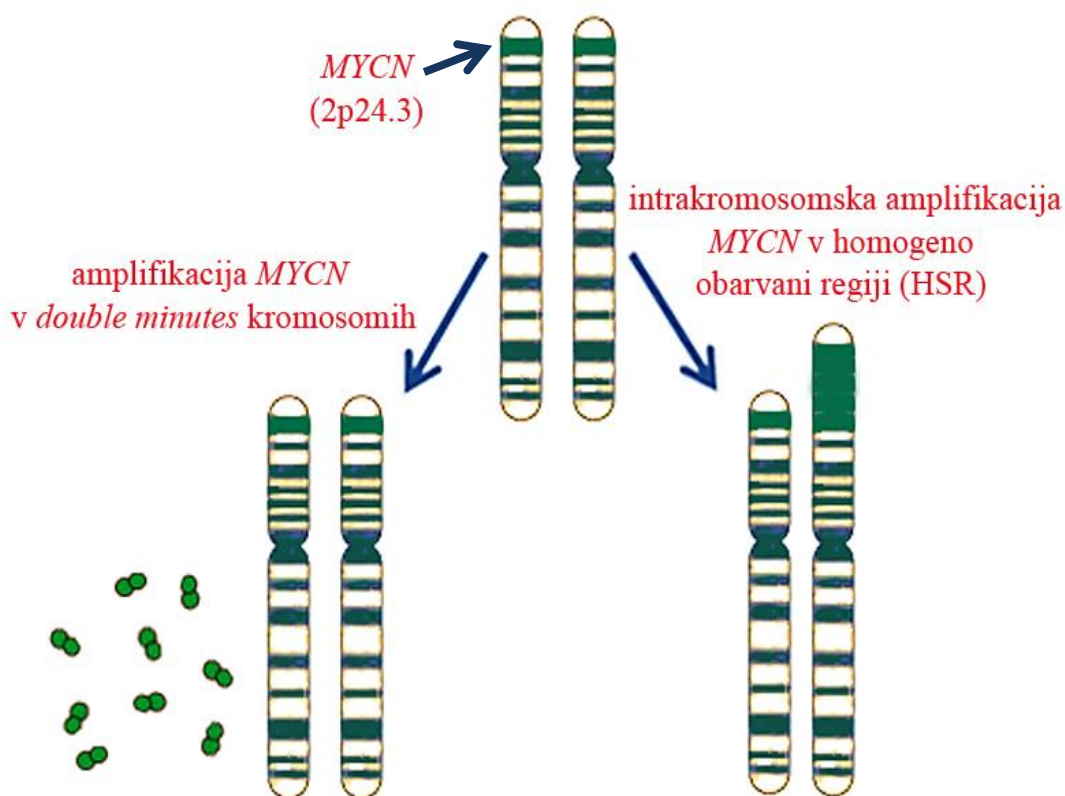
1.2.1 Amplifikacija MYCN

N-MYC je protoonkogeni protein, ki se nahaja v jedru celice in je pomemben transkripcijski faktor. Na DNA se veže v dimerizirani obliki skupaj s proteinom max (myc-associated factor X). V normalnih celicah se gen izraža samo v fazi S celičnega ciklusa. V rakastih celicah pa je njegovo izražanje stalno, kar vodi celico v ponovno delitev (7, 8).

Gen *MYCN* je član družine MYC (*C-myc*, *N-myc*, *L-myc*). Gen *MYCN* nosi zapis za jedrni fosfoprotein z osnovno DNA-vezno domeno vijačnica-zanka-vijačnica (bHLH). Amplifikacija tega gena je povezana s številnimi tumorji. Najdemo jo predvsem pri nevroblastomu, lahko pa tudi pri pljučnem raku, retinoblastomu, Wilmsovem tumorju (1, 5, 7, 9).

Gen *MYCN* se nahaja na drugem kromosomu na področju 2p24.3. Amplifikacijo gena *MYCN* lahko opazimo intrakromosomsko kot homogeno obarvano regijo (HSR), lahko pa jo najdemo izvenkromosomsko v obliki *double minutes* kromosomov (dmin). *Double minutes* so majhni okrogli fragmenti DNA, ki vsebujejo onkogene, nimajo pa centromere in telomere (Slika 1) (2, 3).

HSR lahko najdemo tudi na drugem kromosomu in ne le na področju p24 kromosoma 2, kjer se nahaja normalna kopija gena *MYCN*. Tudi izvenkromosomska DNA (*double minutes*) se lahko vgradi v drug kromosom (1,3).



Slika 1: Intrakromosomska in ekstrakromosomska amplifikacija *MYCN* (10).

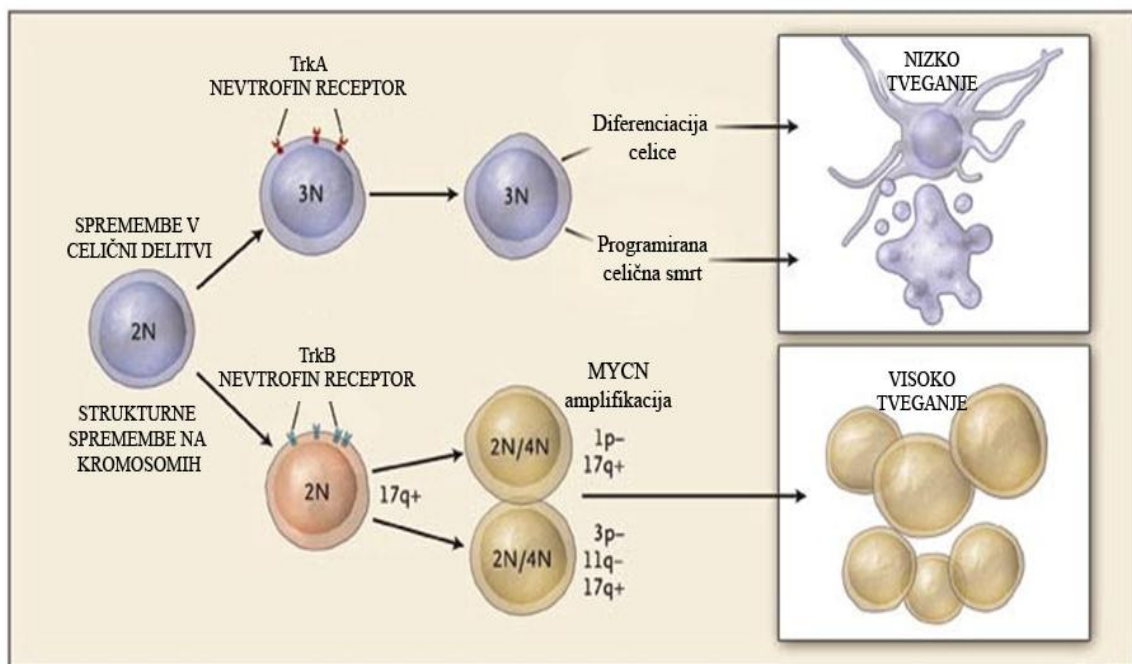
V tumorskih celicah s pomočjo FISH analize lahko vidimo od 5 do 500 kratno pomnožitev gena *MYCN*, običajno pa okoli 50-100 kratno (1). Genomsko pomnoževanje gena *MYCN* je močan in neodvisen napovedni dejavnik za krajše preživetje bolnika. Študije so pokazale statistično značilno povezavo med amplifikacijo gena *MYCN* in stadijem bolezni. Pri stadiju 4 (stadij M) in stadiju 3 je amplifikacija *MYCN* veliko pogostejša kot pri ostalih stadijih. Pri bolnikih brez amplifikacije *MYCN* je petletno preživetje 60 %. Samo 10 % bolnikov, pri katerih je bila najdena amplifikacija *MYCN* z več kot 10 kopijami, pa je preživel eno leto (1).

Amplifikacija *MYCN* ima izrazito neugoden napovedni pomen, vendar je klinično in biološko obnašanje tumorja še vedno nejasno. Zato iščejo povezave tudi z drugimi dejavniki, kakršen je Trk. Trk je družina nevrofinih receptorjev (NTRF), ki ima ključno vlogo pri razvoju in vzdrževanju centralnega in perifernega živčnega sistema. Trk nevrofini receptorji vplivajo na stopnjo tveganja pri nevroblastomu. Tumorji, ki izražajo Trk A, so biološko ugodni in nagnjeni k spontani regresiji in diferenciaciji. Tumorji z

amplifikacijo *MYCN* pogosto izražajo Trk B nevrofine receptorje. Bolezen poteka v zelo agresivni obliki in pogosto s smrtnim izidom (11, 12, 13).

Študija o povezavi med amplifikacijo *MYCN* in izražanjem Trk A nevrofinega receptorja, ki ima ugoden napovedni pomen (11), je pokazala, da lahko razdelimo tumorje z amplifikacijo *MYCN* v tri skupine:

- visoko izražanje gena *MYCN* in nizko izražanje Trk A nevrofinih receptorjev (petletno preživetje pri 9,3 % bolnikov)
- nizko izražanje gena *MYCN* in Trk A nevrofin receptorjev (petletno preživetje pri 63 % bolnikov)
- visoko izražanje gena *MYCN* in Trk A nevrofin receptorjev (petletno preživetje pri 88 % bolnikov) (Slika 2).



Slika 2: Razvoj podskupin nevroblastoma glede na kromosomske preureditve in ploidnost (13).

1.2.2 Ponavljajoče kromosomske spremembe pri nevroblastomu

Številna ponavljajoča genomska neravnovesja, vključno z izgubo heterozigotnosti (LOH) na kromosomskih področjih 1p, 3p, 11q in pomnožitvijo 1q in 17q so povezani s slabo napovedjo poteka bolezni. Tumorji z LOH 11q imajo redko amplifikacijo *MYCN* in so neodvisno povezani s slabo napovedjo preživetja bolnika. Delecije krajšega kraka kromosoma 1 so najpogostejše opažene kromosomske spremembe pri malignih obolenjih. Novo najmanjše področje na kromosomu 1, ki je skladno z delecijo pri nevroblastomih, se nahaja med markerji D1S2795 in D1S253. En ali več genov, ki so vključeni v tumorigenezo in napredovanje bolezni se verjetno nahajajo na tem področju. Delecija na kromosomskem področju 1p je večkrat opažena pri tumorjih z amplifikacijo *MYCN*. Tumorji z LOH 11q so pogosto povezani tudi z izgubo materiala na kromosomskem področju 3p. Pri tumorjih z LOH 11q pogosto opazamo tudi izgubo kromosomskega materiala na 4p in pomnožitvijo na 7q (14). Bolniki z LOH 11q in delecijo na 3p imajo višjo srednjo starost ob postavitvi diagnoze kot bolniki z amplifikacijo *MYCN* (14, 15).

Približno 70 do 80 % vseh metastatskih tumorjev (stadij 4) nima amplifikacije *MYCN* ali izgube heterozigotnosti na 11q. Ti tvorijo veliko genetsko heterogeno skupino tumorjev, pri katerih najdemo številne dodatne ponavljajoče kromosomske spremembe: delecijo 4p, 9p, 14q in pomnožitev 1q, 7q, 2p in 11p. Poleg pomnožitve in izgube kromosomskega materiala se pojavljajo tudi številna kromosomska neravnovesja (16). Prisotnost kakršnega koli osamljenega kromosomskega neravnovesja pomeni slabo napoved poteka bolezni (Slika 2) (2, 3, 11, 17).

1.2.3 Ploidnost

Nevroblastome lahko razdelimo v dve glavni skupini glede na ploidnost tumorskih celic: na triploidno skupino (triploidi, pentaploidni tumorji) in diploidno skupino (diploidni, tetraploidi tumorji). Skupina triploidnih tumorjev se pojavlja pri približno 55 % bolnikov, skupina diploidnih tumorjev pa pri približno 45 %. Tumorji omejeni na eno lokacijo so običajno triploidni in imajo boljšo napoved, diploidnost pa je pogosta pri napredovanju tumorja (2, 3).

Triploidni tumorji z izgubo ali pridobitvijo celotnih kromosomov imajo boljšo napoved še zlasti, če je bolnik mlajši od 18 mesecev. Amplifikacijo *MYCN* in pomnožitev 17q zelo redko najdemo pri triploidnih tumorjih (Slika 2) (2, 3, 10).

1.3 Fluorescenčna »in situ« hibridizacija

Fluorescenčna »in situ« hibridizacija (FISH) je molekularno citogenetska preiskava, s katero iščemo ali dokazujemo točno določene kromosomske preureditve ter pridobitve ali izgube kromosomskega področja ali celotnega kromosoma. Vzoreci za FISH preiskavo so lahko aspirati, različna tkiva, sperma ali oplojena jajčeca.

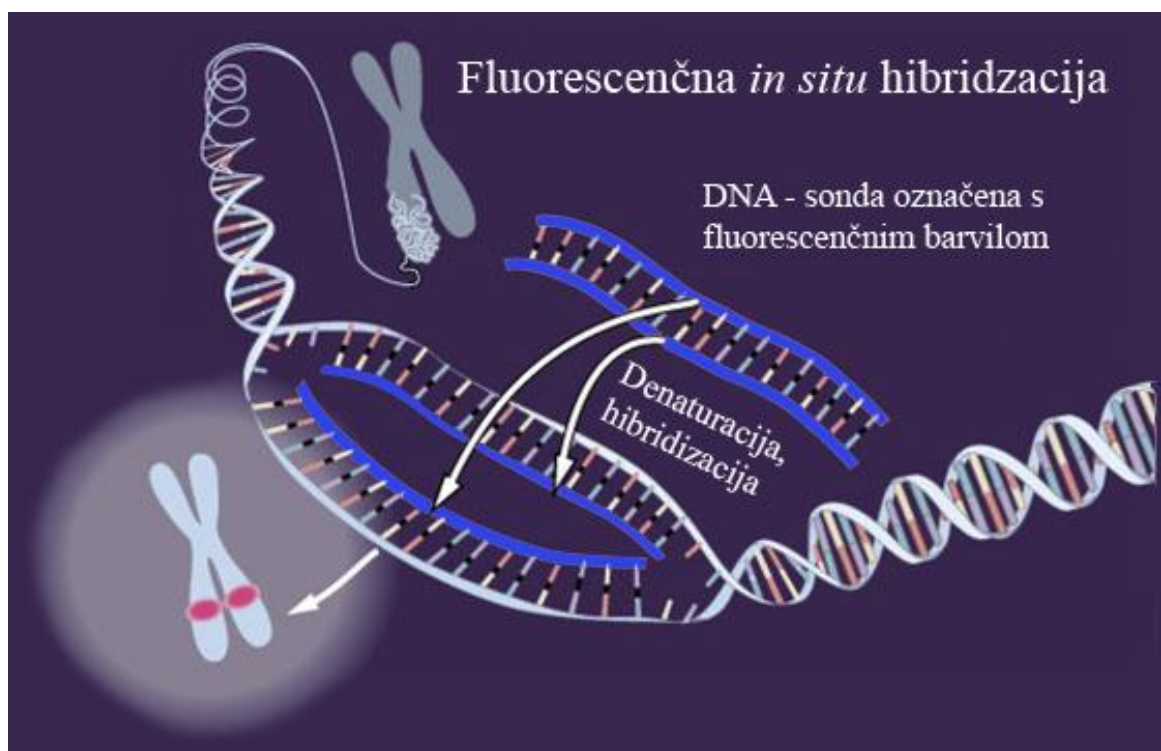
Na osnovi poznavanja iskanega gena oziroma zaporedja v genu lahko ustvarimo komplementarno zaporedje DNA. Tako sintetizirano DNA imenujemo sonda. Tarčna molekula je DNA v jedru preiskovane celice, ta pa je pritrjena na predmetno mikroskopsko steklo. S tako pritrjeno DNA hibridizira enoverižna komplementarna DNA-sonda. Nukleotidi sonde so označeni s fluorescentnim barvilom, kar omogoči kasnejšo oceno označenih celic s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa (Slika 3) (19).

Standardni FISH protokol lahko opišemo v šestih korakih, vsak korak je pomemben za uspešno izvedeno analizo.

1. Priprava vzorca.
2. Priprava in označevanje sonde.
3. Denaturacija sonde in vzorca.
4. Hibridizacija sonde na vzorec.
5. Spiranje po hibridizaciji.
6. Detekcija.

FISH lahko izvedemo pri celic različnih bioloških vzorcev in vsak zahteva specifično predpripravo. Vzorec moramo fiksirati na stekelce in ga obdelati s proteolitičnimi encimi (proteinaza K, pepsin), da naredimo nukleinske kisline v jedru celice dostopne za sondo. Proteolitični encimi razgradijo gradnike celičnega jedra in citoplazmo celice. Sledi spiranje s pufrom (2xSSC), ki odstrani razgrajene celične strukture. Vzorec nato fiksiramo s pomočjo formaldehida, s čimer preprečimo kasnejšo izgubo celic s stekelca. Sledi

denaturacija, ki jo dosežemo s kemično obdelavo ali s segrevanjem nad temperaturo taljenja dvojne vijačnice DNA. Običajno je temperatura taljenja vijačnice DNA previsoka in čas inkubacije predolg za uspešno kasnejšo hibridizacijo. Pomagamo si z organskim topilom, navadno formamidom. Formamid ima funkcijo destabilizacije dvojne vijačnice DNA, kar zniža temperaturo taljenja. Sledi hibridizacija sonde na vzorec. Hibridizacija je odvisna od koncentracije sonde in temperature, navadno poteka pri 37 °C. Po hibridizaciji sledi spiranje s pufri. Pred mikroskopsko analizo nanesemo DAPI (4', 6'-diamidino-2-fenil-indol), ki se veže na kromatin in emitira modro svetlobo. Tako postanejo jedra celic vidna pod fluorescenčnim mikroskopom, s pomočjo katerega analiziramo vzorce (Slika 3) (19).



Slika 3: Fluorescenčna *in situ* hibridizacija (20).

1.3.1 FISH na tkivih fiksiranih v formalinu in tkivih vklopljenih v parafin

FISH na arhivskih rezinah tumorjev vklopljenih v parafin in fiksiranih v formalin ima v diagnostiki vse večji pomen. S pomočjo FISH lahko določimo specifične genetske značilnosti na eni sami celici. Analizo lahko izvedemo na interfaznih ali metafaznih jedrih.

Bistvo FISH na arhivskih rezinah tumorjev je, da analizo lahko opravimo na celicah, katerih izvorno tkivo ni več dostopno. Z analizo arhivskih vzorcev dobimo dostop do velikega števila vzorcev, ki ga s sprotno diagnostiko ne moremo doseči v kratkem času, kar je še zlasti pomembno za genetske študije (19).

Pri analizi arhivskih vzorcev pa se pojavijo številni problemi zaradi samega vzorca in izvedbe metode. Težavno je vstopanje sonde v jedro tumorske celice, dodatne težave povzroča avtofluorescenca starega tkiva, prekrivanje celic, poškodovana jedra in znižana učinkovitost hibridizacije zaradi dolge fiksacije v formalinu (19).

FISH postopek na tkivih fiksiranih v formalinu in tkivih vklopljenih v parafin se od prej omenjenega FISH postopka (Poglavje 1.3) razlikuje:

1. Vzorce tkiv fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin je potrebno predhodno deparafinizirati (ksilol ali komercialno pripravljene raztopine).

2. Predpriprava vzorcev:

a) Obdelava vzorcev z 0,2 M HCl. Kislina delno odstrani histonske proteine iz molekule DNA.

b) Obdelava vzorcev z NaSCN, ki jo je prvi opisal Hopman s sodelavci leta 1991 (19). NaSCN raztopljen v vodi denaturira makromolekule vzorca. Topilo destabilizira kompleks proteinov, aminokislin in polisaharidov.

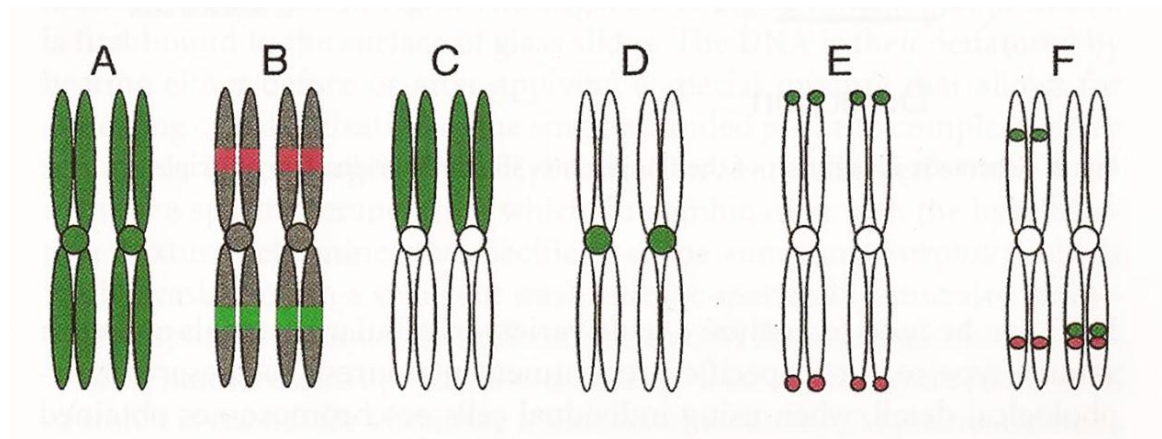
3. Obdelava tkiv fiksiranih v formalin s proteolitičnimi encimi (pepsin) je daljša in koncentracija encima višja kot pri FISH na predhodno gojenih celicah.

Denaturacija, hibridizacija in detekcija potekajo po prej opisanem standardnem FISH protokolu (19).

1.4 DNA-sonde

Za FISH uporabljamo različne DNA-sonde. DNA-sonde med seboj ločimo glede na velikost, glede na področje kromosoma, kamor hibridizira in glede na to, s čim je sonda označena. Sonda lahko obarva celoten kromosom (WCP-Whole Chromosome Painting probe) ali le specifičen del kromosoma oziroma posamezne gene (CEP-centromerna sonda, TEL-telomerna sonda, LSI-lokus specifična sonda). DNA-sondo lahko uporabljamo na

metafaznih ali interfaznih jedrih celic. Lahko je označena s pomočjo radioaktivnega izotopa ali fluorokroma. Fluorokromi so barvila, ki absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine, oddajo pa svetlobo večje valovne dolžine. V citogenetiki so najbolj uporabljeni fluorokromi fluorescein izotiocianat (FITC), rodamin in Texas Red (Slika 4) (19).



Slika 4: DNA-sonde (19)

Legenda:

- A. WCP (sonda za obarvanje celotnega kromosoma)
- B. CGH (primerjalna genomska hibridizacija)
- C. sonda specifična za p ali q krak kromosoma
- D. CEP (centromerna sonda)
- E. TEL (telomerna ali subtelomerna sonda)
- F. LSI (lokus specifična sonda).

2 NAMEN DELA

Uvedli bomo FISH na arhivskih parafinskih rezinah tumorjev bolnikov z nevroblastomom in jo preizkusili na diagnostičnih vzorcih novih bolnikov. Preiskavo bomo izvedli s komercialno dostopnimi specifičnimi DNA-sondami. Ugotavljali bomo pogostost klinično pomembnih citogenetskih sprememb (amplifikacijo *MYCN*, delecijo 1p, delecijo 11q23, ploidnost tumorjev) in njihovo povezavo s preživetjem bolnikov.

Preiskavo bomo opravili na arhivskih parafinskih rezinah tumorjev zato pričakujemo nekaj težav zaradi dolgotrajnega hranjenja vzorcev. Pri sami optimizaciji postopka pričakujemo največ težav v fazi obdelave vzorca s proteolitičnim encimom (pepsin). Jedra vzorca tumorja moramo narediti čim bolj dostopna za DNA-sondo. Glede na prisotnost vezivnega tkiva, fibrinskih vlaken in različno gostoto celic pričakujemo, da bo potrebno čas pepsinizacije prilagajati posameznemu vzorcu.

Po optimizaciji postopka in izvedbi FISH na vseh vzorcih bomo statistično ovrednotili vpliv ugotovljenih citogenetskih sprememb na preživetje bolnikov. S pomočjo statističnega paketa IBM SPSS (IBM SPSS Statistics v19) bomo izračunali krivulje preživetja po Kaplan Meierju. Primerjali bomo krivulje preživetja bolnikov s posameznimi citogenetskimi spremembami ter bolnikov z amplifikacijo *MYCN* in brez nje. Glede na podatke v literaturi pričakujemo slabše preživetje pri bolnikih z amplifikacijo *MYCN*, zato bomo najprej na vseh vzorcih opravili analizo z DNA-sondo specifično za ta gen. Na negativnih vzorcih bomo nadaljevali preiskavo z DNA-sondo specifično za določitev LOH 1p in DNA-sondo specifično za določitev LOH 11q. Glede na podatke v literaturi pričakujemo slabše preživetje pri bolnikih z delecijo 1p in delecijo 11q23. S pomočjo DNA-sonde specifične za dolgi in kratki krak kromosoma 1 bomo določili tudi ploidnost, ki prav tako vpliva na potek bolezni. Pri tumorjih, ki imajo triploidni kariotip, bolezen napreduje počasneje in poteka v manj agresivni obliki.

Cilji našega dela so:

- uvedli bomo FISH na arhivskih vzorcih parafinskih rezin tumorjev in jo preizkusili na svežih vzorcih.
- primerjali bomo postopek s komercialno pripravljenimi kompleti in raztopinami, ki jih bomo pripravili sami.

- določili bomo odstotek pojavnosti posameznih kromosomskih preureditev in jih primerjali s podatki v literaturi.
- izvedli bomo analizo preživetja bolnikov glede na posamezne kromosomske spremembe in ploidnost.

3 MATERIALI IN METODE

Prirava histoloških preparatov:

Vzorci parafinskih rezin tumorjev smo dobili že pripravljene iz laboratorija za patologijo Otroške bolnišnice Zagreb. Tkiva so bila nanešena na objektna predmetna stekla in 2 h sušena na 56 °C. Vzorci tumorskih tkiv so bili arhivski preparati vzorcev, odvzetih med leti 1989 do 2008 (54 vzorcev) in sveži vzorci tumorskih tkiv iz let 2012 in 2013, ki so prispeli v Specializiran hematološki laboratorij za redno diagnostično obravnavo (7 vzorcev) (Priloga 1).

3.1 MATERIALI ZA IZVEDBO FISH

Tabela I: Seznam uporabljenih materialov za izvedbo FISH.

Material	Proizvajalec
LSI/WCP-hibridizacijski pufer	Abbot Molecular
NaOH	Sigma Aldrich
HCl	Sigma Aldrich
MgCl ₂	Kemika
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ X 2H ₂ O	Kemika
Pepsin, 3,200–4,500 U/mg proteina	Sigma-Aldrich
Formaldehid, 37 %	Sigma-Aldrich
NaSCN	Fluka
Tween 20	Sigma-Aldrich
Kemex A	Kemika
DAPI II Counterstain	Abbot Molecular
Gumijasti cement Fixogum	Marabuwerke GmbH & Co.
NP-40	BDH Chemicals
Formamid	Sigma
Redestilirana voda	Lekarna UKC Ljubljana
NaCl	Kemika
KCl	Kemika
KH ₂ PO ₄	Kemika
Na ₂ HPO ₄ X2H ₂ O	Kemika
UltraClear™ clearing reagent	J.T. Baker

3.1.1 Priprava raztopin za FISH

1 M MgCl_2 : v 1 L destilirane vode smo zatehtali 203.31 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$.

1M NaOH: 20 g NaOH smo ratopili v 500 mL destilirane vode.

1 M HCl: 4.24 mL koncentrirane HCl (36 %) smo odpipetirali v 50 mL bučko z nekaj destilirane vode in dopolnili do oznake z destilirano vodo.

1 M NaSCN: v bučko smo zatehtali 8,11 g NaSCN in dopolnili do 100 mL z destilirano vodo ter prefiltrirali preko sterilnega filtra v sterilno reagenčno steklenico.

0,2 M HCl: 15 mL 1 M HCl vlijemo v merilni valj in dodamo 60 mL 1xPBS

20xSSC, pH=6.3: 175,3 g NaCl in 88,2 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ smo raztopili v 850 mL destilirane vode, pH vrednost smo z 1 M HCl uravnali na 6,3 in prefiltrirali preko sterilnega filtra v sterilno reagenčno steklenico. Raztopino smo hranili pri sobni temperaturi in zavrgli po šestih mesecih ali prej, če je postala raztopina motna.

2xSSC: K 100 mL 20xSSC (pH=6.3) smo dodali 850 mL destilirane vode. Uravnali pH vrednost na 7.0 ± 0.2 z 1 M NaOH in dopolnili z destilirano vodo do 1000 mL. Raztopino smo hranili v hladilniku največ 2 tedna.

10xPBS, pH=7,4: v 900 mL destilirane vode smo raztopili 80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4 , 14.41 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, (11.5 g Na_2HPO_4) . Uravnali smo pH vrednost na 7.4, dopolnili z destilirano vodo do oznake in prefiltrirali preko sterilnega filtra v sterilno reagenčno steklenico.

1xPBS, pH = 7,4: 100 ml 10xPBS smo zlili v 1000 mL bučo, dopolnili z destilirano vodo do 1000 mL in uravnali pH vrednost na 7,4.

Raztopina pepsina (0.05 %): V bučko smo odpipetirali 2 mL 1 M HCl in 2 mL koncentrirane raztopine pepsina in dopolnili z destilirano vodo do 100 mL.

Raztopina formaldehida (5 mM MgCl₂, 1 % formaldehid): V bučko smo odpipetirali 5 mL 1 M MgCl₂, 2.5 mL 37 % formaldehida dopolnili do 100 ml s 2xSSC in prelili v kiveto za objektna stekla.

Spiralna raztopina po hibridizaciji NP-40: V reagenčno steklenico smo pripravili 0.9 g detergenta NP-40, 60 mL 20xSSC (pH=6.3) in 240 mL destilirane vode. Raztopino smo pustili stati čez noč, da se je detergent zanesljivo raztopil, nato smo jo prefiltrirali preko sterilnega filtra v sterilno reagenčno steklenico. Hranili smo v hladilniku in zavrgli takoj, ko se je pojavila motna usedlina.

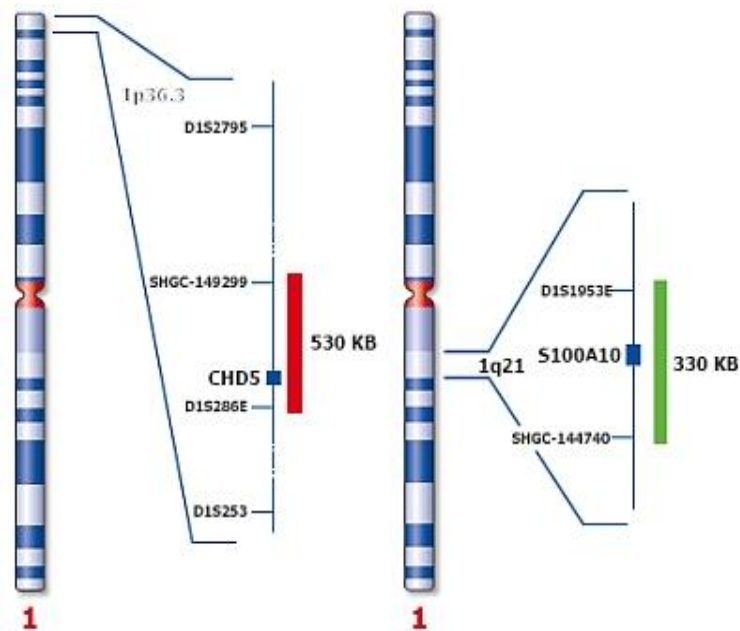
PBT: V 500 mL bučko smo pripravili 2 mL BSA (6 % raztopina), 0.5 mL Tweena 20 ter dopolnili do oznake z 1xPBS pufrom. Raztopino smo pustili stati čez noč, da se je detergent zanesljivo raztopil, nato smo jo prefiltrirali preko sterilnega filtra v sterilno reagenčno steklenico.

3.1.2 DNA-sonde, uporabljene za FISH

a) ON 1q21/SRD1p36 (Kreatech. Poseidon DNA Probes)

DNA-sonda 1q21 je optimizirana za zaznavanje števila kopij na daljšem kraku kromosoma 1 na področju 1q21. Neposredno je označena s fluorescentnim barvilom Platinum Bright 495. Velikost sonde je 330 kb in emitira zeleno svetlobo. DNA-sonda SRD 1p36 je optimizirana za zaznavanje števila kopij na krajšem kraku kromosoma 1 na področju 1p36. Neposredno je označena s fluorescentnim barvilom Platinum Bright 550. Velikost sonde je 530 kb in emitira rdečo svetlobo (Slika 5) (21).

V normalni celici vidimo dva zelena in dva oranžna signala. Pri amplifikaciji 1q vidimo pomnožene zelene signale in dva oranžna signala, pri deleciji 1p vidimo en oranžen in dva zelena signala (Tabela II) (21).



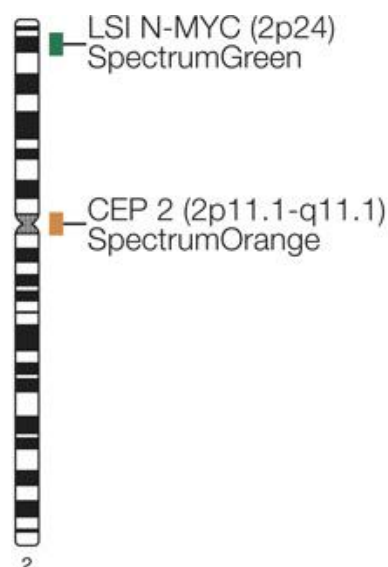
Slika 5: Področje vezave DNA-sonde ON 1q21/SRD1p36 (Kreatech) (21).

b) LSI N-MYC(2p24)/CEP2 (Vysis, Abbott)

DNA-sonda LSI N-MYC(2p24)/CEP2 je optimizirana za zaznavanje števila kopij gena *MYCN* na kratkem kraku kromosoma 2 na področju 2p24.

Z zelenim barvilom (Spectrum Green, FITC-fluorescein izotiocianat) je označen gen *MYCN* na kratkem kraku kromosoma 2 na področju 2p24. Njegova velikosti je približno 200 kb. Z oranžnim barvilom (Spectrum Orange, Cy3™) je označena centromerna regija kromosoma 2 (2p11.1-q11.1) (Slika 6).

Pri normalni celici vidimo dva zelena in dva oranžna signala. Pri amplifikaciji gena *MYCN* pa vidimo dva oranžna signala in pomnožene zelene signale (8 ali več zelenih signalov) (Tabela II) (22).

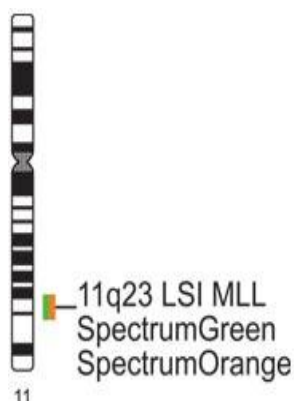


Slika 6: Področje vezave DNA-sonde LSI N-MYC(2p24)/CEP2 (Vysis, Abbott) (22).

c) LSI MLL (Vysis, Abbott)

DNA-sonda LSI MLL označuje gen *MLL* na daljšem kraku kromosoma 11 na področju 11q23. Sonda je označena s fluorescentnim barvilom, ki emitira zeleno svetlobo (Spectrum Green, FITC-fluorescein izotiocianat) v velikosti približno 350 kb in fluorescentnim barvilom, ki emitira oranžno svetlobo, v velikosti približno 190 kb (Spectrum Orange, Cy3™) (Slika 7) (22).

Pri normalni celici dobimo dva fuzirana rumena signala. LOH 11q vidimo kot en fuziran rumen signal, trisomijo 11, kot tri fuzirane rumene signale (Tabela II) (22).



Slika 7: Področje vezave DNA-sonde LSI MLL (Vysis, Abbott) (22).

Tabela II: Pričakovani signali za uporabljene DNA-sonde.

	Normalen vzorec signalov	Amplifikacija	Delecija (LOH)	Ploidnost (3n)
ON 1q21/SRD1p36	2R2Z	2R, ≥3Z	1R2Z	3R,3Z
LSI N-MYC(2p24)/CEP2	2R2Z	2O, ≥8Z ali >2O, >(4xO)Z		
LSI MLL	2F		1F	3F

3.2 APARATURE

Tabela III: Seznam uporabljenih aparaturn za izvedbo FISH metode.

Aparatura	Proizvajalec
Hibridizator ThermoBriteTM	StatSpin, Abbot Molecular
Komora z laminarnim pretokom zraka LFVP-12	Iskra PIO
MiniSpin centrifuga	Eppendorf
pH-meter SevenEasy	Mettler Toledo
Tehtnica AX 304	Mettler Toledo
Fluorescenčni mikroskop Olympus BX41	Olympus Optical Co.
Vodna kopel TW8	Julabo
Števec za štetje celic	

3.3 PREDPRIPRAVA STEKEL Z VZORCEM IN FISH METODA

Postopek za predpripravo vzorca parafinskih rezin tumorja fiksiranega na stekelu in FISH metodo na arhivskih tkivih vklopljenih v parafin smo črpali iz literature (19) in navodil proizvajalcev že pripravljenih kompletov za obdelavo vzorcev (21).

Vse raztopine smo pripravili po prej opisanih protokolih (Poglavje 3.1.1). Raztopine smo nalili v kadičke z zarezi in vanje naložili stekla z vzorcem za čas, določen v protokolu za izvedbo FISH.

a) Deparafinizacija stekel

Ultra clear, 10 min, sobna temperatura

Ultra clear, 10 min, sobna temperatura

Ultra clear, 10 min, sobna temperatura

b) Rehidracija stekel

100 % EtOH 3 min, sobna temperatura

85 % EtOH 3 min, sobna temperatura

70 % EtOH 3 min, sobna temperatura

b) Predpriprava stekel

0,2 M HCl, 20 min

Destilirana voda 3 min

1 M NaSCN, 80 °C, 30 min

Destilirana voda, 1 min

2x SSC, 2 min

2x SSC, 2 min

c) Pepsinizacija

2x SSC, 10 min (37 °C)

pepsin (0,05 %), 20 min* (37 °C)

Destilirana voda, 1 min

2x SSC, 5 min

2x SSC, 5 min

2x SSC, 5 min

*Po 20 minutni pepsinizaciji smo spirali stekla s spiralnimi pufri (PBT in NP40), dehidrirali z raztopinami etanola naraščajoče koncentracije in nanegli 10 µL DAPI ter pod fluorescenčnim mikroskopom preverili uspešnost pepsinizacije. Če časa pepsinizacije ni bilo potrebno podaljšati, smo spirali stekla z vzorcem s SSC pufri in nadaljevali postopek z dehidracijo. Vzorce, kjer smo pepsinizacijo podaljšali, smo najprej spirali s SSC pufri, nato ponovili točko c) in nadaljevali z dehidracijo vzorcev.

d) Dehidracija

70 % EtOH 3 min, sobna temperatura

85 % EtOH 3 min, sobna temperatura

100 % EtOH 3 min, sobna temperatura

e) Nanos DNA-sonde

Celotno količino komercialno pripravljene DNA-sonde smo odpipetirali na sredino označenega polja na steklu, nanjo smo položili krovno steklo (22x22 mm), tako da ni bilo mehurčkov. Pri DNA-sondah, ki jih je bilo potrebno predhodno pripraviti, smo sledili navodilom proizvajalca sond. Robove krovnega stekla smo zalili z »gumijastim cementom« za tesnenje krovnega stekla.

f) Denaturacija in hibridizacija

Denaturacijo smo izvedli po navodilih proizvajalca DNA-sonde. Stekla smo položili na ploščo hibridizatorja in upoštevali priporočeno temperaturo in čas denaturacije. Sondo in vzorec smo denaturirali istočasno. Po končani denaturaciji smo ploščo ohladili na 37 °C in pustili hibridizirati vsaj 16 ur oziroma preko noči.

g) Spiranje stekel po hibridizaciji

Po hibridizaciji smo s stekel odstranili krovna stekla. Stekla smo postavili v spiralno raztopino NP-40, segreto na 73 °C za 4 minute. Stekla smo prestavili za 4 minute v posodico z raztopino PBT segreto na sobno temperaturo. Na mokro steklo, ki smo ga odcedili na staničevini, smo pipetirali 10 µL DAPI ter ga prekrili z velikim krovnim steklom. Pri pokrivanju smo pazili, da se nam niso naredili zračni mehurčki. S staničevino smo ovili, dobro popivnali in osušili stekla. Položili smo jih v črno škatlo in postavili za pol ure v zamrzovalnik.

h) Pregled stekel pod fluorescenčnim mikroskopom

S pomočjo fluorescenčnega mikroskopa in ustreznih filtrov smo ovrednotili preparat. V primeru, da so preparati nespecifično svetili, smo jih ponovno spirali s spiralnimi raztopinami, vendar s krajšimi časi. Pri pregledu stekel smo vedno sledili navodilom v katalogu proizvajalca sonde. Mi smo uporabljali LSI sonde proizvajalca Abbot in ON sonde proizvajalca Kreatech. Pri pregledu preparata smo ugotavljali spremembo števila

signalov, ki se lahko zmanjša ali poveča, ter odsotnost ali pojav fuziranih signalov. Preparat smo vrednotili tako, da sta dva preiskovalca preštela vsak po 200 celic v dveh ločenih področjih preparata. Pri rezultatih, kjer sta se preiskovalca razlikovala za več kot 10 %, je štel še tretji preiskovalec. Rezultat smo podali kot delež (%) nenormalnih celic v vzorcu. Posebej smo bili pozorni na področja, kjer so se celice prekrivale. Za oceno signalov na celicah se celice ne smejo prekrivati. Rezultat smo šteli kot pozitiven, če je bila sprememba prisotna na več kot 10 % celic. Pri triploidnem kariotipu pa je mejna vrednost za pozitiven rezultat 50 % celic.

ENQUA (European Neuroblastoma Quality Assessment) je pri nevroblastomu zasnovala skupno terminologijo za spremembe v genu *MYCN* in izgube na področju 1p36.3. Terminologijo je mogoče uporabljati tudi za ostale delecije, kromosomska neravnovesja in LOH.

Pri vsakem vzorcu tkiva mora patolog najprej potrditi prisotnost tumorskih celic. Za vrednotenje preparatov in podajanje rezultatov tudi smernice predlagajo poenoteno izrazoslovje (Tabla IV) (24).

Tabela IV: Priporočila za terminologijo nevroblastoma s strani ENQUA.

Pomnožitve	Amplifikacija gena	Več kot štiri kratno povečanje števila signalov za iskani gen v primerjavi s kontrolno sondo na istem kromosomu.
	Žariščna amplifikacija gena	Vsaj 50 celic z amplifikacijo gena obdanih s tumorskimi celicami brez amplifikacije.
	Sumljiva pomnožitev	Do štiri kratno povečanje števila signalov za iskani gen v primerjavi s kontrolno sondo na istem kromosomu. Tako dobljen rezultat potrebuje nadaljnjo analizo.
	Brez amplifikacije gena	Enako število signalov iskanega gena in kontrolne sonde.
	Delecija	Prisoten samo en signal za iskano kromosomsko področje.

Izgube	Kromosomsko neravnovesje	Nesorazmerje v številu signalov tarčnega in kontrolnega kromosomskega področja z več kot enim signalom. Vzorce je potrebno nadalje analizirati s PCR.
	Žariščna delecija/neravnovesje	Vsaj 50 celic z delecijo ali kromosomskim neravnovesjem obdanih s celicami, ki imajo uravnotežen hibridizacijski vzorec.
	Brez delecije/ni kromosomskega neravnovesja	Enako število signalov za tarčni in kontrolni gen.
Ni rezultata		Potrebno je podati zakaj ni rezultata (nejasen rezultat, ni dovolj tumorskih celic, ni tumorja, preiskava ni uspela).

3.4 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

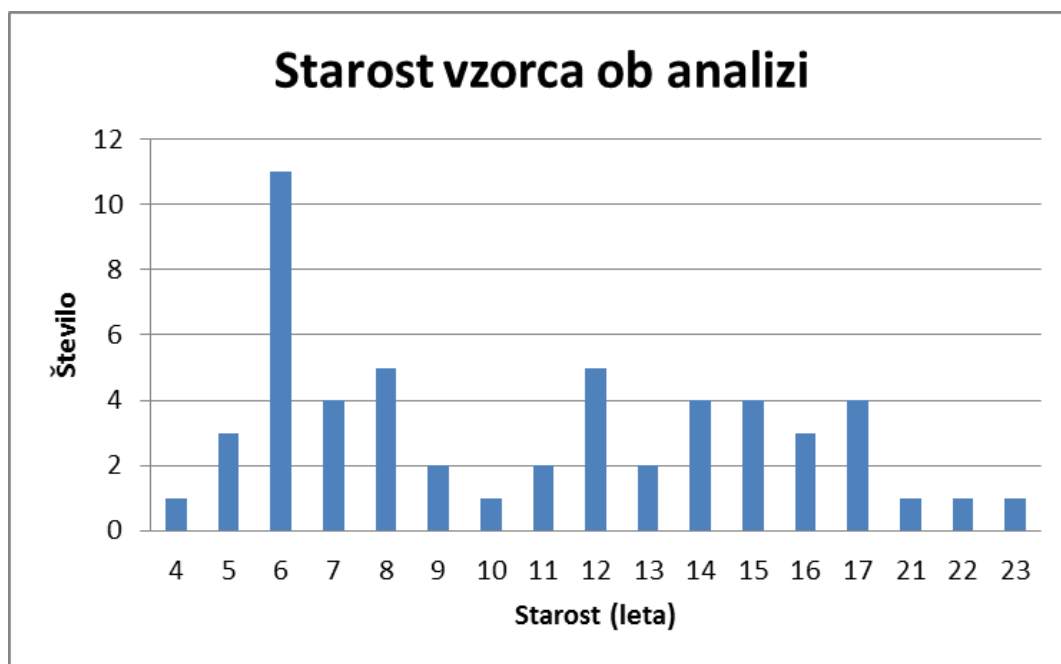
Podatke smo analizirali s pomočjo statističnega paketa IBM SPSS (IBM SPSS Statistics v19). Analizo preživetja smo opravili po Kaplan-Meierjevi metodi, za primerjavo med skupinami smo uporabili Log-Rank test. Med seboj smo primerjali skupine bolnikov z amplifikacijo *MYCN* in brez amplifikacije *MYCN*, bolnike z delecijo 11q, bolnike z delecijo 1p ter bolnike s poliploidnim kariotipom. Rezultati so bili statistično značilni, če je bila vrednost $p < 0,05$.

4 REZULTATI

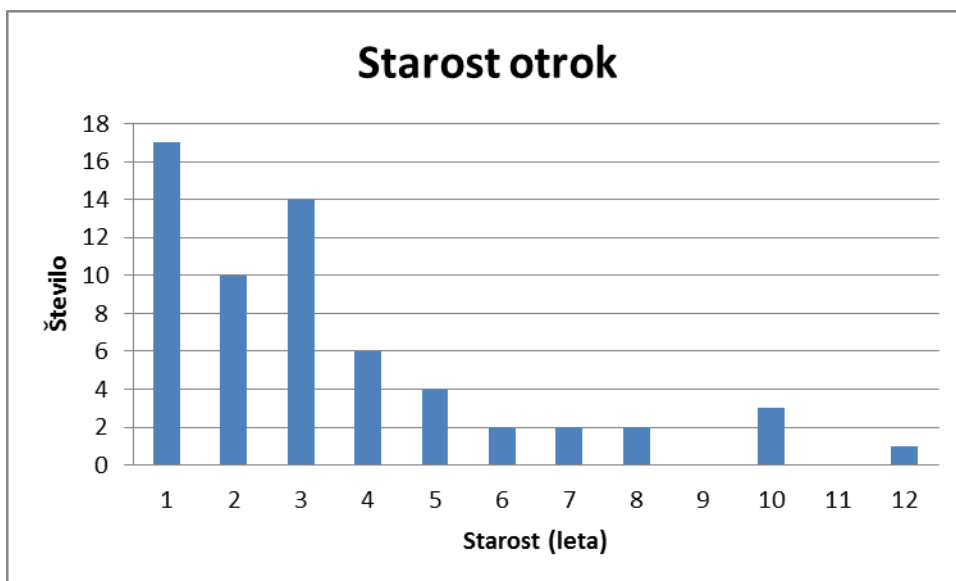
4.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 54 vzorcev arhivskih parafinskih rezin tumorskih tkiv bolnikov z nevroblastomom. Vzorci so bili tumorska tkiva otrok zdravljenih na Oddelku za hematologijo in onkologijo Otroške bolnišnice Zagreb. Starost arhivskih vzorcev ob analizi je bila 4 do 23 let (Slika 8).

V letih 2012 in 2013 smo analizirali tudi 7 svežih vzorcev bolnikov, ki so prispeli v Specializiran hematološki laboratorij UKC Ljubljana za redno diagnostično obravnavo. Skupno število analiziranih vzorcev je bilo 61. Bolniki so bili stari od 2 meseca do 12 let. Povprečna starost otrok je bila 3,4 let (Slika 9).



Slika 8: Starost arhivsega vzorca tumorskega tkiva ob analizi (n=54).



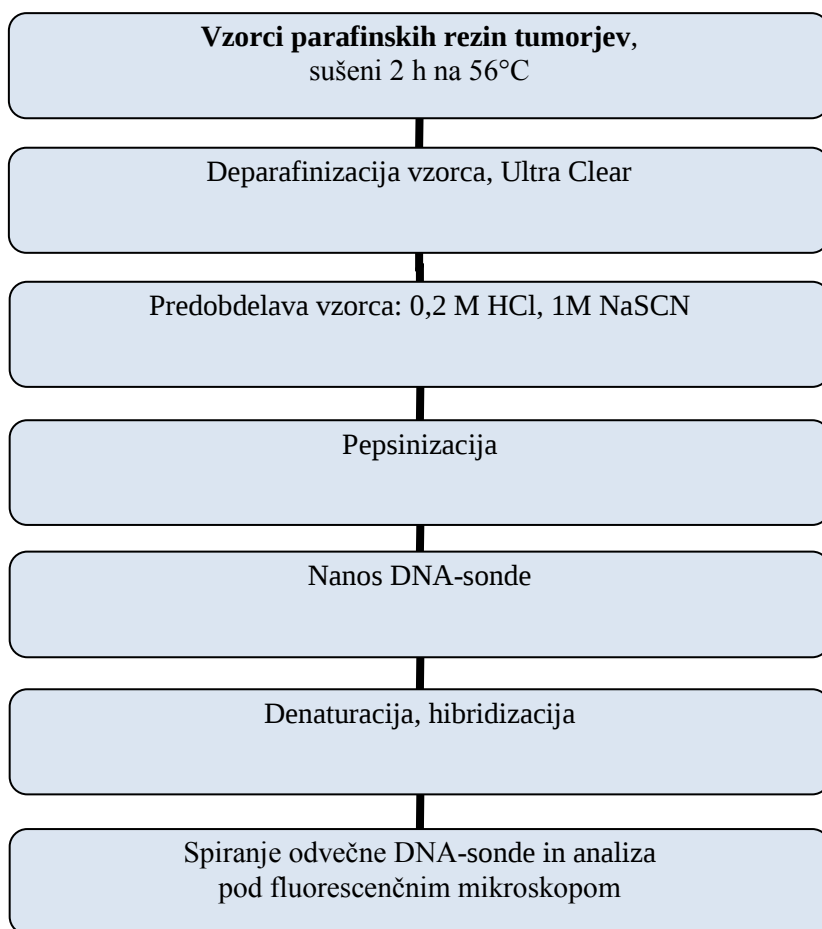
Slika 9: Starost otrok z nevroblastomom ob postavitvi diagnoze (n=61).

4.2 OPTIMIZACIJA FISH

a) Priprava protokola za FISH na arhivskih parafinskih rezinah tumorjev

V pripravi postopka za predpripravo vzorca in FISH analizo smo sledili literaturi (19) in navodilom proizvajalcev že pripravljenih kompletov za predobdelavo vzorcev (21).

Proizvajalci kompletov svetujejo optimizacijo postopka zlasti glede na čas pepsinizacije. V literaturi tudi ni bistvenih odstopanj pri ostalih korakih, ki jih shematsko prikazuje Slika 10.



Slika 10: Shematski prikaz FISH.

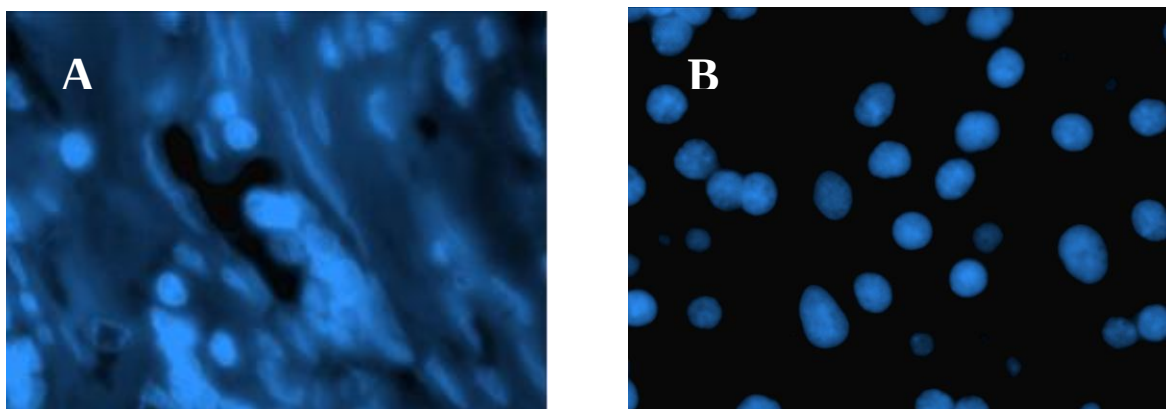
b) FISH s komercialno pripravljenim kompletom

FISH smo najprej izvedli z že pripravljenim kompletom za obdelavo vzorcev (Tissue Digestion Kit II, Kreatech). Pri izvedbi postopka smo sledili navodilom proizvajalca (Kreatech). Izbrali smo vzorce, ki so imeli na treh delih nanešeno tumorsko tkivo in najprej optimizirali čas pepsinizacije. Koncentracija pepsina v kompletu za obdelavo vzorcev je 0,025 % (21). Vsak del tumorja smo časovno različno pepsinizirali (10 min, 20 min, 40 min). Pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni raztopini pepsina 10 min in 20 min, pepsinizacija ni bila uspešna. Pri 7-ih vzorcih, ki smo jih pepsinizirali 40 min, smo ocenili pepsinizacijo kot uspešno. Na teh vzorcih smo izvedli celoten FISH postopek in nanesli DNA-sondo. Pri pregledu pod fluorescenčnim mikroskopom smo samo pri enem vzorcu opazili šibke signale, vendar neprimerne za oceno.

c) FISH z raztopinami pripravljenimi v laboratoriju

Vse raztopine smo nato pripravili sami in ponovili celoten postopek (Slika 11). Optimizirati smo morali čas pepsinizacije. Pričeli smo z 10 minutami, kolikor časa pepsiniziramo predhodno gojene krvne celice (0,005 % raztopina pepsina). Na vzorcih so bili vidni šibki signali, vendar še vedno neprimerni za oceno. Odločili smo se, da 10 krat povečamo koncentracijo pepsina v raztopini in podaljšamo čas pepsinizacije. Ocenili smo, da je optimalen čas pepsinizacije za večino vzorcev parafinskih rezin tumorjev 20 minut v 0,05% raztopini pepsina. Nekateri vzorci so potrebovali daljšo pepsinizacijo, zato smo med postopkom za vsak vzorec posebej pod fluorescenčnim mikroskopom preverjali uspešnost pepsinizacije in po potrebi podaljšali čas oziroma pepsinizacijo ponovili (Slika 12).

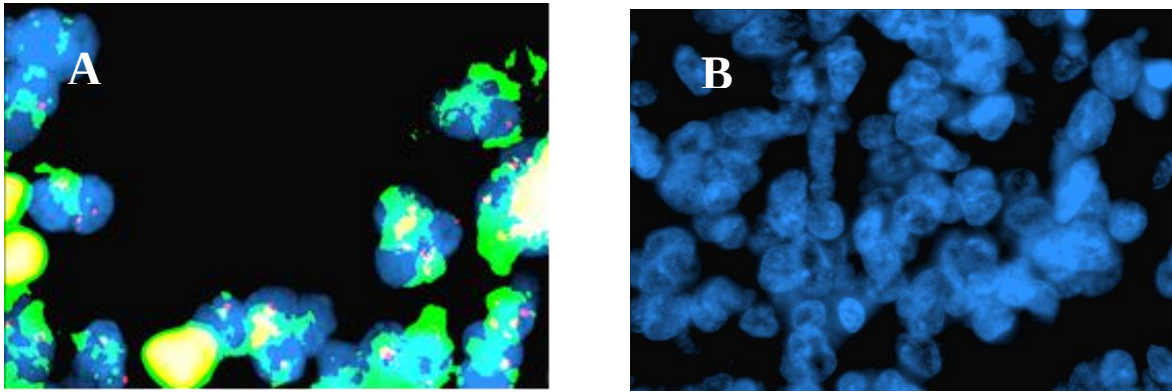
Izjema je bilo vseh 7 vzorcev, ki so prispeli v Specializiran hematološki laboratorij za redno diagnostično obravnavo. Pri vseh vzorcih je zadoščal čas pepsinizacije 20 minut, pri čemer so bili signali lepo vidni.



Slika 11: Preverjanje uspešnosti pepsinizacije pod fluorescenčnim mikroskopom z barvanjem jeder z DAPI: A) nezadostna pepsinizacija, B) ustrezna pepsinizacija.

d) Ocena vzorca pod fluorescenčnim mikroskopom

Pri oceni vzorca pod fluorescenčnim mikroskopom smo bili posebej pozorni na: avtofluorescenco tkiva (Slika 12 A), poškodovane celice in debelino vzorca (celice so se med seboj prekrivale) (Slika 12 B). Pri vrednotenju preparatov smo upoštevali le celice, ki so bile nepoškodovane, se niso prekrivale (Slika 12 B) in smo na njih lepo videli signale. Zaradi različne debeline parafinskih rezin smo vedno najprej poiskali ustrezno območje na vzorcu in šele nato pričeli s štetjem in oceno signalov.



Slika 12: Področja vzorca neprimerna za štetje: A) avtofluorescenca tkiva, B) prekrivanje celic.

e) Primerjava cene komercialnega kompleta s ceno raztopin pripravljenih v laboratoriju

Cena preiskave s pomočjo že pripravljenega kompleta je 10-krat višja od cene preiskave, če jo izvedemo s pomočjo raztopin, ki smo jih pripravili sami. Če predpostavimo, da je cena preiskave enaka pri obeh načinih priprave, pri preiskavi, pri kateri smo raztopine pripravili sami, doprinese predpriprava k celotni ceni 4 %, pri uporabi že pripravljenega kompleta pa 40 % celotne cene preiskave.

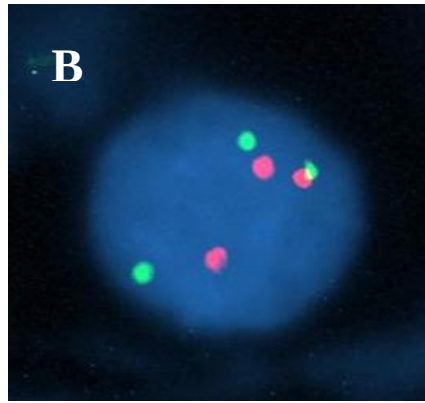
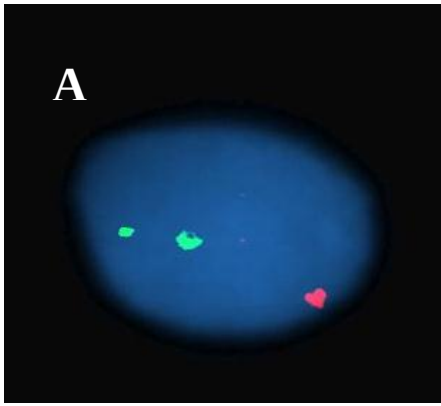
4.3 FISH ANALIZA TARČNIH SPREMEMB

a) Delecija 1p

Delecijo 1p smo določali z DNA-sondo ON 1q21/SRD1p36. Pri deleciji 1p smo videli 1 rdeč in 2 zelena signala na celici (Slika 13 A).

b) Triploidna celica

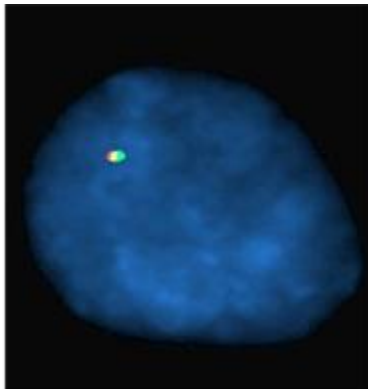
Triploidnost smo določali z DNA-sondo ON 1q21/SRD1p36. Tumor smo uvrstili med triploidne, če je bilo več kot 50 % celic s 3-emi ali 5-imi rdečimi in zelenimi signali (Slika 13 B). Ploidnost smo lahko opazili tudi z ostalimi uporabljenimi DNA-sondami (LSI MLL, LSI N-MYC(2p24)/CEP2), vendar je bila bistvena ON 1q21/SRD1p36, ker število kromosomov 1 najboljše korelira s ploidnostjo tumorja (28).



Slika 13: DNA-sonda ON 1q21/SRD1p36. A) Celica z delecijo na kratkem kraku kromosoma 1
B) Triploidna celica.

c) Delecija 11q23

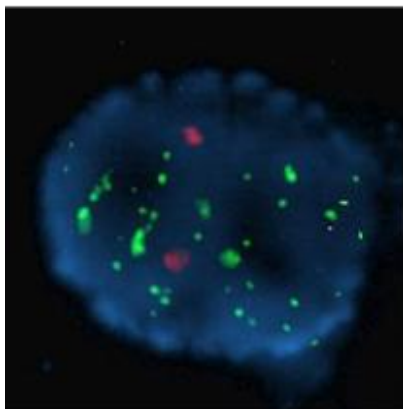
Delecijo 11q23 smo določali z DNA-sondo LSI MLL. Delecijo 11q smo videli kot 1 fuziran oranžen signal, pri triploidnem kariotipu smo videli 3 ali 5 fuziranih signalov (Slika 14).



Slika 14: DNA sonda LSI MLL: Celica z delecijo na dolgem kraku kromosoma 11.

d) Amplifikacija MYCN

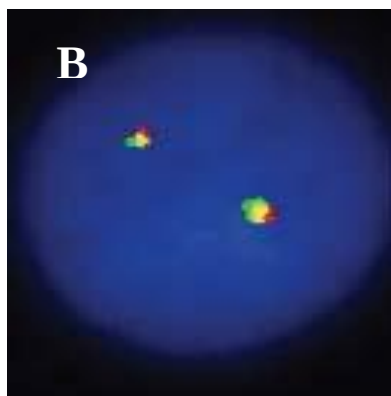
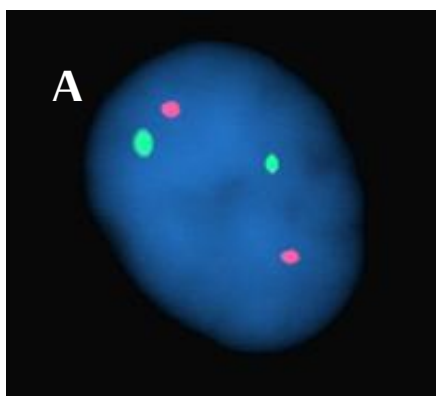
Amplifikacijo *MYCN* smo določali z DNA-sondo LSI N-MYC (2p24)/CEP2. Celica z amplifikacijo *MYCN* je imela vsaj 8 zelenih signalov in 2 oranžna ali več kot 4-kratni produkt več kot dveh oranžnih signalov (Slika 15).



Slika 15: DNA-sonda LSI N-MYC(2p24)/CEP2:
Celica z amplifikacijo *MYCN*.

e) Normalna celica

Pri normalni celici (diploidna celica) smo videli 2 zelena in dva oranžna signala z DNA-sondama LSI N-MYC(2p24)/CEP2 in ON 1q21/SRD1p36 (Slika 16 A). S sondo LSI MLL smo videli normalno celico kot 2 fuzirana (oranžna) signala (Slika 16 B).



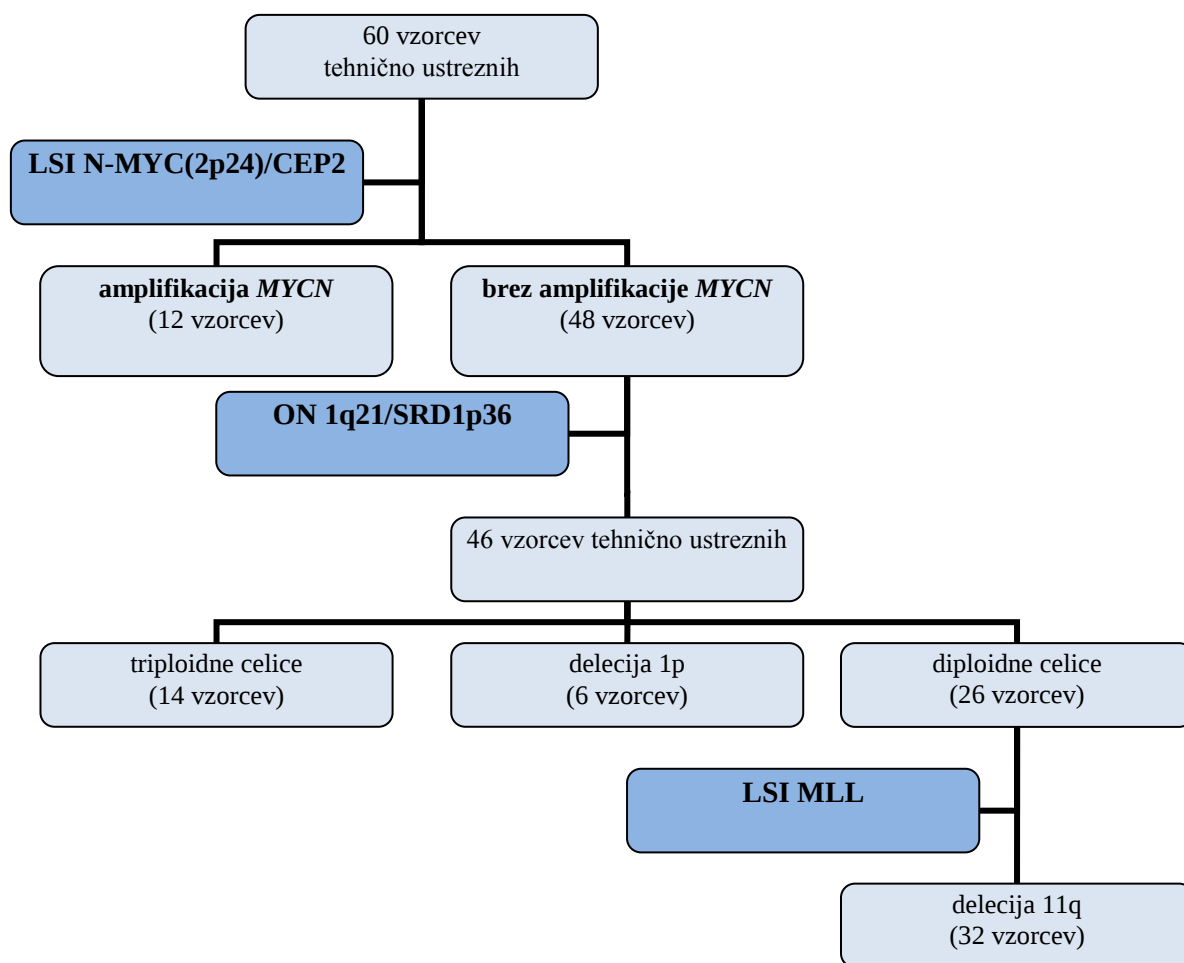
Slika 16: Normalna celica. A) DNA-sonda LSI N-MYC(2p24)/CEP2, B) DNA-sonda LSI MLL.

4.4 REZULTATI FISH ANALIZE NA VZORCIH NEVROBLASTOMA

4.4.1 Stopenjska FISH ananliza

Na vseh vzorcih smo izvedli FISH analizo s komercialno dostopnimi DNA-sondami. Najprej smo vse vzorce analizirali z DNA-sondo LSI N-MYC/CEP2. Amplifikacija *MYCN* ima pri nevroblastomu izrazito neugoden napovedni pomen. Zato smo nadalje analizirali

samo vzorce brez amplifikacije *MYCN*. S sondo ON LSI 1p/1q smo določali ploidnost tumorja in delecijo 1p, s sondo LSI MLL pa delecijo 11q na diploidnih celicah (Slika 17).



Slika 17: Shematski prikaz števila analiziranih vzorcev in izbor DNA-sonde za FISH metodo.

4.4.2 Tehnično neprimerni preparati

Za analizo je bilo 9 vzorcev tehnično neprimernih. Na enem vzorcu nismo mogli določiti amplifikacije *MYCN*. Na dveh vzorcih nismo določili ploidnosti in delecije 1p. Na 6-ih vzorcih nismo uspešno določili delecije 11q23 (Priloga 1). Vzorci, ki jih nismo mogli analizirati pod fluorescenčnim mikroskopom, so bili arhivski vzorci iz let 1995 do 1999, vsi starejši od 13 let. Na ostalih arhivskih vzorcih in vseh svežih diagnostičnih vzorcih smo FISH analizo uspešno izvedli.

Na vzorcu 1159/95 z nobeno od uporabljenih DNA-sond nismo uspešno izvedli analize. Prisotni so bili fibroblasti in endotelijske celice, kar je povzročilo nespecifično vezavo DNA-sonde, preparat je močno svetil, zato ga nismo mogli ovrednotiti.

Pri vzorcu 721/96 hibridizacija z DNA-sondama LSI MLL in ON LSI 1p/1q ni potekla, vzorca sta bila brez signalov.

Pri 4-ih vzorcih (181/99, 1908/95, 2038/95, 2041/96), ki smo jih analizirali z DNA-sondo LSI MLL, nismo videli ustreznih signalov pri pregledu pod fluorescenčnim mikroskopom (Priloga 1). Pri dveh vzorcih (1908/95, 2038/95) smo opazili zelo šibke zelene signale, oranžnih signalov nismo videli (Tabela IV).

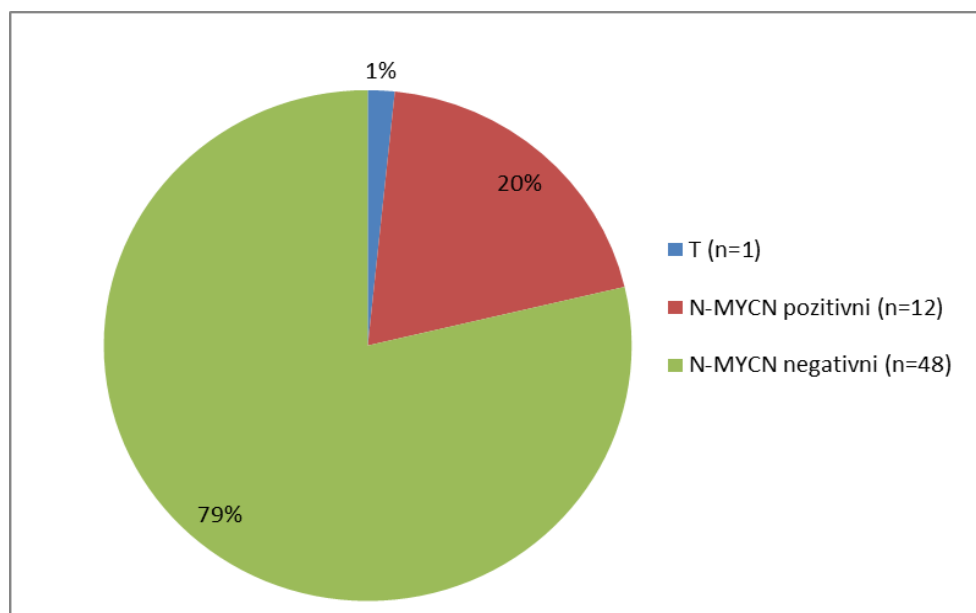
Tabela V: Tehnično neprimerni preparati za oceno pod fluorescenčnim mikroskopom.

LSI MLL	ON 1q21/SRD1p36	LSI N-MYC(2p24)/CEP2
1159/95	1159/95	1159/95
721/96	721/96	
1908/95		
2038/95		
2041/96		
181/99		

Največ tehnično neprimernih vzorcev je bilo v skupini, kjer smo določali delecijo 11q23. Pri dveh vzorcih, ki smo jih analizirali z DNA-sondo LSI MLL, smo videli šibke zelene signale, oranžnih signalov nismo videli. DNA-sonda LSI MLL (11q23) je v velikosti približno 350 kb označena s fluorescentnim barvilom, ki emitira zeleno svetlobo in v velikosti približno 190 kb označena s fluorescentnim barvilom, ki emitira oranžno svetlobo. Glede na to, da smo videli zelene signale, oranžnih, ki so manjši pa ne, predvidevamo, da tudi velikost in zgradba DNA-sonde vplivata na rezultat analize.

4.4.3 Pogostost ponavljajočih klinično pomembnih kromosomskih sprememb

Pri 12/61 (19,7 %) analiziranih vzorcev smo našli amplifikacijo gena *MYCN* (Slika 18). FISH smo izvedli na 53/54 (98 %) arhivskih vzorcev in 7/7 (100 %) svežih vzorcev tumorjev.



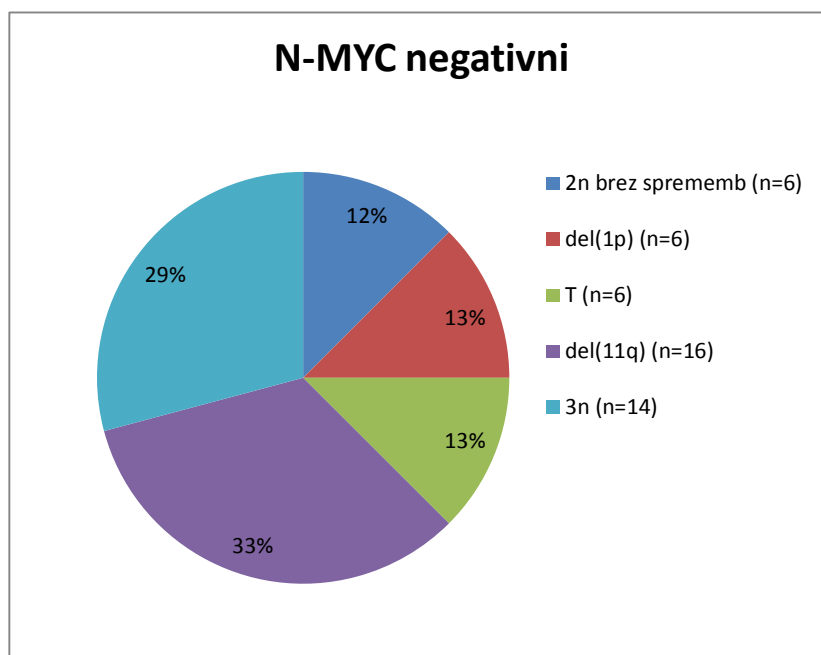
Slika 18: Določanje amplifikacije gena *MYCN* (n=61), T-tehnično neuporaben vzorec.

Triploidni tumor smo našli pri 14/48 (29,2 %) vzorcev in delecijo 1p pri 6/48 (12,5 %) pregledanih vzorcev (Slika 19) (Tabela IV). FISH s sondo ON 1p/1q smo izvedli na 46/48 (96 %) vzorcev brez amplifikacije *MYCN* oziroma na 46/61 (75 %) vseh vzorcev.

Delecijo 11q smo določili pri 16/32 (50 %) vzorcev. Analizo smo izvedli na diploidnih (2n) vzorcih, ki smo jih predhodno analizirali z DNA-sondo ON LSI 1p/1q. Delecijo 11q smo uspešno določili na 26/32 (81 %) diploidnih celicah oziroma na 26/61 (43 %) vseh vzorcev (Tabela V).

7 vzorcev iz leta 2012 in 2013 smo analizirali z obema sondama, LSI MLL in ON LSI 1p/1q.

Strukturne spremembe kromosomov smo našli pri 22/32 (69 %) diploidnih vzorcev (Tabela V).



Slika 19: Ponavljajoče kromosomske preureditve (n=48), pri bolnikih z nevroblastomom , T-tehnično neprimeren vzorec.

Tabela VI: Pojavnost testiranih kromosomskih preureditev pri nevroblastomu.

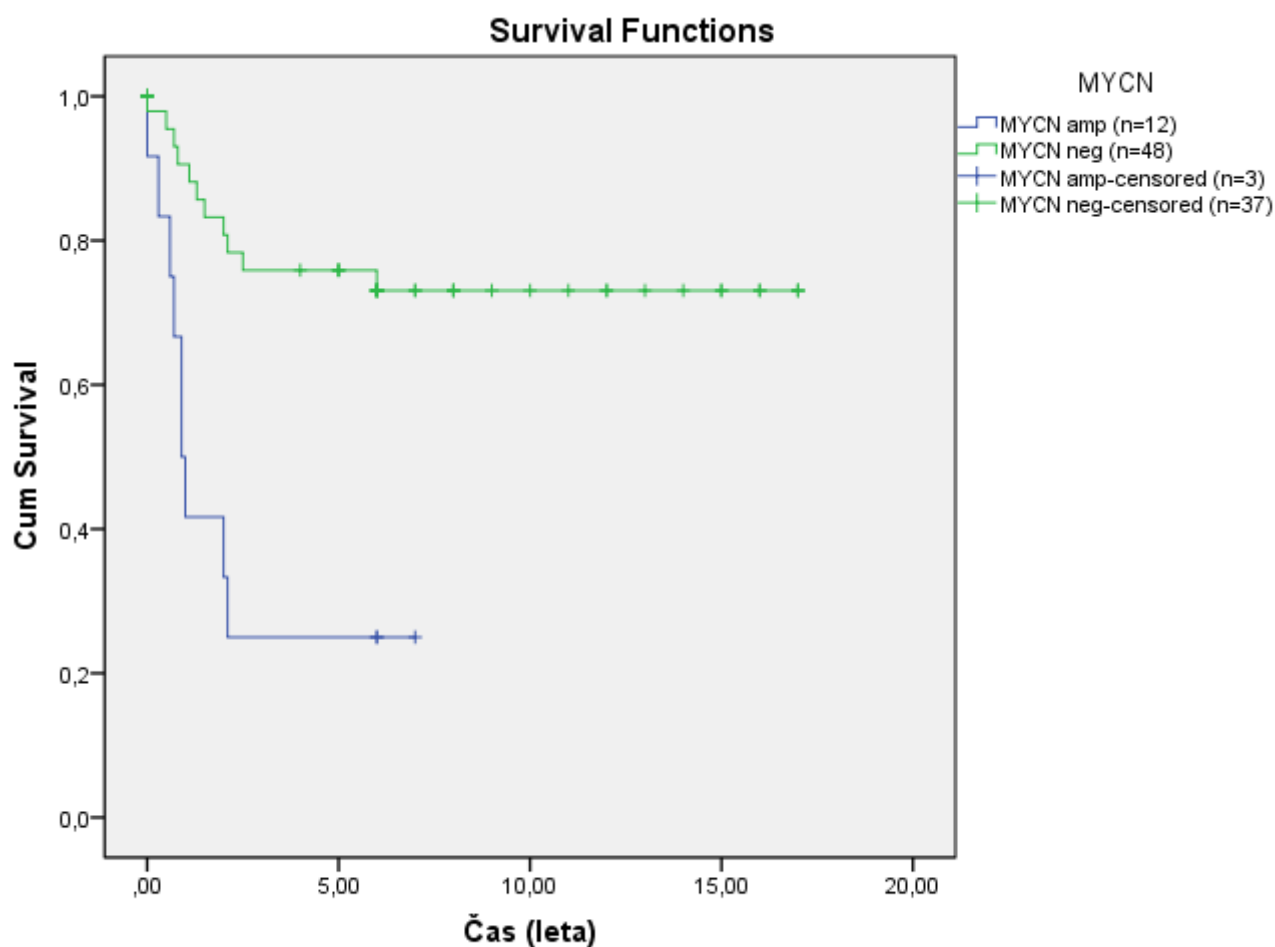
	Število analiziranih vzorcev	pozitivni	negativni	Delež pozitivnih (analizirani vzorci) (%)	Delež pozitivnih (vsi vzorci) (%)	Tehnično neuporabni vzorci
MYCN	61	12	48	19,7	19,7	1
3n	48	14	32	29,2	23	2
1p	48	6	40	12,5	9,8	2
11q	32	16	10	50	26,2	6

4.5 PREŽIVETJE BOLNIKOV GLEDE NA DOLOČENE KROMOSOMSKE SPREMEMBE

4.5.1 Vpliv amplifikacije *MYCN* na preživetje

V analizo smo vključili 60 bolnikov. Primerjali smo krivulji preživetja bolnikov z (n=12) in brez (n=48) amplifikacije *MYCN*.

Krivulji preživetja sta statistično različni ($p < 0,0002$). Pri bolnikih z amplifikacijo *MYCN* vidimo v prvih dveh letih močan padec krivulje (Slika 20). Bolniki z amplifikacijo *MYCN* imajo izrazito slabše preživetje v primerjavi z bolniki brez amplifikacije *MYCN*. Povprečen čas preživetja bolnikov z amplifikacijo *MYCN* je 2,5 let. Povprečno preživetje bolnikov brez amplifikacije *MYCN* pa je 12,9 let.



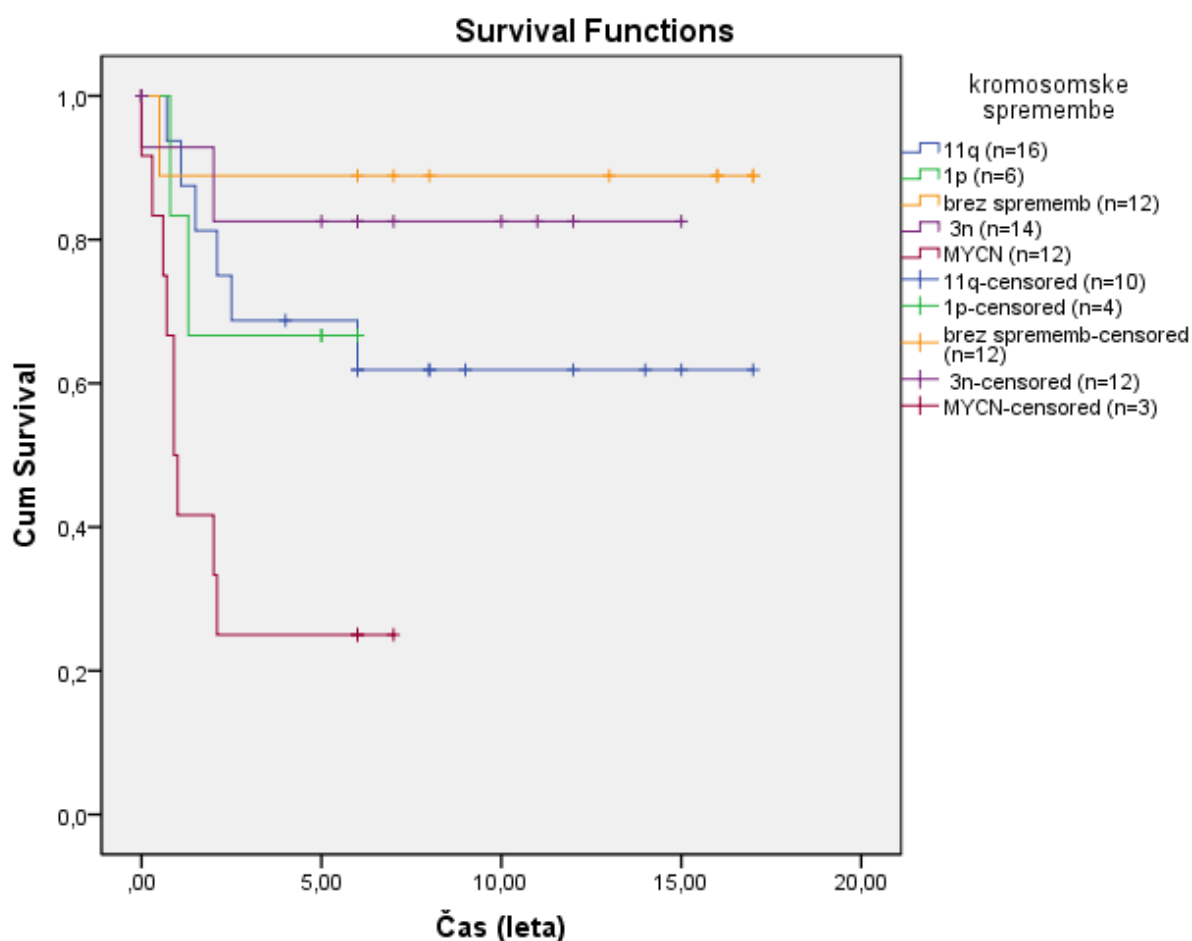
Slika 20: Krivulji preživetja bolnikov z amplifikacijo (n=12) in brez amplifikacije *MYCN* (n=48).

4.5.2 Vpliv ostalih preureditev na preživetje

V analizo smo vključili 60 bolnikov. Primerjali smo krivulje preživetja pri bolnikih z amplifikacijo *MYCN* (n=12), delecijo 1p (n=6), delecijo 11q23 (n=16), triploidnim kariotipom (n=14) in bolnike brez sprememb (n=12).

Krivulje preživetja bolnikov z amplifikacijo *MYCN*, del(1p), del(11q), triploidnim tumorjem in bolnikov brez kromosomskih sprememb se med seboj statistično razlikujejo ($p < 0,006$). Povprečno preživetje bolnikov z amplifikacijo *MYCN* je 2,5 let, bolnikov z delecijo 1p 4,4 let, bolnikov z delecijo 11q23 11,4 let, triploidnim kariotipom 12,2 let in bolnikov s tumorjem brez zaznanih kromosomskih sprememb 15,2 let (Slika 21).

Petletno preživetje bolnikov z amplifikacijo *MYCN* je 25 %, bolnikov z delecijo 1p 67 %, bolnikov z delecijo 11q 69 %, bolnikov s triploidnim kariotipom 81 % ter bolnikov brez sprememb 89 % (Slika 21).



Slika 21: Krivulje preživetja bolnikov s ponavljajočimi kromosomskimi spremembami (n=60).

5 RAZPRAVA

5.1 VPELJAVA METODE

Pri vpeljavi metode smo najprej preizkusili komercialno pripravljene komplete. Pri enem od 7-ih testiranih vzorcev smo opazili signale, vendar neustrezne za oceno preparata. Predvidevamo, da zaradi starosti arhivskih rezin tumorja nismo bili uspešni. Razpon starosti arhivskih vzorcev, ki smo jih vključili v analizo, je bil 4 do 23 let. Na svežih vzorcih komercialno pripravljenih kompletov nismo preizkusili. Poleg starosti pa je na uspešnost vplivala tudi koncentracija raztopine pepsina. V komercialno pripravljenem kompletu za obdelavo vzorcev je koncentracija pepsina 0,025 % (21), ki je bila glede na naše nadaljnje delo verjetno prenizka. Lahko bi še podaljšali čas pepsinizacije, vendar je celoten postopek časovno dolgotrajen in bi to le še podaljšalo analizo.

Analizo smo nadaljevali z raztopinami, ki smo jih v celoti po temeljnih protokolih, dostopnih v literaturi (19), pripravili sami. Največ težav nam je pri vpeljavi metode povzročal čas pepsinizacije. Pri neustrezni pepsinizaciji DNA-sonda ne more dostopati do jeder celic in ne more uspešno hibridizirati s tarčno DNA v jedru. Za arhivska tumorska tkiva smo določili začetni čas 20 minut, uspešnost pepsinizacije pa smo preverjali pod fluorescenčnim mikroskopom in jo po potrebi podaljševali.

Pri 7-ih vzorcih, ki smo jih dobili za redno diagnostično obravnavo v Specializiran hematološki laboratorij, je bila 20 minutna pepsinizacija dovoljšnja. Po ustreznem številu obdelanih vzorcev, bi bilo iz protokola preverjenje pepsinizacije možno umakniti, ker le-ta na svežih vzorcih verjetno ni potrebna.

Pri vrednotenju preparatov s fluorescenčnim mikroskopom nam je največ težav povzročala avtofluorescenca tkiva, prekrivanje celic (zaradi različne debeline vzorca) in nepopolna hibridizacija (celice brez signalov). Vedno smo poiskali področje, kjer so bile celice razporejene posamično in nepoškodovane. Avtofluorescenca tkiva in poškodbo celic je najbrž povzročilo dolgotrajno hranjenje vzorcev tumorskih tkiv in posledično njihova oksidacija.

9 vzorcev je bilo tehnično neprimernih. Vsi vzorci, ki jih nismo mogli analizirati, so bili arhivski. Pri 6-ih vzorcih, ki smo jih analizirali z DNA-sondo LSI MLL, nismo dobili

ustreznih signalov. Na 7-ih svežih diagnostičnih vzorcih smo bili uspešni z vsemi DNA-sondami.

Na svežih diagnostičnih vzorcih bi bilo smiselno preveriti komercialno pripravljene komplete, ki se na arhivskih vzorcih niso pokazali za uspešne. Ker pa je cena komercialno pripravljenih kompletov bistveno višja, bi raztopine, ki jih pripravljamo sami, ostale prvi izbor, kljub morebitni uspešni analizi, ker so se izkazala kot povsem ustrezne.

5.2 POJAVNOST CITOGENETSKIH SPREMEMB

Amplifikacija *MYCN* se pojavlja v vseh stadijih bolezni in pri otrocih vseh starosti. Je izrazito neugoden napovedni dejavnik. V literaturi je omenjena pojavnost od 17 do 25 % (1, 23, 25, 26). Pri analizi naših vzorcev smo amplifikacijo *MYCN* našli pri 19,7 % vzorcev, kar se sklada z navedbami v literaturi.

Pri vseh vzorcih je bila amplifikacija *MYCN* zelo nedvoumna. Pomnožene signale smo našli pri hiperploidnih celicah, ostalih pojavnih oblik nismo ugotovili.

Literatura navaja pojavnost delecije 1p okrog 23 do 30 % vseh tumorjev (23, 27). Pri analizi naših vzorcev smo našli delecijo 1p pri 12,5 % vzorcev. Pri vseh stadijih tumorja delecija 1p kaže na tesno povezavo z amplifikacijo *MYCN* in slabo napovedjo poteka bolezni (23). Sklepamo, da so naši rezultati nižji, ker smo izključili vse vzorce z amplifikacijo *MYCN*, ker je ta sama zase najmočnejši napovedni dejavnik in delecija 1p ne vpliva na celokupni neugodni napovedni pomen. DNA-sonde so drage, zato smo izključili vzorce, pri katerih smo že določili napovedno zelo neugodno spremembo (prisotna amplifikacija *MYCN*) in analizo nadaljevali le z vzorci, pri katerih bi ugotovitev del(1p) vplivala na napovedno opredelitev.

Po podatkih v literaturi je pojavnost trisomije kromosoma 1 med 39 in 55 % tumorjev vseh stadijev (3, 28). Mi smo jo našli pri 29,2 % vzorcev. Naši rezultati se dokaj dobro ujemajo z navedbami v literaturi. Izključitev vzorcev z amplifikacijo *MYCN* nima vpliva na pojavnost trisomije kromosoma 1, ker jo redko opazimo skupaj z amplifikacijo *MYCN* (28). Število kopij kromosoma 1 je morebitna alternativa za določanje ploidnosti tumorja, ker število kromosomov 1 najboljše korelira s ploidnostjo tumorja. Ob triploidnih celicah velikokrat opazimo tudi pentaploidne celice. Nevroblastome, pri katerih zaznamo več kot

50 % triploidnih in/ali pentaploidnih celic, uvrščamo med triploidne tumorje (28). Vendar žal pri naših vzorcih ploidnost ni bila določena s pretočno citometrijo, ki je referenčna metoda, s čimer bi lahko ovrednotili tudi zanesljivost določitve ploidnosti s FISH.

V študijah izgube heterozigotnosti (LOH) je bila delecija 11q določena pri 5 do 44 % vseh tumorjev (1, 18, 16, 25). Izgubo celotnega kromosoma 11 so opazili pri 19 %, neuravnoteženo LOH 11q pa pri 22 % vseh primarnih tumorjev (13). Mi smo delecijo 11q določili pri 50 % analiziranih vzorcev. Če pa upoštevamo, da imajo tumorji z amplifikacijo *MYCN* redko delecijo 11q, prav tako tudi triploidni tumorji, in izračunamo pojavnost na celotno število vzorcev, je le-ta 26,2 %, kar se sklada z literaturnimi navedbami.

5.3 VPLIV DOLOČENIH KROMOSOMSKIH SPREMEMB NA PREŽIVETJE

Z analizo preživetja smo določili petletno preživetje bolnikov s kromosomskimi spremembami in povprečno starost bolnikov. Pri bolnikih z amplifikacijo *MYCN*, delecijo 1p in delecijo 11q smo določili krajše petletno preživetje kot pri bolnikih s triploidnim tumorjem (81 %). Slika 18 kaže, da je najboljše (89 %) petletno preživetje bolnikov brez zaznanih sprememb. V to skupino smo uvrstili vzorce z diploidnim tumorjem, pri katerih z DNA-sondami nismo določili nobene od iskanih kromosomskih sprememb. Kot že večkrat poudarjeno pa imajo najslabše petletno preživetje (25 %) bolniki z amplifikacijo *MYCN*.

6 SKLEP

Uspešno smo uvedli FISH analizo na arhivskih parafinskih rezinah tumorjev s pomočjo raztopin, ki smo jih po protokolu pripravili sami.

Na arhivskih vzorcih s komercialno pripravljenimi kompleti nismo bili uspešni. Smiselno bi bilo ponoviti analizo še na novih diagnostičnih vzorcih saj bi bili najverjetneje uspešni.

Določanje ponavljajočih kromosomskih sprememb pri nevroblastomu ima pomemben napovedni pomen poteka bolezni, poleg tega pa vpliva tudi na izbiro zdravljenja. S pomočjo FISH smo določili amplifikacijo *MYCN* pri 19,7 % analiziranih vzorcev. Na vzorcih brez amplifikacije *MYCN* smo določili delecijo 1p pri 12,5 % in triploiden kariotip pri 29,2 % vzorcev. Pri 50 % diploidnih vzorcev smo določili delecijo 11q23. Naši rezultati se dobro ujemajo s podatki navedenimi v literaturi.

Z analizo preživetja bolnikov smo pokazali, da je najboljše 89 % petletno preživetje bolnikov, ki jim z nobeno od uporabljenih DNA-sond nismo dokazali kromosomskih sprememb, najslabše 25 % petletno preživetje pa smo pričakovano določili pri bolnikih z amplifikacijo *MYCN*. Tako je tudi analiza preživetja posredno potrdila pravilnost naših rezultatov.

7 LITERATURA

1. Westermann F, Schwab M: Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Lett.* 2002; 184(2): 127-47.
2. Sridhar S, Al-Moallem B, Kamal H, Terrile M, Stallings RL: New insights into the genetics of neuroblastoma. *Mol Diagn Ther.* 2013; 17(2): 63-9.
3. Genetics, Dept Medical Information, 2012, Francija:
<http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/neurob5002.html>, (september 2014).
4. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldut A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK: INRG Task Force: The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009; 27(2): 289-297.
5. McCarville MB: Imaging neuroblastoma: what the radiologist needs to know. *Cancer Imaging.* 2011; 11 Spec No A: 44-7.
6. Perković J, Petruša K, Berlec M, Zdravcevec-Zaletel L, Jereb B: Preživetje otrok z neuroblastomom, zdravljenih v Sloveniji v dveh obdobjih. *Zdrav Vestn.* 2014; 83: 209-16.
7. Novaković S, Hočevar M, Jezeršek Novaković B, Strojani P, Žgajnar J: Onkologija raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. Mladinska knjiga Založba, Ljubljana, 2009; 410.
8. He S, Liu Z, Oh DY, Thiele CJ: MYCN and the epigenome. *Front Oncol.* 2013; 3: 1
9. GeneCards, 2014, Weizmann Institute of Science:
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYCN>, (september 2014).
10. Terry Lichtor, ISBN 978-953-51-1058-3, 652, 2013, InTech:
<http://www.intechopen.com/books/clinical-management-and-evolving-novel-therapeutic-strategies>, (september 2014).
11. Tang XX, Zhao H, Kung B, Kim DY, Hicks SL, Cohn SL, Cheung NK, Seeger RC, Evans AE, Ikegaki N: The MYCN enigma: Significance of MYCN expression in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2006; 2826-2833.
12. Souzaki R, Tajiri T, Teshiba R, Higashi M, Kinoshita Y, Tanaka S, Taguchi T: The genetic and clinical significance of MYCN gain as detected by FISH in neuroblastoma. *Pediatr Surg Int.* 2011; 231-6.
13. Kushner BH, Cheung NKV: Neuroblastoma from genetic profiles to clinical challenge. *N Engl J Med.* 2005; 353: 2215-2217.

14. Buckley PG, Alcock L, Bryan K, Bray I, Schulte JH, Schramm A, Eggert A, Mestdagh P, De Preter K, Vandesompele J, Speleman F, Stallings RL: Chromosomal and microRNA expression patterns reveal biologically distinct subgroups of 11q- neuroblastoma. Clin Cancer Res. 2010; 16(11): 2971-8.
15. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F: Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. Clin Cancer Res. 2003; 9(1): 52-8.
16. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F: FISH analyses for alterations in chromosomes 1, 2, 3, and 11 define high-risk groups in neuroblastoma. Med Pediatr Oncol. 2003; 41(1): 30-35.
17. Souzaki R, Tajiri T, Teshiba R, Higashi M, Kinoshita Y, Tanaka S, Taguchi T: The genetic and clinical significance of MYCN gain as detected by FISH in neuroblastoma. Pediatr Surg Int. 2011; 27(3): 231-6.
18. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleiermacher G, Speleman F, Spitz R, London WB, Cohn SL, Pearson ADJ, JM Maris JM : International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG). Biology Committee. British Journal of Cancer. 2009; 1471–1482.
19. Rautenstraß BW, Liehr T (Eds.): FISH Technology, Springer Lab Manual, Berlin, 2001; 3-41, 148-161.
20. George Rice, Fluorescent In Situ Hybridization: (FISH), 2013, Montana State University:
http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/fish.html, (september 2014).
21. Kreatech FISH probe, Leica biosystems: <http://www.kreatech.com/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes.html>, (september 2014).
22. Abbot Molecular FISH probes, United States:
http://www.abbottmolecular.com/products/oncology/fish/vysis_-probe.html, (september 2014).
23. Spitz R, Hero B, Simon T, Berthold F: Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. Clin Cancer Res. 2006; 3368-73.

24. Ambros IM, Benard J, Boavida M, Bown N, Caron H, Combaret V, Couturier J, Darnfors C, Delattre O, Freeman-Edward J, Gambini C, Gross N, Hattinger CM, Luegmayr A, Lunec J, Martinsson T, Mazzocco K, Navarro S, Noguera R, O'Neill S, Potschger U, Rumpfer S, Speleman F, Tonini GP, Valent A, Van Roy N, Amann G, De Bernardi B, Kogner P, Ladenstein R, Michon J, Pearson AD, Ambros PF: Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J Clin Oncol.* 2003; 21(11): 2077-84.
25. Villamón E, Berbegall AP, Piqueras M, Tadeo I, Castel V, Djos A, Martinsson T, Navarro S, Noguera R: Genetic instability and intratumoral heterogeneity in neuroblastoma with MYCN amplification plus 11q deletion. *PLoS One.* 2013; 8(1): e53740.
26. Bagatell R, Beck-Popovic M, London BW, Zhang Y, Pearson DJA, Matthay KK, Monclair T, Ambros PF, Cohn LS: Significance of MYCN amplification in International neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: A report from the International neuroblastoma risk group database. *J Clin Oncol.* 2009; 27(3): 365–370.
27. Attiyeh EF, London WB, Mossé YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, Brodeur GM, Cohn SL, Matthay KK, Maris JM: Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 353(21): 2243-2253.
28. Spitz R, Betts DR, Simon T, Boensch M, Oestreich J, Niggli FK, Ernestus K, Berthold F, Hero B: Favorable outcome of triploid neuroblastomas: a contribution to the special oncogenesis of neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006; 167(1): 51-56.

Priloga 1:

Tabela VII: Preglednica spola, starosti, časa preživetja in kromosomskih sprememb pri bolnikih z nevroblastomom

ID vzorca/ Starost vzorca	Letnica rojstva	spol	starost	čas preživetja (leta)	preživetje	Amplifikacija MYCN	Ploidnost(3n/5n)	del (1p)	del (11q)
4569/01	2001	M	0,17	11,00	1	0	1	0	/
5313/07	2007	Ž	0,17	5,00	1	0	1	0	/
11004/06	2005	M	1,00	6,00	1	0	1	0	/
11184/06	2005	Ž	1,00	6,00	1	0	0	0	1
11469/06	2006	M	0,83	0,60	0	1	/	/	/
1159/95	1993	M	2,00	17,00	1	T	T	T	T
1213/97	1994	M	3,50	15,00	1	0	1	0	/
1272/00	1998	Ž	1,17	12,00	1	0	1	0	/
1449/91	1981	M	10,00		0	1	/	/	/
1621/97	1987	M	10,00	0,90	0	1	/	/	/
1670/99	1992	M	7,00	2,10	0	0	0	0	1
1698/97	1994	M	3,00	0,70	0	0	0	0	1
1806/04	2004	M	4,00	8,00	1	0	0	0	0
181/99	1989	Ž	10,00	13,00	1	0	0	0	T
1896/95	1992	M	3,00	17,00	1	0	0	0	1
1908/95	1993	M	2,00	17,00	1	0	0	0	T
1917/98	1990	M	8,00	2,10	0	1	/	/	/
197/98	1990	M	8,00	14,00	1	0	0	0	1
2038/95	1993	M	2,00	17,00	1	0	0	0	T
2041/96	1996	M	0,83	16,00	1	0	0	0	T
2057/06	2004	M	1,50	6,00	1	0	0	0	1
2293/96	1993	M	3,00	1,50	0	0	0	0	1
230/00	1995	M	4,50	1,30	0	0	0	1	/
2394/05	2002	Ž	3,00	7,00	1	1	/	/	/
2458/05	2000	M	5,00	7,00	1	0	0	0	0
2956/00	1996	Ž	4,00	1,00	0	1	/	/	/
3088/04	2004	M	0,25	8,00	1	0	0	0	1
3318/89	1977	M	12,00	2,00	0	0	1	0	/
3401/06	2003	M	3,00	6,00	1	0	1	0	/
3432/08	2003	M	4,50	4,00	1	0	0	0	1
3914/07	2007	M	0,25	5,00	1	0	0	1	/
4115/07	2003	Ž	3,80	5,00	1	0	0	1	/
4133/06	2004	Ž	1,75	6,00	1	1	/	/	/
4187/04	2001	M	3,00	8,00	1	0	0	0	1
42/00	1998	Ž	2,00	0,90	0	1	/	/	/
420/98	1993	Ž	5,00	1,10	0	0	0	0	1
4282/03	1998	Ž	4,50	2,50	0	0	0	0	1
4378/04	1999	Ž	4,70		0	0	1	0	/
4513/00	1998	Ž	1,50	12,00	1	0	0	0	1
4595/03	1996	M	6,50	9,00	1	0	0	0	1
46/05	2001	Ž	3,50	0,50	0	0	0	0	0
4627/01	1998	M	3,00	2,00	0	1	/	/	/
466/97	1994	Ž	3,00	15,00	1	0	0	0	1

468/04	2001	Ž	3,00	0,80	0	0	0	1	/
4832/06	2004	M	2,00	6,00	1	1	/	/	/
5440/02	2002	M	0,17	10,00	1	0	1	0	/
5592/06	2006	Ž	0,42	0,30	0	1	/	/	/
5726/06	2003	Ž	2,75	6,00	1	0	0	1	/
6349/06	2000	M	5,50	6,00	1	0	0	1	/
6561/05	2002	M	3,00	7,00	1	0	1	0	/
721/96	1993	Ž	3,00	16,00	1	0	T	T	T
957/90	1998	Ž	2,00	0,70	0	1	/	/	/
96/98	1993	M	5,00	6,00	0	0	0	0	1
9627/06	2000	M	6,00	6,00	1	0	/	/	/
1	2011	M	0,40		1	0	0	0	0
2	2011	M	0,90		1	0	1	0	0
3	2007	M	1,60		1	0	1	0	0
4	2000	M	7,20		1	0	1	0	0
5	2009	Ž	1,62		1	0	0	0	0
6	2011	Ž	0,45		1	0	1	0	0
7	2010	Ž	0,94		1	0	0	0	0

Legenda:

Preživetje bolnikov: 1-živi, 0-mrtvi

Ploidnost: 3n/5n-1. 2n-0

Delecija 1p: prisotna-1, odsotna-2

Delecija 11q: prisotna-1, odsotna-1

Spol: M-moški, Ž-ženska