

Ekspresija čimbenika stanične smrti u neuroblastomu

Bogović, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:181100>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Marko Bogović

**EKSPRESIJA ČIMBENIKA STANIČNE SMRTI
U NEUROBLASTOMU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Marko Bogović

**CELL-DEATH FACTORS EXPRESSION
IN NEUROBLASTOMA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013.

“Ovaj je doktorski rad izrađen u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, pod vodstvom mentora prof. dr. sc. Tomislava Luetića i prof. dr. sc. Ines Mrakovčić-Šutić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu“.

Iskrenu zahvalnost izražavam mentorima, prof. dr. sc. Tomislavu Luetiću i prof. dr. sc. Ines Mrakovčić-Šutić na stručnim i znanstvenim savjetima u provedbi istraživanja.

Hvala mojim kolegama i prijateljima, dr. Luki Brčiću, dr. Suzani Sršen Medančić i dr. Stanku Čavaru na poticanju i velikoj pomoći u izvedbi disertacije.

Hvala mojoj obitelji, sestri Anamariji, a najviše mojima Tajani i Marti čije vrijeme sam „posudio” tijekom izrade disertacije.

EKSPRESIJA ČIMBENIKA STANIČNE SMRTI U NEUROBLASTOMU

Marko Bogović
KBC Zagreb

Cilj istraživanja bio je utvrditi povezanost između ekspresije čimbenika stanične smrti – Fas, FasL, perforina i HSP70 i bioloških karakteristika neuroblastoma.

Uključena su sva djeca s dijagnozom neuroblastoma operirana na KBC Zagreb u razdoblju od 1994. do 2013. godine, a kriterije je zadovoljilo 42 ispitanika. Na parafinskim blokovima izuzetim prije početka kemoterapije imunohistokemijskim bojanjem određen je izražaj Fas i FasL molekule na stanicama neuroblastoma, broj citotoksičnih T limfocita u okolini stanica neuroblastoma, izražaj perforina na citotoksičnim T limfocitima te izražaj HSP70 na stanicama neuroblastoma.

Utvrđeno je da je Fas smanjeno izražen na metastatskim stadijima tumora pa se može pretpostaviti da tumor smanjenjem ekspresije Fas-a na svojoj površini može izbjeći lokalni odgovor imunološkog sustava i tako metastazirati. Također je utvrđena povezanost ekspresije HSP70 i stadija neuroblastoma. Viši stadiji imaju smanjenu ekspresiju što je u suprotnosti s većinom tumora koji su do sada istraživani, no s druge strane se slaže s istraživanjima na neuroblastomu, drugom najčešćem solidnom tumoru dječje dobi. Najvjerojatnije objašnjenje, prema dosadašnjim istraživanjima, je da kod tumora dječje dobi sudjelovanje HSP70 u inhibiciji apoptoze nije toliko značajno kao sudjelovanje u diferencijaciji tumora te da njegova pojačana ekspresija u neuroblastoma dovodi do sazrijevanja tumora.

Ključne riječi: neuroblastom, Fas, FasL, perforin, HSP70, citotoksični T limfociti

Mentori: *prof. dr. sc. Tomislav Luetić*
prof. dr. sc. Ines Mrakovčić-Šutić

Ocjenjivači: *prof.dr.sc. Andreja Ambriović Ristov*
prof.dr.sc. Sonja Levanat
prof.dr.sc.Maja Matulić

CELL-DEATH FACTORS EXPRESSION IN NEUROBLASTOMA

Marko Bogović
KBC Zagreb

The aim of this study was to investigate the correlation between the expression of cell death factors - Fas, FasL, perforin and HSP70 and biological characteristics of neuroblastoma.

All children diagnosed with neuroblastoma operated at KBC Zagreb in the period since 1994. to 2013. were included and 42 of them met our criteria. On paraffin blocks excluded before the start of chemotherapy through immunohistochemical staining the expression of Fas and FasL molecules on neuroblastoma cells, the number and expression of perforin on cytotoxic T lymphocytes in the vicinity of neuroblastoma cells and expression of HSP70 in neuroblastoma cells was analyzed.

Reduced Fas expression was found in metastatic tumor stages so it can be assumed that by lowering expression of Fas on its surface, tumor can avoid the local immune response and thus metastasize. The connection of HSP70 expression and stage neuroblastoma is also found. Higher stages have decreased expression of which is in contrast with the majority of tumors that have been studied, but on the other hand agrees with research on nephroblastoma, the second most common solid tumor in children. The most likely explanation for that, according to available data and considering pediatric tumors, is that the role of HSP70 in inhibition of apoptosis is not as important as participation in the differentiation of the tumor and its overexpression in neuroblastoma leads to the maturation of the tumor.

Keywords: neuroblastoma, Fas, FasL, perforin, HSP70, cytotoxic T cells

Supervisors: *prof. dr. sc. Tomislav Luetić, spec.dječje*
prof. dr. sc. Ines Mrakovčić-Šutić

Reviewers: *prof.dr.sc. Andreja Ambriović Ristov*
prof.dr.sc. Sonja Levanat
prof.dr.sc.Maja Matulić

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Cilj rada	3
2	LITERATURNI PREGLED	5
2.1	Neuroblastom.....	5
2.1.1	Masovni probir	5
2.1.2	Kliničke karakteristike neuroblastoma.....	6
2.1.3	Dijagnoza	7
2.1.4	Procjena proširenosti	8
2.1.5	Procjena rizika.....	8
2.1.6	Stadiji	9
2.1.7	Biološke prognostičke varijable	14
2.1.7.1	Histologija.....	14
2.1.7.2	Dob u vrijeme postavljanja dijagnoze.....	17
2.1.7.3	Onkogen <i>MYCN</i>	17
2.1.8	Rizične skupine	18
2.1.9	Spontana regresija neuroblastoma.....	19
2.2	Imunosni sustav i tumor	20
2.2.1	Apoptoza – programirana smrt stanice.....	20
2.2.2	Citotoksični T limfociti	23
2.2.3	Interakcija imunskog sustava i tumora.....	24
2.2.3.1	Fas/FasL sustav (smrt stanice putem receptora).....	26
2.2.3.2	Perforin (smrt stanice putem citotoksičnih granula).....	28
2.2.3.3	Protein toplinskog šoka - HSP70	32
3	MATERIJALI I METODE	33

3.1	Materijal.....	33
3.2	Imunohistokemijske metode.....	33
3.3	Ispitanici	36
3.4	Statističke metode.....	41
4	REZULTATI.....	42
5	RASPRAVA.....	59
6	ZAKLJUČAK	64
7	LITERATURA.....	65
8	POPIS KRATICA	86
9	ŽIVOTOPIS	88

1 UVOD

Neuroblastom je, nakon tumora središnjeg živčanog sustava, najčešći solidni tumor u dječjoj dobi. Podrijetlom iz neuralnog grebena, ovaj tumor može se javiti u nadbubrežnoj žlijezdi i duž simpatičkog lanca, od vrata do zdjelice. Zbog vrlo varijabilnog kliničkog tijeka, kao i zbog otkrivanja većine tumora u višim stadijima bolesti, prognoza i liječenje neuroblastoma kod djece su još uvijek vrlo neizvjesni (1, 2). Ono što je posebno značajno za neuroblastom, što ga razlikuje od svih ostalih zloćudnih tumora, je već spomenuti izrazito varijabilan klinički tijek – od brzog progresivnog oblika s metastazama u druga tkiva do spontane regresije tumora bez primjene ikakvog oblika liječenja. Unatoč kombiniranju brojnih poznatih biomarkera, kao i kliničkih i histoloških značajki neuroblastoma u traganju za optimalnom terapijskom strategijom još uvijek postoji mnogo mogućnosti za poboljšanje, odnosno za istraživanje novih čimbenika koji bi omogućili novi dijagnostičko-terapijski pristup (3-7).

Postoje brojni dokazi da se interakcija tumora i imunskog sustava događa putem programirane stanične smrti – apoptoze. To je put kojim imunski sustav uklanja tumorske stanice, ali i put kojim mu se one „skrivaju” pa ga čak i napadaju. Također je dobro poznata uloga apoptoze u embrionalnom razvoju, pa obzirom da se neuroblastom javlja u ranoj životnoj dobi neki autori predlažu teoriju prema kojoj se kod spontane regresije tumora u stvari radi o zakašnjoj, normalnoj reakciji na apoptozu.

Apoptoza ili programirana stanična smrt sastavni je dio održavanja homeostaze organizma, remodeliranja tkiva tijekom razvoja, kao i obrane od uzročnika infekcija i prevencije nastajanja tumora. Jedan od načina pokretanja apoptoze je aktivacija Fas i FasL proteina. Membranski protein Fas (Apo-1 ili CD95) član je porodice proteina TNF (čimbenik nekroze tumora) i NGF (čimbenik rasta živaca). Otkriven je kao pokretač apoptoze u stanici nakon vezivanja određenih protutijela na njega. Nakon toga je otkrivena ekspresija molekule Fas na brojnim stanicama imunskog, ali i stanicama ostalih sustava. Novija istraživanja su otkrila FasL kao čimbenik koji se veže na Fas molekulu i aktivira kaskadu koja dovodi do aktivacije domene smrti koja aktivira nizvodne signalne puteve i kaspaze-3, koja uzrokuje razgradnju bjelančevina i staničnu smrt. Citotoksični T limfociti (CTL) se putem FasL vežu na tumorske stanice na kojima se nalazi izražena Fas molekula i tako dovode do apoptoze tumorskih stanica. Tumorske stanice u ovom sustavu mogu izbjeći imunski odgovor posredovan CTL smanjenom ekspresijom Fas molekule ili čak, što je prvo dokazano kod

melanoma i hepatocelularnog karcinoma, ekspresijom proapoptotične molekule FasL na svojoj površini „napasti“ CTL-e koji imaju izražen Fas i u njima pokrenuti programiranu staničnu smrt. Ekspresija Fas i FasL proteina na stanicama tumora može se povezati s njihovim histološkim i biološkim karakteristikama (8-14).

Malobrojni su objavljeni radovi koji govore o izraženosti proteina Fas i FasL kod neuroblastoma (15). Prema dosadašnjim radovima u području tumorske imunologije niži stadiji tumora imaju pojačanu ekspresiju Fas molekule na svojoj površini što ih čini osjetljivijim na FasL pozitivne NK stanice te se ekspresija Fas molekule može dovesti u korelaciju s određenim karakteristikama tumora (16-22).

Među najčešće istražene apoptotičke mehanizme ubrajaju se receptori smrtnosti Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5, TRAIL-R3, TRAIL-R4 koji se vežu za svoje ligande (FasL, TNF, TWEAK I TRAIL) i započinju unutarstanični prijenos signala do konačnog ishoda, a to je smrt stanice (5). Svoju citolitičku aktivnost stanice ostvaruju i putem unutarstanične molekule perforina, koji se oslobađa iz ubilačke stanice, stvara pore na membrani ciljne stanice kroz koju ulazi izvanstanična tekućina i serinske esteraze u stanicu. Posljedica je smrt ciljne stanice uslijed osmotske lize stanice (nekroza), odnosno uslijed fragmentacije DNA serinskim esterazama ili drugim apoptotičkim molekulama pohranjenim u zrcima citolitičkih stanica (apoptoza) (3, 4). Još jedan potencijalni, nezavisni put stanične smrti je preko proteina toplinskog šoka, HSP70, kojem je jedna od funkcija pomaganje transporta proteina u stanicu. Jedna studija na kulturama stanica je pokazala da bi i ovim putem, neovisno o perforinu, proteolitički enzimi – granzimi mogli ulaziti u stanicu (6).

1.1 Cilj rada

Istraživanje obuhvaćeno ovom doktorskom dizertacijom polazi od pretpostavke da je ekspresija čimbenika stanične smrti povezana s biološkim karakteristikama neuroblastoma. Obzirom da je Fas/FasL sustav jedan od načina tumorskog bijega od obrambenog mehanizma organizma i načina izazivanja apoptoze citotoksičnih T limfocita (CTL), pretpostavlja se da će u okolini stanica neuroblastoma s jačom FasL ekspresijom biti manje CTL-a i obrnuto. Stoga je cilj ovog istraživanja bio odrediti koliki se broj citotoksičnih T limfocita nalazi u okolini stanica neuroblastoma. Sljedeća pretpostavka bila je da metastaza neuroblastoma ima pojačanu ekspresiju FasL koji joj omogućava izbjegavanje imunskog odgovora organizma.

Fas/FasL sustav ima značajnu ulogu u induciranju stanične smrti. CTL imaju na svojoj površini FasL i ako se on veže na Fas na ciljnoj stanici dolazi do aktivacije kaskade koja za posljedicu ima programiranu smrt stanice, odnosno apoptozu. Jedan od načina na koji se ciljna stanica, u ovom slučaju tumorska, može obraniti od ovog prirodnog obrambenog mehanizma je smanjenjem ekspresije Fas-a na površini stanice, ili povećanjem ekspresije molekule FasL, tzv. „tumorski protunapad“ na citotoksične T limfocite koji na svojoj površini imaju izražene Fas receptore. Ovakav bijeg i protunapad tumorskih stanica od obrambenog mehanizma imunskog sustava, prema novim istraživanjima, jedan je od mogućih mehanizama razvoja tumora. Pretpostavka je da agresivniji tumori, odnosno tumori višeg stadija imaju smanjenu ekspresiju Fas-a na površini stanica kao i pojačanu ekspresiju FasL. Također je pretpostavka da je broj CTL-a u mikrookolini agresivnijeg tumora, odnosno tumora višeg stadija manji. Još je jedna pretpostavka ovog istraživanja, a obzirom da do sada nema na ovaj način provedenog istraživanja, da će se ekspresija citolitičke molekule perforina na citotoksičnim T limfocitima u okolini tumora mijenjati ovisno o karakteristikama tumora, tj. biti povećana kod agresivnijih oblika tumora. Sljedeća pretpostavka je da će veća ekspresija HSP70 biti kod agresivnijih tumora obzirom da je jedan od glavnih učinaka HSP70 inhibicija apoptoze (tako je kod većine tumora iako ima pojedinih kod kojih je njegova ekspresija manja što je tumor agresivniji što će se kasnije pokušati pojasniti). U okviru istraživanja napraviti će se i analiza na dostupnim metastazama neuroblastoma s ciljem da se dobiju osnovne pretpostavke za daljnja istraživanja obzirom da će se raditi o malom uzorku.

U svrhu provjere hipoteze ciljevi ove doktorske disertacije su:

- odrediti ekspresiju Fas i FasL molekule na stanicama neuroblastoma,
- odrediti broj CTL-a u okolini stanica neuroblastoma i na njima odrediti ekspresiju perforina
- odrediti ekspresiju HSP70 na stanicama neuroblastoma.

Ekspresija navedenih parametara bit će određena imunohistokemijskim bojanjem specifičnim monoklonskim protutijelima.

Konačni cilj je utvrditi postoji li povezanost dobivenih vrijednosti i izuzetih histoloških i bioloških parametara i postoje li razlike dobivenih vrijednosti i izuzetih histoloških i bioloških parametara te na taj način dobiti bolji uvid u prirodu ovog tumora, odnosno novi biološki pokazatelj koji može pomoći u dijagnostici i liječenju.

2 LITERATURNI PREGLED

2.1 Neuroblastom

Neuroblastom je, nakon tumora središnjeg živčanog sustava, najčešći solidni tumor dječje dobi. To znači da obuhvaća oko 7% svih malignih bolesti u djece mlađe od 15 godina te 15% svih pedijatrijskih onkoloških uzroka smrti. U Hrvatskoj se godišnje otkrije 5 do 6 novih slučajeva neuroblastoma. Ono što neuroblastom čini posebnim jest njegov izrazito varijabilan i nepredvidiv klinički tijek. Naime, postoje tipovi koji spontano regresiraju i oni koji su visoko rezistentni na sve oblike liječenja.

Nekoliko je pretpostavki zašto dolazi do spontane regresije neuroblastoma. Jedna je da do toga dolazi zbog imunskog napada, odnosno dobrog imunskog odgovora organizma. Sljedeća pretpostavlja da dolazi do spontane diferencijacije, tj. sazrijevanja tumora. Posljednja teorija o tome zašto dolazi do spontane regresije jest da se u stvari radi o normalnom, ali zakašnjelom razvojnom signalu za apoptozu. Naravno da su zbog toga čimbenici diferencijacije i apoptoze predmet brojnih istraživanja, ne samo zbog moguće bolje dijagnostike već i zbog toga što bi poticanje, odnosno regulacija tih apoptotičkih mehanizama moglo pridonijeti liječenju tumora. Zbog vrlo varijabilnog kliničkog tijeka i jer se većina tumora otkriva u višim stadijima bolesti, prognoza i liječenje su još uvijek vrlo neizvjesni za djecu oboljelu od neuroblastoma. Podrijetlom iz neuralnog grebena, ovaj tumor se može javiti u nadbubrežnoj žlijezdi i duž simpatičkog lanca, od vrata do zdjelice (3-7).

2.1.1 Masovni probir

Osamdesetih godina prošlog stoljeća u Japanu je započeo program masovnog probira neuroblastoma. Ideja i cilj ovog probira bila je otkriti tumor u što ranijem stadiju i tako povećati postotak izliječene djece. Probir se sastojao u tome da se dojenčadi u dobi od 6 mjeseci određivala razina vanilmandelične (VMA) i homovanilične (HVA) kiseline u urinu. Na ovaj način otkrio se velik broj neuroblastoma sa značajno boljim preživljenjem u odnosu na pacijente koji su imali kliničku sliku i koji su dokazani do tada uobičajenim dijagnostičkim postupcima. Ovaj japanski model je udvostručio incidenciju neuroblastoma u dojenčadi (djece do godine dana života), ali nije smanjio broj slučajeva u djece starije od godinu dana niti popravio njihovo preživljenje. Sawada i suradnici govore o 96% preživljenju u 170 slučajeva neuroblastoma otkrivenih probirom (23). Ovi rezultati upućuju na to da su tumori otkriveni

probirom bili biološki povoljni i da bi dio njih spontano regredirao. Međutim, mali broj probranih tumora je bio s nepovoljnim karakteristikama i lošom prognozom, dok je nekoliko pacijenata promaklo probiru, a kasnije, u dobi od 12 do 18 mjeseci razvilo visoko agresivni oblik neuroblastoma. Može se primjetiti da je masovni probir ipak pridonio boljem razumijevanju prirode, odnosno ponašanja neuroblastoma, u prvom redu o njegovoj mogućoj spontanoj regresiji. Jedna kanadska prospektivna populacijska studija je uspjela svesti broj lažno pozitivnih rezultata na minimum, ali je s druge strane imala osjetljivost od samo 45 posto (24). Njemačko je istraživanje identificiralo 149 djece s neuroblastomom od 1800 ispitivane, što je prediktivna vrijednost od 8 posto (25). Njihova procjena je da bi oko dvije trećine ovako otkrivenih tumora regrediralo spontano, a potencijalni rizik od predijagnosticiranja i nepotrebnog liječenja naglašen je činjenicom da je troje djece iz ove skupine s lokaliziranom bolesti podleglo zbog komplikacija uzrokovanih liječenjem. I druge su sjevernoameričke i europske studije upozorile na opasnost od predijagnosticiranja i nepotrebnog liječenja, dok su neke druge pokazale da uz pažljivo praćenje dvije trećine tumora ili regredira ili prijeđe u zreli oblik bez ikakve terapije. Medicinski i psihološki razlozi, osobito kod djece i roditelja koja su primila nepotrebnu terapiju dovelo je do prekidanja programa probira širom svijeta. I Japansko ministarstvo zdravstva je 2004. godine, kao i ostale zemlje ukinulo posljednji program masovnog probira neuroblastoma (26).

2.1.2 Kliničke karakteristike neuroblastoma

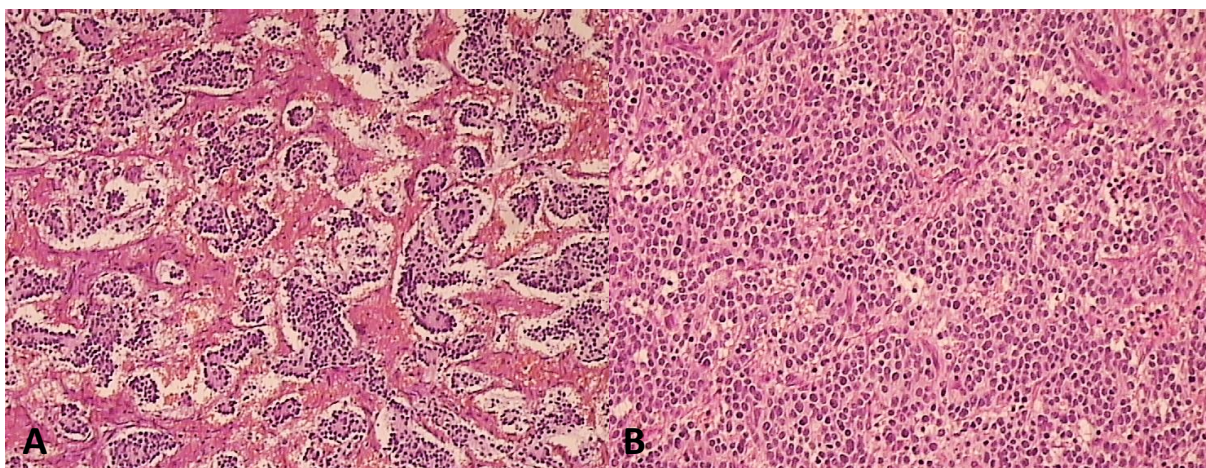
Neuroblastom je tumor s raznovrsnim kliničkim prezentacijama, što ovisi o lokalizaciji primarnog tumora, prisutnosti metastaza i o prisutnosti aktivnih razgradnih produkata. Oko dvije trećine svih opisanih neuroblastoma se javlja kao palpabilna intraabdominalna tvorba. Sama tvorba može biti tvrda, fiksirana, čvorasta, bolna na palpaciju. Iz našeg iskustva, kod jednog bolesnika imali smo palpabilnu intraabdominalnu tvorbu iako je MR abdomena pokazivao samo malu reziduu smještenu infrarenalno, paraaortalno. Tijekom kirurškog zahvata se vidjelo da su palpabilnu tumorsku tvorbu činila sva tanka crijeva smještena unutar paraduodenalne (mezokolične) hernije. Kod bolesnika mogu biti prisutni i neki opći simptomi poput gubitka težine, zaostanka u rastu, boli u trbuhu, vrućice i anemije koja je često povezana s invazijom koštane srži (27-29). Arterijska hipertenzija može se zamijetiti kod 25% pacijenata, a vjeruje se da je povezana, odnosno uzrokovana katekolaminima koje proizvodi tumor. Izrazito visoka produkcija katekolamina može dovesti

do crvenila, znojenja i iritabilnosti. Također su opisane situacije spontane rupture tumora s masivnim retroperitonealnim i intraabdominalnim krvarenjem, kao i patološki prijelomi dugih kostiju uzrokovani metastazama tumora (30, 31). Tumori koji imaju ishodište u vratu ili gornjem medijastinumu mogu zahvaćanjem stelatnog ganglija uzrokovati Hornerov sindrom (ptoza, mioza, anhidroza) (28). Metastaze u koštane dijelove orbite mogu dovesti do ehimoze i takozvanih „rakunovih“ očiju. Ovaj nalaz u djeteta koje u anamnezi nema podatak o traumi, visoko je suspektan na maligno oboljenje. Tumori smješteni u medijastinumu mogu uzrokovati respiratorne smetnje ili disfagiju zbog kompresije okolnih struktura. Širenje medijastinalnog ili retroperiotnealnog tumora u spinalni kanal može uzrokovati paraplegiju (32-34). Jedna od neobičnih prezentacija medijastinalnih neuroblastoma je akutna cerebelarna ataksija karakterizirana opsomioklonusom i nistagmusom (sindrom plešućeg oka) i nije povezana s metastazama, a u nekim slučajevima zaostaje i nakon regresije tumora (35). Nije poznat mehanizam takve prezentacije, a neki radovi predlažu teoriju o autoimunom odgovoru. Ponekad tumori luče i vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) pa se kod djeteta javljaju eksplozivne, vodenasto proljevaste stolice i hipokalemija (36).

Neuroblastom se širi lokalno, prema i u okolne strukture, limfogeno i hematogeno. Najčešće su zahvaćeni regionalni limfni čvorovi, jetra, koštana srž i korteks kosti. Ove posljednje imaju jako lošu prognozu (28, 37, 38). Također, metastaze u kosti mogu biti izrazito bolne pa se ponekad prvo posumnja na osteomijelitis ili na neki primarni koštani tumor poput Ewingovog sarkoma. Iako rijetko, dijete u podmaklom stadiju bolesti sa značajnom zahvaćenošću koštane srži i jetre može imati poremećaj zgrušavanja. Brojne potkožne metastaze i hepatomegalija se vidi kod djece s IVs stadijem. Metastaze, i posljedični simptomi, u pluća i mozak su rijetke (39, 40).

2.1.3 Dijagnoza

Dijagnoza neuroblastoma se postavlja na temelju karakterističnih patohistoloških značajki (Slika 1.) uz povišene razine katekolamina u urinu (41). Visoko rizični pacijenti često imaju povišenu serumsku razinu laktat dehidrogenaze, feritina i kromogranina. To su dosta nespecifični pokazatelji i nisu neovisni prognostički čimbenici, osobito kada ih se uspoređi s drugim biološkim pokazateljima (42-44). Biopsiju tumora se preporuča učiniti u svim slučajevima jer su za preciznu terapijsku strategiju nužni dobra patohistološka i molekularno-biološka analiza uzorka.



Slika 1. Histološki prikaz neuroblastoma: A: brojne Homer-Wright-ove rozete (tumorske stanice oko neuropila), B: isti tip malih, plavih okruglih stanica u solidnim nakupinama (Hemalaun-eosin, objektiv x20)

2.1.4 Procjena proširenosti

Kompjutorizirana tomografija (CT) preporučena je metoda obrade tumora smještenih u medijastinumu, abdomenu i zdjelici. Magnetna rezonanca (MR) je bolja za paraspinalne lezije, odnosno nužna za procjenu intraforaminalnog, odnosno intramedularnog širenja tumora (29).

2.1.5 Procjena rizika

Svrstati bilo koji tumor u neki stadij ili rizičnu skupinu izrazito je važno jer to određuje i prognozu i terapiju koja će se odabrati i primijeniti. Za neuroblastom je to posebno teško, teže nego kod ostalih tumora jer mogu postojati lokalno ograničeni tumori s lošim ishodom unatoč primjeni svih poznatih, agresivnih oblika liječenja, kao i diseminirani tumori koji spontano prolaze bez ikakve terapije. Jasan je stoga trud i nastojanja brojnih istraživača i studija da nađu što pouzdanije kriterije kako bi se određeni tumor svrstao u ispravnu skupinu.

2.1.6 Stadiji

U prošlosti su korišteni razni načini stupnjevanja neuroblastoma – uključujući Evans-ove kriterije koje je koristila klasifikacija organizacije *Children's Cancer Group* (CCG), Organizacija *Pediatric Oncology Group* (POG) primijenjivala je *St. Jude* kriterije, dok je standardnu klasifikaciju TNM (tumor, limfni čvor, metastaza) primijenjivala organizacija *International Union Contra Cancer in Europe*. Japan je imao svoj sustav stupnjevanja (29, 45). Ovi svi načini stupnjevanja su se slagali u procjeni lokalno ograničenih resektabilnih tumora, a razilazili u pogledu zahvaćenosti limfnih čvorova i metastaza i njihovom značaju na stadij, odnosno i na tip liječenja i prognozu. Zbog toga je 1988. godine razvijen međunarodni sistem (INSS – *International Neuroblastoma Staging System*) sa zajedničkim setom kriterija koji bi se primjenjivali svugdje u svijetu i time omogućavali skupljanje veće količine podataka o tumoru i njihovu točnu usporedbu (46). INSS koristi određene dijelove sustava POG i CCG kako bi odredio različite prognostičke skupine. INSS kriteriji su revidirani 1993. godine, a 2001. godine su se sustavi CCG i POG spojili s kriterijima skupine *National Wilms' Tumor Study* (NWTS) i *The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group* (IRSG) kako bi oformili skupinu *Children's Oncology Group* (COG), koja danas koristi INSS za sve slučajeve neuroblastoma (29, 47) (Tablica 1.).

Tablica 1. Međunarodna klasifikacija stupnjeva neuroblastoma – *International Neuroblastoma Staging System (INSS)*

Stadij		
1	Makroskopski potpuna ekscizija lokaliziranog tumora s ili bez mikroskopski pozitivnih rubova	Negativni istostrani neadherentni limfni čvor(ovi) (limfni čvor(ovi) prirasli i uklonjeni u bloku s tumorom mogu biti pozitivni)
2A	Makroskopski nepotpuna ekscizija lokaliziranog tumora s ili bez mikroskopski pozitivnih rubova	Negativni istostrani neadherentni limfni čvor(ovi) (limfni čvor(ovi) prirasli i uklonjeni u bloku s tumorom mogu biti pozitivni)
2B	Makroskopski potpuna ili nepotpuna ekscizija lokaliziranog tumora	Pozitivni istostrani neadherentni limfni čvor(ovi), negativni limfni čvor(ovi) suprotne strane
3	a. Neresektibilni jednostrani tumor koji prelazi središnju liniju ili b. Lokalizirani jednostrani tumor ili c. Neresektibilni tumor u središnjoj liniji s obostranim širenjem	a. Pozitivni ili negativni regionalni limfni čvor(ovi) ili b. Pozitivni regionalni limfni čvor(ovi) suprotne strane ili c. Može biti „neresektibilan“ zbog obostrano pozitivnih limfnih čvor(ova)
4	Bilo koji primarni tumor sa zahvaćanjem udaljenih limfnih čvorova, kosti, koštane srži, jetre, kože i/ili drugih organa (osim 4S)	
4S	Bilo koji lokalizirani primarni tumor sa zahvaćanjem jetre, kože i/ili koštane srži (manje od 10% stanica) SAMO DJECA MLAĐA OD GODINE DANA	

Preuzeto iz: ref. 46, 47.

Međutim, obzirom da se kirurški pristup može razlikovati između pojedinih institucija, tako se i stadij INSS za bolesnika s lokalno ograničenim tumorom može razlikovati. S tim u vidu razvijen je dodatni predkirurški sistem stupnjevanja INRGSS (Tablica 2.) na temelju istraživanja koja je provela *The International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Study Group* (SIOPEN). Njihova opažanja su da se pomoću radioloških karakteristika primarnog tumora može procijeniti uspjeh i sigurnost kirurškog zahvata. Te radiološke karakteristike nazvane su slikovno određeni rizični čimbenici (engl. *image defined risk factors - IDRF*) (Tablica 2., Tablica 3.).

Tablica 2. Međunarodna klasifikacija stupnjeva neuroblastoma prema rizičnim skupinama -
The International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS)

Stadij		
1	Makroskopski potpuna ekscizija lokaliziranog tumora s ili bez mikroskopski pozitivnih rubova	Negativni istostrani neadherentni limfni čvor(ovi) (limfni čvor(ovi) prirasli i uklonjeni u bloku s tumorom mogu biti pozitivni)
2A	Makroskopski nepotpuna ekscizija lokaliziranog tumora s ili bez mikroskopski pozitivnih rubova	Negativni istostrani neadherentni limfni čvor(ovi) (limfni čvor(ovi) prirasli i uklonjeni u bloku s tumorom mogu biti pozitivni)
2B	Makroskopski potpuna ili nepotpuna ekscizija lokaliziranog tumora	Pozitivni istostrani neadherentni limfni čvor(ovi), negativni limfni čvor(ovi) suprotne strane
3	a. neresektabilni jednostrani tumor koji prelazi središnju liniju ili b. lokalizirani jednostrani tumor ili c. neresektabilni tumor u središnjoj liniji s obostranim širenjem	a. pozitivni ili negativni regionalni limfni čvor(ovi) ili b. pozitivni regionalni limfni čvor(ovi) suprotne strane ili c. može biti „neresektabilan“ zbog obostrano pozitivnih limfnih čvor(ova)
4	Bilo koji primarni tumor sa zahvaćanjem udaljenih limfnih čvorova, kosti, koštane srži, jetre, kože i/ili drugih organa (osim 4S)	
4S	Bilo koji lokalizirani primarni tumor sa zahvaćanjem jetre, kože i/ili koštane srži (manje od 10% stanica) SAMO DJECA MLAĐA OD GODINE DANA	

Preuzeto iz: ref. 39, 40.

Tablica 3. Slikovno određeni rizični čimbenici

Istostrano širenje tumora unutar dva tjelesna odjeljka	Vrat-prsište, prsište-trbuh, trbuh-zdjelica
Vrat	Tumor obuhvaća karotidnu i/ili vertebralnu arteriju i/ili unutarnju jugularnu venu Tumor se širi na bazu lubanje Tumor komprimira traheju
Vrat/prsište	Tumor obuhvaća korijen brahijalnog pleksusa Tumor obuhvaća subklavijske žile i/ili vertebralnu arteriju i/ili karotidnu arteriju Tumor komprimira traheju
Prsište	Tumor obuhvaća aortu i/ili velike ogranke Tumor komprimira traheju i/ili glavne bronhe Donji medijastinalni tumor, infiltriranje kosto-vertebralnog spoja između T9 i T12
Prsište/trbuh	Tumor obuhvaća aortu i/ili šuplju venu
Trbuh/zdjelica	Tumor infiltrira portu hepatis i/ili hepatoduodenalni ligament Tumor obuhvaća ogranke gornje mezenterične arterije u korijenu mezenterija Tumor obuhvaća polazište celijačnog trunkusa i/ili gornje mezenterične arterije Tumor invadira jedan ili oba bubrežna pedikla Tumor obuhvaća aortu i/ili šuplju venu Tumor obuhvaća ilijačne krvne žile Zdjelični tumor prelazi ishijadičnu incizuru
Širenje intraspinalnog tumora bilo koje lokacije pod uvjetom da:	Invadira više od jedne trećine spinalnog kanala u aksijalnoj ravnini i/ili perimedularni Leptomeningealni prostori nisu vidljivi i/ili abnormalan signal spinalne kralježnice
Infiltracija susjednih organa/strukture	Perikard, dijafragma, bubreg, jetra, duodeno-pankreatični blok i mezenterij
Stanja koja trebaju biti zabilježena, ali se ne smatraju IDRFs	Multifokalni primarni tumori Pleuralni izljev sa ili bez malignih stanica Ascites s ili bez malignih stanica

Preuzeto iz: ref. 39, 40.

2.1.7 Biološke prognostičke varijable

2.1.7.1 Histologija

Neuroblastom je građen od neuroblasta u raznim stupnjevima diferencijacije, sve do zrelih ganglijskih stanica, tako da je moguće unutar istog tumora naći sve oblike njegovog sazrijevanja. Neuroblasti se prepoznaju po malim okruglim jezgrama sa „zrnatim“ rasporedom kromatina („sol i papar“ u anglosaksonskoj literaturi), oskudnoj eozionofilnoj citoplazmi i nejasnim granicama među stanicama. Ponekad ga je histološki teško razlikovati od ostalih tumora malih plavih stanica. Postoji, s druge strane, podskupina neuroblastoma (8-10%) koji imaju velike stanice s dvostruko većim jezgrama od tipičnih neuroblasta i 1 do 4 jasno izražena velika nukleolusa. Ovakav histološki izgled se obično nalazi kod nediferenciranih ili loše diferenciranih tumora s *MYCN* amplifikacijom i lošom prognozom. Zrele ganglijske stanice se prepoznaju po velikoj, okrugloj jezgri s jasno izraženim jezgricama, i obilnoj eozinofilnoj citoplazmi u kojoj se mogu naći Nisslova tjelešca (hrapavi endoplazmatski retikulum s rozetama ribosoma). Okolno vezivno tkivo kod neuroblastoma također posjeduje određene specifičnosti: može se naći Schwannomska stroma (identificira se detekcijom proteina S100) i neuropili – nitasti stanični produžeci te ponekad i gusti limfoidni infiltrat.

Prema stupnju zrelosti neuroblasta i količini Schwannomske strome može se razlikovati sedam podtipova neuroblastičnih tumora (48, 49).

1. Nediferencirani neuroblastom – sastoji se u potpunosti od neuroblasta koji se ne diferencira u ganglijske stanice. Često je pripadnost neuroblastomu potrebno potvrditi imunohistokemijski. Schwannomska stroma je oskudna, odnosno čini manje od 50% okolnog veziva, a može biti i potpuno odsutna.
2. Slabo diferencirani neuroblastom – neuroblasti dominantni, zrelih ili ganglijskih stanica u sazrijevanju može biti do 5 posto. Prisutno je najmanje jedno žarište neuropila. Kao i kod nediferenciranog neuroblastoma, udio Schwannomske strome je manji od 50% ili je sasvim odsutna.
3. Diferencirajući neuroblastom – dominiraju neuroblasti, ali je udio zrelih ili ganglijskih stanica u sazrijevanju veći od 5 posto. Prisutno je najmanje jedno žarište

neuropila, a kao i kod prethodna dva tipa, udio Schwannomske strome je manji od 50% ili je sasvim odsutna.

4. Nodularni ganglioneuroblastom – dominiraju zrele ili ganglijske stanice u sazrijevanju, ali postoji barem jedna, dobro ograničena nakupina (nodus) rezidualnih neuroblasta (oni dobro koreliraju s hemoragičnim nodusima vidljivim na makropreparatu). Schwannomska stroma je obilna i čini preko 50 posto.
5. Miješani ganglioneuroblastom - dominiraju zrele ili ganglijske stanice u sazrijevanju, ali postoji jedno ili više žarišta rezidualnih neuroblasta pomiješanih s ganglijskim stanicama. Ta žarišta ne koreliraju s hemoragičnim nodusima vidljivim na makropreparatu, odnosno nemaju svoj makroskopski biljeg poput nodularnog ganglioneuroblastoma. Schwannomska stroma je obilna, čini preko 50 posto.
6. Ganglioneuroblastom u sazrijevanju – u cijelosti se sastoji od zrelih ili ganglijskih stanica u sazrijevanju, nema rezidualnih neuroblasta, nema hemoragičnih nodusa na makropreparatu, Schwannomska stroma je obilna, čini preko 50 posto.
7. Zreli ganglioneurinom – potpuno se sastoji od zrelih ganglijskih stanica. Nema rezidualnih neuroblasta niti prethodno opisanih makroskopskih značajki. Schwannomska stroma je obilna, čini preko 50 posto.

Tumore bogate stromom karakterizira obilna Schwannomska stroma i znakovi diferencijacije neuroblasta dok tumori siromašni stromom sadrže nezrele, nediferencirane stanice neuralnog grebena i imaju visok indeks mitoze i kariorekse (MKI). MKI je omjer broja stanica s fragmentacijom jezgre u mitozu i u nekrozi na 5000 stanica neuroblastoma. Ovisno o tome on može biti nizak (< 2% ili < 100/5000), srednji (2-4% ili 100-200/5000) i visok (> 4% ili > 200/5000). Njegova vrijednost je ovisna i o dobi tako da se za djecu stariju od 18 mjeseci on smatra visokim već kod 1 posto (48).

U današnje vrijeme dobro je poznato da histološke značajke neuroblastoma imaju važnu prognostičku vrijednost. Najkorisniji sistem podjele je klasifikacija koju je razvio Shimada na temelju svoje studije i pokazao povezanost histoloških karakteristika i kliničkog ponašanja tumora (48, 49).

Međunarodna patološka klasifikacija neuroblastoma (INPC – *The International Neuroblastoma Pathology Classification*) prihvatila je Shimadinu podjelu uz određene modifikacije. Tumori su svrstani u povoljne i nepovoljne ovisno o stupnju diferencijacije

neuroblasta, udjelu Scwannomske strome (*stroma-rich i stroma-poor*), indeksu mitoze i karioreksije i dobi djeteta u vrijeme postavljanja dijagnoze kao što prikazuju Tablica 4. i Tablica 5. (50). Ova klasifikacija je značajna i biološki i prognostički. Ona dodatno uvodi razliku unutar nediferenciranih tipova dijeleći ih na nediferencirane i slabo diferencirane, mijenja ime dobro diferenciranih tumora s puno strome u sazrijevujuće ganglioneuroblastome i dodaje podatak o količini strome. Također dodatno razlikuje nodularne ganglioneuroblastome analizirajući posebno neuroblastične noduse te ih dijeli na one s povoljnom i one s nepovoljnom histologijom (49, 50).

Tablica 4. Tumori s nepovoljnom histologijom po INPC klasifikaciji

Podtip tumora	MKI	Dob
Nediferencirani NB	Bilo koji	Bilo koja
Slabo diferencirani NB	Visoki	Bilo koja
Slabo diferencirani NB	Srednji	≥ 18 mjeseci
Slabo diferencirani NB	Niski	≥ 18 mjeseci
Diferencirajući NB	Visoki	Bilo koja
Diferencirajući NB	Srednji	≥ 18 mjeseci
Diferencirajući NB	Nije primjenjivo	≥ 5 godina
Nodularni ganglioneuroblastom*	Nije primjenjivo	Bilo koja

* najmanje jedan od neuroblastičnih nodula ima nepovoljne histološke karakteristike

Prilagođeno prema: ref. 50.

Tablica 5. Tumori s povoljnom histologijom po INPC klasifikaciji

Podtip tumora	MKI	Dob
Slabo diferencirani NB	Srednji	< 18 mjeseci
Slabo diferencirani NB	Nizak	< 18 mjeseci
Diferencirajući NB	Srednji	< 18 mjeseci
Diferencirajući NB	Nizak	< 18 mjeseci
Miješani ganglioneuroblastom	Nije primjenjivo	Bilo koja
Nodularni ganglioneuroblastom*	Nije primjenjivo	Bilo koja
Ganglioneurom	Nije primjenjivo	Bilo koja

* svi neuroblastični noduli imaju povoljne histološke karakteristike

Prilagođeno prema: ref. 50.

2.1.7.2 Dob u vrijeme postavljanja dijagnoze

Prije mnogo godina je primijećeno da dojenčad koja boluje od neuroblastoma ima bolju prognozu nego starija djeca, čak i uz minimalno liječenje. Jedna od prvih međunarodnih konferencija posvećenih neuroblastomu analizirala je više bioloških karakteristika i njihovu povezanost s ishodom. Među njima se posebno isticao obrnuto proporcionalni odnos dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze i ishoda liječenja. Trenutno prihvaćena i korištena dobna granica od 365 dana temelji se na istraživanjima i zapažanjima Breslowa i McCanna od prije više od 40 godina (51). Obzirom da se pokazalo da tumori neke djece i starije od godinu dana imaju jako dobar klinički tijek i ishod postavilo se pitanje je li ta granica sasvim točna i prihvatljiva za sve bolesnike. Preciznija dobna podjela mogla bi dovesti do toga da neki bolesnici do sada svrstavani u visoko rizične na temelju dobi budu ispravno stratificirani i tako dobiju manje štetnu terapiju. London i suradnici su 2005. godine revidirali studiju Breslowa i McCanna i pokazali da je dob i dalje nezavisni prognostički čimbenik, ali da i njegov utjecaj značajno slabi nakon druge godine života bolesnika (52). Analizom preko 3500 bolesnika u bazama podataka radnih skupina *Children's Cancer Group* i *Pediatric Oncology Group* pokazano je da bi granična vrijednost za dob mogla biti oko 18 mjeseci (53, 54). Iako postoje neka ograničenja, dok se ne nađe neki novi i pouzdaniji molekularni marker, dob će ostati značajan nezavisan prognostički pokazatelj (55, 56).

2.1.7.3 Onkogen *MYCN*

Jedna od najčešćih genetskih promjena opažena u solidnim tumorima je amplifikacija onkogeno. Neuroblastom je prvi tumor kod kojeg je identificirana amplifikacija gena *MYCN*. Kao posljedica amplifikacije dolazi do pojačane ekspresije proteina *MYCN* za kojeg je dokazano da vezanjem s drugim jezgrenim proteinima utječe na regulaciju genske ekspresije. Taj proteinski kompleks sprječava diferencijaciju stanice, potiče proliferaciju i olakšava smrt stanice zbog nestabilnosti DNA (karioreksa) (57). Amplifikacija *MYCN* je također prva promjena onkogeno za koju je dokazano da ima prognostičku vrijednost, da je statistički značajna, da predstavlja nezavisni prognostički parametar lošeg ishoda te da je njeno određivanje nužno za odabir terapijskog protokola. U gotovo jednoj trećini neuroblastoma može se naći amplifikacija onkogeno *MYCN*, a koja je direktno povezana s lošim ishodom. Brojne studije su jasno pokazale da amplifikacija *MYCN*-a ima jasan utjecaj na klinički agresivni tijek visokorizičnih tumora. Razina ekspresije *MYCN*-a direktno je povezana s

potencijalom rasta neuroblasta. Prihvaćena metoda izbora određivanja amplifikacije je metoda fluorescentne hibridizacije *in situ* (FISH, engl. *fluorescent in situ hybridization*) i amplificiranima se smatraju one tumorske stanice koje sadrže 10 ili više kopija *MYCN*-a (58-65).

2.1.8 Rizične skupine

Do sada opisane prognostičke čimbenike i klasifikacije koristi radna skupina *The Children's Oncology Group* (COG) kako bi djecu smjestila u tri različite rizične skupine: nisku, srednju i visoku. One nam služe za procjenu o tome kolika je vjerojatnost izliječenja i oblika primijenjenog liječenja za pojedino dijete. One su odraz trenutne razine znanja o neuroblastomu i njegovim biološkim pokazateljima. Kako se otkrivaju nove činjenice ove grupe će se zasigurno mijenjati. Tako se posljednja promjena odnosi na dobnu granicu koja je u određenima podskupinama podignuta s 12 mjeseci (365 dana) na 18 mjeseci (547 dana), Tablica 6. (66).

Tablica 6. Rizične skupine prema *The Children's Oncology Group* (COG)

INSS	Dob	MYCN amplifikacija	DNA ploidiija	Histologija (INPC)	Rizik
I	Bilo koja	Bilo koja	Bilo koja	Bilo koja	Nizak
IIa i IIb	< 365 dana	Bilo koja	Bilo koja	Bilo koja	Nizak
IIa i IIb	> 365 dana	Ne	Bilo koja	Bilo koja	Nizak
IVs	< 365 dana	Ne	Da	Povoljna	Nizak
III	< 547 dana	Ne	Bilo koja	Bilo koja	Srednji
III	> 547 dana	Ne	Bilo koja	Povoljna	Srednji
IV	< 365 dana	Ne	Bilo koja	Bilo koja	Srednji
IVs	< 365 dana	Ne	Normalna	I/ili povoljna	Srednji
IIa i IIb	> 365 dana	Da	Bilo koja	Bilo koja	Visoki
III	< 547 dana	Da	Bilo koja	Bilo koja	Visoki
III	> 547 dana	Da	Bilo koja	Bilo koja	Visoki
III	> 547 dana	Bilo koja	Bilo koja	Nepovoljna	Visoki
IV	Bilo koja	Da	Bilo koja	Bilo koja	Visoki
IV	> 547 dana	Bilo koja	Bilo koja	Bilo koja	Visoki
IV	>365 <547	Da	I/ili normalna	Nepovoljna	Visoki
IVs	< 365 dana	Da	Bilo koja	Bilo koja	Visoki

Preuzeto iz: ref. 66.

2.1.9 Spontana regresija neuroblastoma

Potpuno ili djelomično nestajanje malignog tumora bez aplikacije bilo kakve protutumorske terapije ili postupka naziva se spontanom regresijom (67). Iz dosadašnjih publikacija vidljivo je da 5 do 10% neuroblastoma regredira bez terapije, a tako visok postotak nije zabilježen niti kod jednog drugog tumora. Do spontane regresije najčešće dolazi kod pacijenata sa stadijem 4S (68, 69). Klinički se regresija tumora manifestira njegovim potpunim nestankom ili sazrijevanjem, odnosno prelaskom u zreli, benigni oblik ganglioneurom. Nužan je ipak oprez, budući da, iako izrazito rijetko, može doći do relapsa nakon spontane regresije (70).

Još uvijek ne postoji uniformni biološki marker ili prognostički čimbenik pomoću kojeg bi mogli sigurno prepoznati pacijente kod kojih će tumor spontano regresirati. Trenutno postoje tri hipoteze o tome na koji način dolazi do regresije: (I) imunosti napad na tumor, (II) spontana diferencijacija i (III) sazrijevanje i kašnjenje u normalnom razvojnom signalu za apoptozu (67, 71-73). Ovakva klinička raznolikost potiče na istraživanje čimbenika diferencijacije i apoptoze kako bi se bolje razumjela priroda neuroblastoma, brže ga se dijagnosticiralo i preciznije odredilo prognozu i liječenje.

2.2 Imunosni sustav i tumor

2.2.1 Apoptoza – programirana smrt stanice

Apoptoza je biološki fenomen u kojem aktivni, uređeni niz događaja dovodi do smrti stanice, stoga ju termin – programirana stanična smrt zorno opisuje. Ona je ključna za održavanje homeostaze u višestaničnim organizmima. U ranim fazama embrionalnog razvoja u sisavaca nužna je ravnoteža proliferacije stanice i smrti stanice kako bi nastali, odnosno kako bi se razvili organi normalne veličine i funkcije. Jedan dobar i jasan primjer je razvoj prstiju šake gdje do razdvajanja prstiju dolazi upravo apoptozom epitelnih stanica (74).

Onemogućavanje normalnog procesa apoptoze može dovesti do razvoja autoimunih bolesti i karcinoma, dok pojačana stimulacija apoptotskog mehanizma može dovesti do gubitka nekih stanica, na primjer neurona kod razvoja neurodegenerativnih i neuromuskularnih bolesti (5).

Apoptoza može biti pokrenuta na više načina. Različiti su aktivatori apoptoze: zračenje, citostatici i drugi putevi kojima nastaje oštećenje DNA, nedostatak čimbenika rasta, onkogeni, hipoksija, te aktivacija specifičnih receptora na površini stanice. Danas najbolje istraženi receptori čijom se aktivacijom može pokrenuti apoptoza su Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5, TRAIL-R3, TRAIL-R4 koji vezanjem liganda (FasL, TNF, TWEAK i TRAIL) započinju unutarstanično signaliziranje (5, 75, 76).

Glavni izvođači apoptoze su unutarstanični enzimi kaspaze. Kaspaze se unutar stanice nalaze u inaktivnom obliku, ali nakon primanja specifičnog signala, npr. nakon vezanja specifičnog liganda na receptor na staničnoj membrani, prelaze u aktivni oblik. Kaskadnim procesom aktivira se niz nizvodnih kaspaza te na kraju proteaze i nukleaze koje uzrokuju cijepanje specifičnih proteina, kondenzaciju kromatina i na kraju fragmentaciju jezgre i

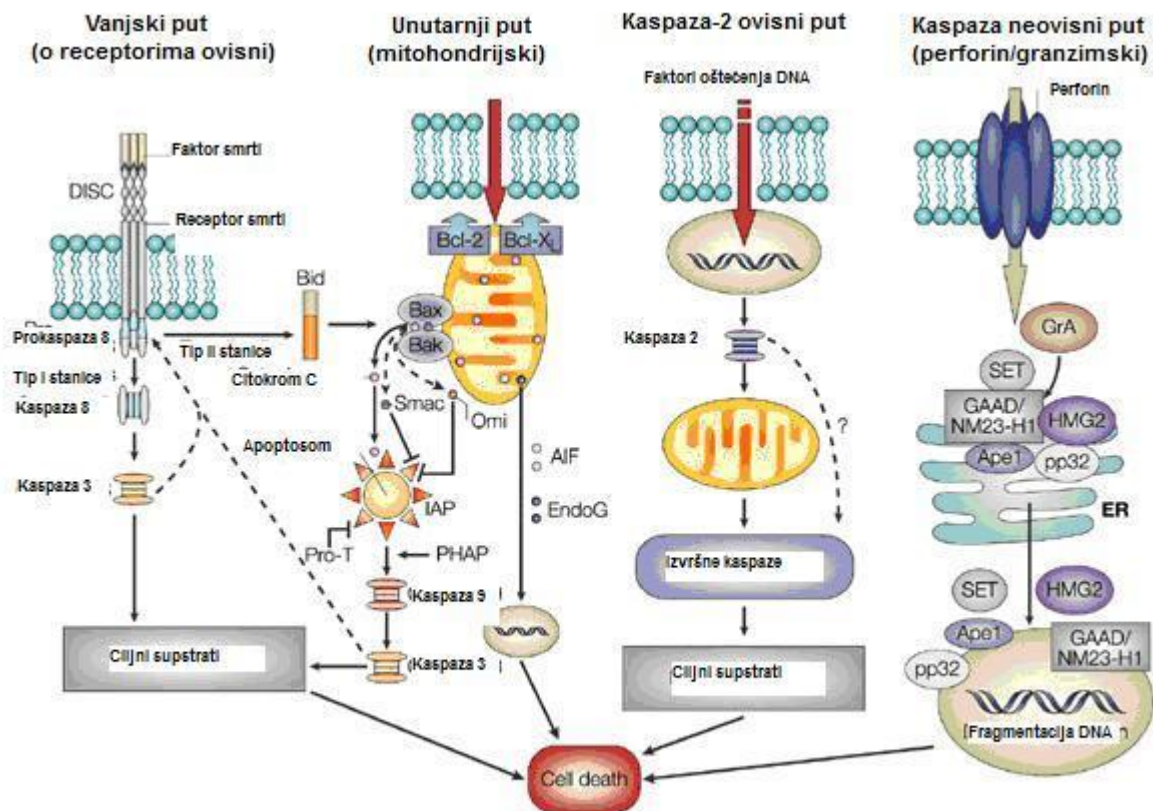
raspad stanice u apoptotska tjelešca. Sve to ima za posljedicu i specifične morfološke karakteristike stanice u apoptozi vidljive pod svjetlosnim mikroskopom (76-78).

Iako se mogu i preklapati, najčešće se opisuju vanjski i unutarnji put aktivacije apoptoze. Do danas su dobro opisana četiri apoptotska puta (Slika 2.) (79).

Vanjski, receptorski put, gdje nakon vezanja liganda na receptor dolazi do formiranja signalnog kompleksa koji inducira smrt, DISC-a (engl. *death-inducible signalling complex*) što za posljedicu ima aktiviranje prokaspaze 8. Kaspaza 8 može djelovati na dva načina. Može aktivirati prokaspazu 3 koja cijepa ciljane proteine i tako dovodi do apoptoze ili aktivirati jedan proapoptotički protein, Bid, koji tada inducira umetanje aktivatora nazvanog Bax u vanjsku mitohondrijsku membranu nakon čega slijedi oslobađanje citokroma c iz mitohondrija koji zajedno s čimbenikom aktivacije apoptoze Apaf 1 (engl. *apoptosis activating factor*) i prokaspazom 9 formira kompleksnu molekulu, apoptosom. Apoptosom tada aktivira prokaspazu 3 (79-83).

Kod unutarnjeg, mitohondrijskog puta, mitohondrij je direktno ili indirektno potaknut na proizvodnju apoptosoma. Ovaj put kontroliraju porodica Bcl-2 proteina (reguliraju otpuštanje citokroma c), inhibitori kaspaza IAP (engl. *inhibitor of apoptosis proteins*), zasebni mitohondrijski aktivatori kaspaza Smac i regulatori inhibitora kaspaza Omi120 (84, 85). Apoptosom je također pod utjecajem protoonkogenog protimozina alfa (Pro-T) i jednog tumor supresorskog proteina PHAP (engl. *putative HLA-DR-associated protein*) (86). Unutarnji put može biti i neovisan o kaspazama i odvijati se preko najmanje dva različita proteina, čimbenika indukcije apoptoze AIF (engl. *apoptosis inducing factor*) i endonukleaze G (*EndoG*) (87, 88).

Do danas znamo za još najmanje dva puta. Jedan je kaspaza-2 ovisni put kod kojeg oštećenje DNA dovodi do aktivacije prokaspaze 2, otpuštanja citokroma c i formiranja apoptosoma. Drugi je, kaspaza-neovisni, granzimski put, gdje granzim A (GrA) uz pomoć perforina dovodi do smrti stanice (89-92).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Slika 2. Unutarnji i vanjski putevi apoptoze

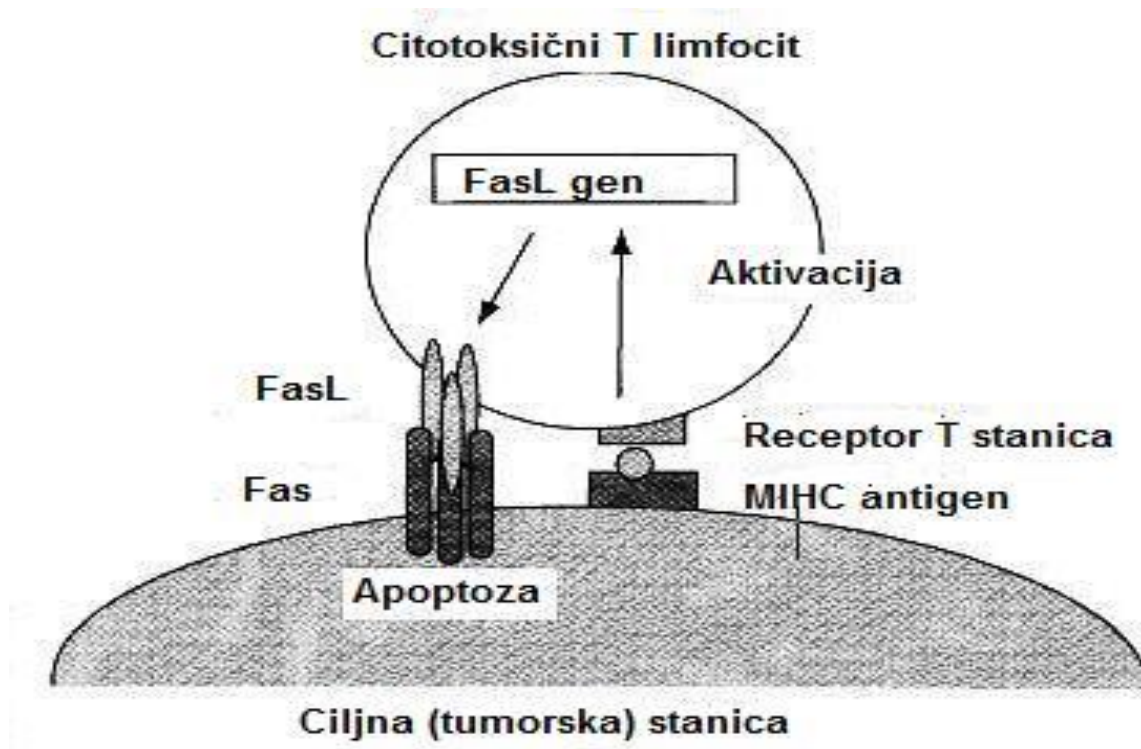
Preuzeto iz: ref. 79.

Dva su glavna razloga zašto su apoptoza, njeni mehanizmi, pokretači i izvršni čimbenici toliko zanimljivi istraživačima tumora, odnosno neuroblastoma. Prvi je što postoje teorije koje govore u prilog da je neuroblastom u stvari embrionalni tumor i da nastaje zbog poremećaja ili izostanka normalnog apoptotskog signala. Spontana regresija nekih oblika neuroblastoma bi stoga, prema nekim autorima, bila samo posljedica zakašnjelog normalnog razvojnog signala za apoptozu. Drugi razlog je što imunski sustav organizma preko citotoksičnih limfocita inducira apoptozu tumorskih stanica, iako i tumor može potaknuti apoptozu stanica imunskog sustava (93-96).

2.2.2 Citotoksični T limfociti

Citotoksični T limfociti (CTL) su stanice koje uništavaju stanice zaražene virusima, tumorske stanice, a sudjeluju i u odbacivanju transplantata. Oni su još poznati kao stanice pozitivne na CD8 obzirom da na svojoj površini imaju izražen glikoprotein CD8. Prepoznaju svoje ciljne stanice vezanjem na antigen povezan s glavnim sustavom tkivne snošljivosti, MHC I (engl. *major histocompatibility complex*). Mogu biti i inaktivirani putem nekih molekula kao što su interleukin-10 ili adozin koje luče regulatorne T stanice i na taj način spriječiti razvoj nekih autoimunih bolesti (97). Interakcija imunskog sustava i tumora odvija se putem brojnih i raznovrsnih stanica i efektorskih molekula. Obzirom da većina tumora eksprimira MHC I na površini svojih stanica, a uglavnom nema molekule MHC II potrebne za prepoznavanje T limfoicitima CD4, dominantne stanice, sposobne za prepoznavanje tumora su citotoksični T limfociti CD8+. Dodatna ekspresija adhezijskih molekula poput međustaničnih adhezijskih molekula (ICAM – engl. *intracellular adhesion molecule*) koje se vežu za transmembranski receptor LFA-1 (engl. *Lymphocyte function-associated antigen 1*) ključna je za prepoznavanje tumora od strane CTL-a. Konformacijska promjena LFA-1 nastat će nakon prepoznavanja specifičnog kompleksa MHC i to će pojačati adheziju tumorskih stanica i CTL-a (98, 99).

Dva su glavna puta kojima citotoksični T limfociti izvršavaju svoju funkciju: preko litičkih granula ili preko receptora stanične smrti (Slika 3.) (100). Litičke granule su modificirani lizosomi koji sadrže citotoksične proteine. Iako su oni (perforin, granzimi) pohranjeni u aktivnom obliku i učinkovito uništavaju ciljne stanice, nisu toksični za stanicu u kojoj se nalaze. Ranije se vjerovalo da je to zbog proteoglikana koji se vežu na citotoksične proteine zbog niskog pH unutar granula. Nakon oslobađanja iz granula raste pH okoline i tako nastaju uvjeti za raskidanje veze citotoksičnih proteina i proteoglikana (101-105). Ovaj mehanizam, međutim, ne objašnjava zašto su perforin i granzimi inaktivni tijekom sinteze kada prolaze kroz endoplazmatski retikulum gdje su i pH i koncentracija kalcijevih iona pogodni za njegovo djelovanje, odnosno raskidanje veze s proteoglikanima. Dokazana je i uredna funkcija stanica koje imaju manjak proteoglikana. Pretpostavka je da postoji dodatni mehanizam zaštite kao i drugi transportni put citotoksičnih proteina od mjesta sinteze do pohrane u granulama (106, 107).

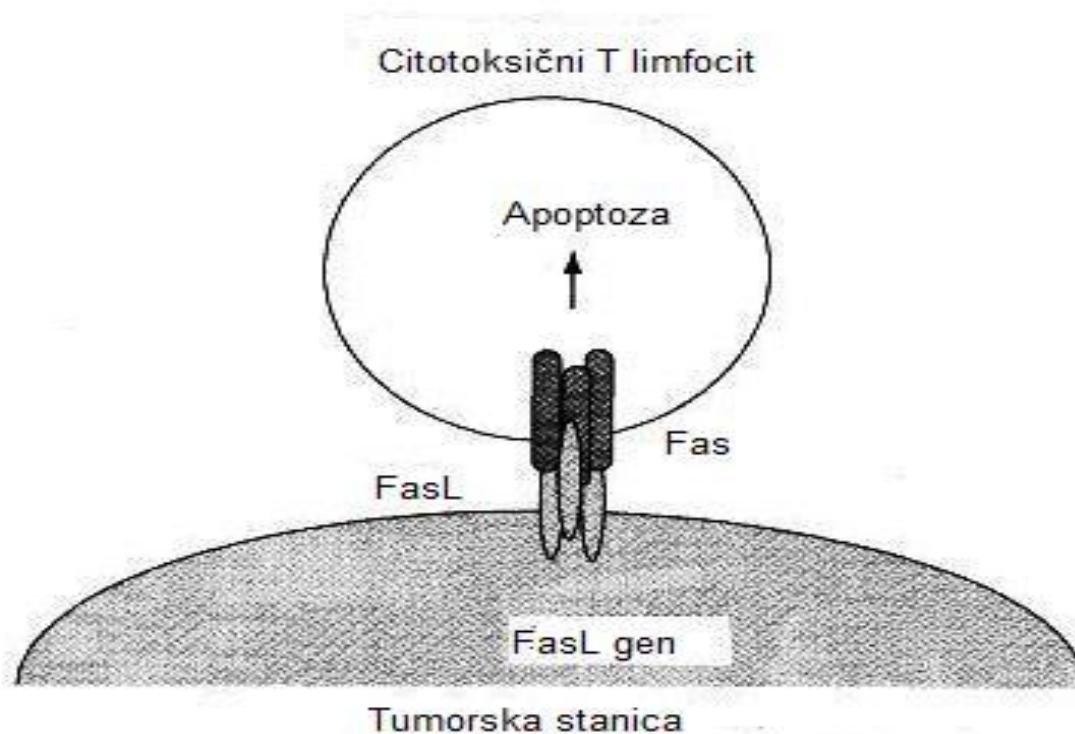


Slika 3. Uklanjanje tumorske stanice od strane CTL-a putem interakcije Fas/FasL

Preuzeto i modificirano iz: ref. 100.

2.2.3 Interakcija imunskog sustava i tumora

Važnu ulogu u nastanku tumora ima interakcija zloćudnih stanica i imunskog sustava. Ako imunski sustav ne prepozna promijenjenu stanicu i ne ukloni je, to može dovesti do razvoja tumora. S druge strane, tumorske stanice koriste različite mehanizme kako bi izbjegle imunski odgovor domaćina. Do sada poznate mehanizme su dobro opisali Igney i Krammer u svome radu (108, 109), a nama najzanimljiviji su mehanizam izbjegavanja apoptoze i mehanizam tumorskog protunapada. Sposobnost tumora, odnosno tumorske stanice da izbjegne imunskom sustavu je ključna za njegov nastanak i rast. Međutim, postoji i dodatno svojstvo tumorskih stanica, a to je da induciraju apoptozu aktiviranih limfocita koji infiltriraju tumor. Na taj način tumor napada obrambeni sustav organizma što se naziva „tumorskim protunapadom“ (8). Postoje dokazi da se ova interakcija tumora i imunskog sustava odvija putem sustava Fas/FasL (Slika 4.).



Slika 4. „Tumorski protunapad“ na CTL-e putem Fas/FasL interakcije
Preuzeto i modificirano iz: ref. 100.

Mehanizmi kojima tumori i drugi patogeni izbjegavaju odgovor imunskog sustava su opisani u brojnim radovima i o njima se još uvijek vodi rasprava (110-112). Ono što najviše zaokuplja pažnju je sposobnost tumora i virusa da prekinu puteve stanične smrti ovisne o receptorima smrti. Danas je također poznato da i putevi stanične smrti uzrokovani citotoksičnim granulama mogu biti zaustavljeni unutarstaničnim serpinima, serinskim inhibitorima proteaza. Otkriveno je da jedan od tih endogenih serpina, PI9, inhibira granzim B koji je jedan od izvršnih čimbenika apoptoze. Postoji teza da bi pojačanom ekspresijom PI9 stanica mogla blokirati granzim B i tako spriječiti svoje uništenje (113, 114). Naravno, iako brojni i različiti tumori u ljudi i miševa ekspimiraju serpine, još uvijek nema dokaza da je granzim B ključno oružje imunskog obrambenog sustava u eradikaciji tumora.

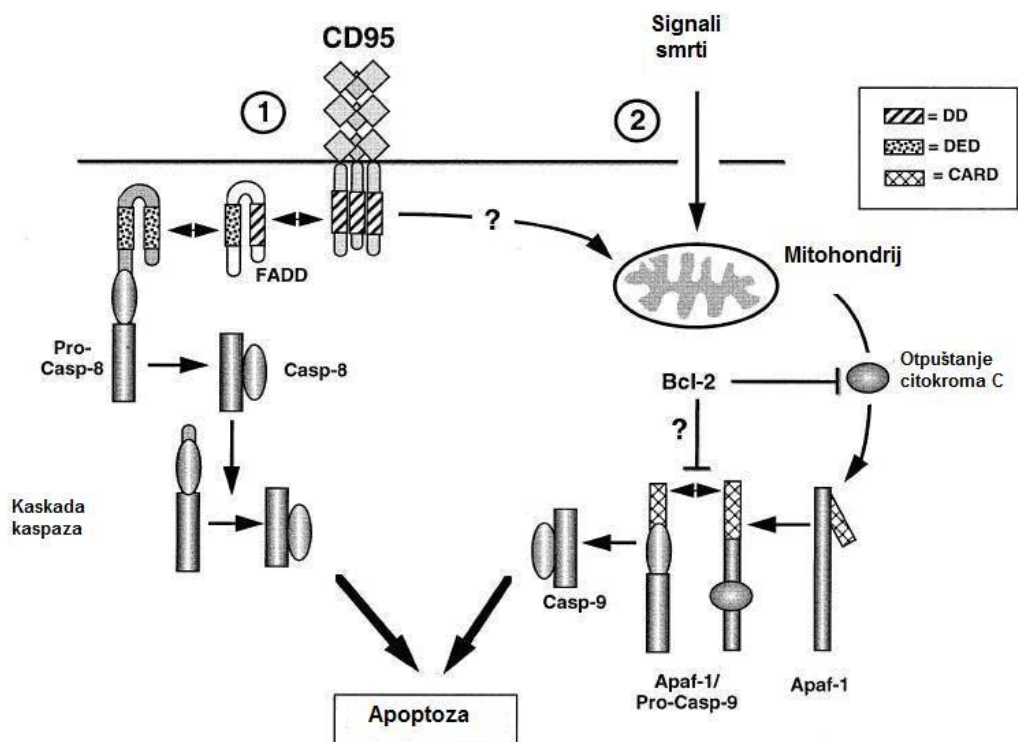
2.2.3.1 Fas/FasL sustav (smrt stanice putem receptora)

Jedan od prvih otkrivenih i dobro proučenih puteva pokretanja apoptoze općenito i u tumorima je putem receptora stanične smrti Fas i FasL. Apoptoza se pokreće kada stanica koja ima izražen Fas (CD95/APO-1) na svojoj površini dođe u kontakt sa stanicama s izraženim Fas ligandom (FasL), kao što su aktivirani T limfociti (100, 115-122). Fas je membranski glikoprotein tipa I koji se ubraja u obitelj receptora čimbenika nekroze tumora i rasta živčanih stanica (TNF i NGF) (100). Fas ligand je membranski protein tipa II iz iste obitelji. Otkriveno je da njegov izvanstanični dio (C terminalna regija) sadrži iste značajke kao i drugi članovi TNF obitelji poput TNF- α , CD30 i CD40 liganda, limfotoksina i TRAIL-a (ligand povezan s TNF-om koji inducira apoptozu ovisnu o TNF, engl. *TNF related apoptosis-inducing ligand*) (123, 124). FasL se može odcijepiti s površine stanice na kojoj je izražen pomoću metaloproteaza ispuštenih iz stanice, a čini se da taj topivi, slobodni oblik ima manju mogućnost induciranja apoptoze (125, 126).

Fas/FasL sustav također je značajan sudionik u stjecanju tolerancije na vlastita tkiva i ublažavanja, odnosno kontrole imunosne reakcije koja se odvija u timusu, a posredovana je T limfocitima (127). Dokazano je da ima ulogu i u deleciji aktiviranih T stanica i tako direktno utječe na njihovu homeostazu (123). Ovaj sustav posjeduje i izvršnu ulogu u ciljanom uništavanju virusom inficiranih ili premalignih stanica kao i u formiranju imunoprivilegiranih tkiva (93, 100).

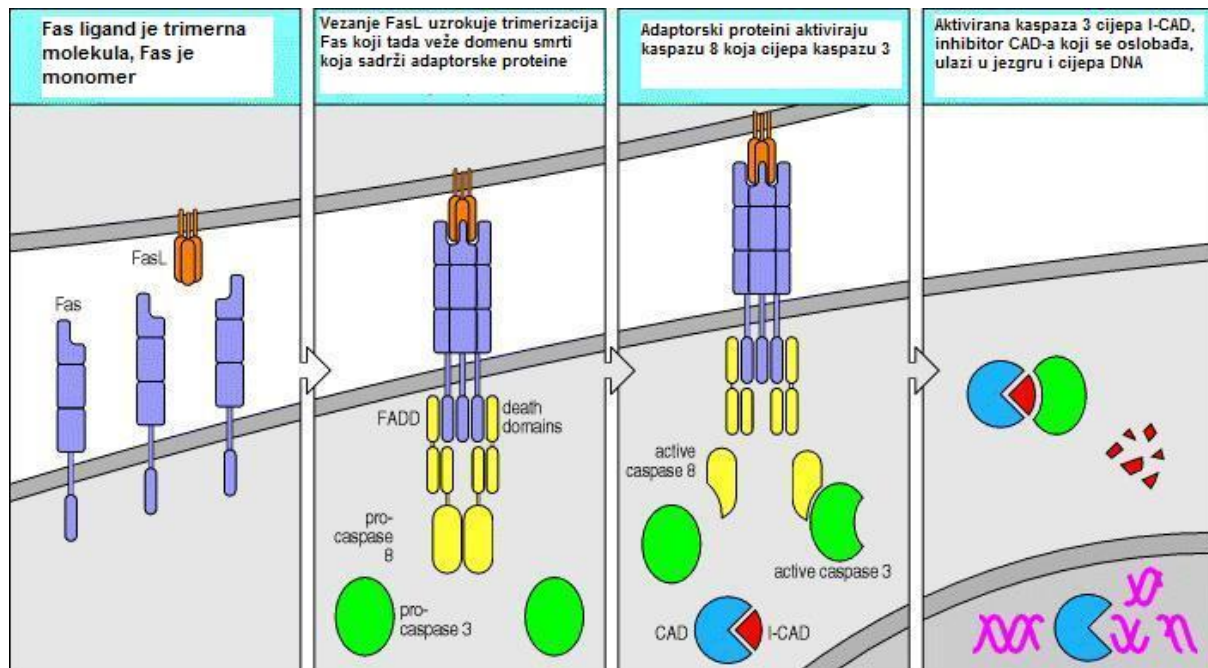
Fas je normalno izražen u raznim tkivima, a posebno u timusu, jetri, srcu i bubregu. Ekspresija Fas liganda je, s druge strane, zabilježena na aktiviranim T limfocitima i NK stanicama (128). U posljednje vrijeme, FasL je zamijećen i na drugim stanicama. Apoptoza pokrenuta interakcijom Fas liganda i njegovog receptora ovisna je o kaspazama. To su cisteinske proteaze, među kojima se kaspaza 3 smatra glavnim izvršiteljem, a kaspaze 8 i 9 aktivatorima ili drugih kaspaza ili proapoptotičkih proteina (128).

Nakon vezanja Fas i FasL-a dolazi do brze trimerizacije Fas-a i organiziranja njegovih unutarstaničnih dijelova (DD – domena smrti) u FADD (engl. *Fas associated death domain*) (129). Posljedica tog udruživanja je vezanje i aktivacija prokaspaze-8 (113). Njen aktivni oblik, kaspaza-8 dalje provodi apoptozu na dva načina (Slika 5. i 6.). Prvi je direktno cijepanje i aktivacija izvršnih kaspaza nizvodno u apoptotskom ciklusu (npr. kaspaze-3), a drugi indirektno aktiviranje izvršnih kaspaza putem citokroma c oslobođenog iz mitohondrija (113, 130).



Slika 5. Unutarstanični putevi apoptoze nakon vezanja liganda za receptor
Preuzeto iz: ref. 12.

Mitohondrijski proteini Bcl-2 i Bcl-xL blokiraju kaskadnu aktivaciju kaspaza na indirektnom putu, ali ne i na direktnom (113). Čini se da različite T stanice koriste različite unutarstanične puteve (113). Aktivacija kaspaza indirektnim putem se može zamijetiti i kod apoptoze inducirane oksidansima, kemijskim agensima ili UV-zračenjem (131).



Slika 6. Mehanizam aktiviranja i odvijanja apoptoze nakon vezanja liganda na receptor
Preuzeto iz: ref. 132.

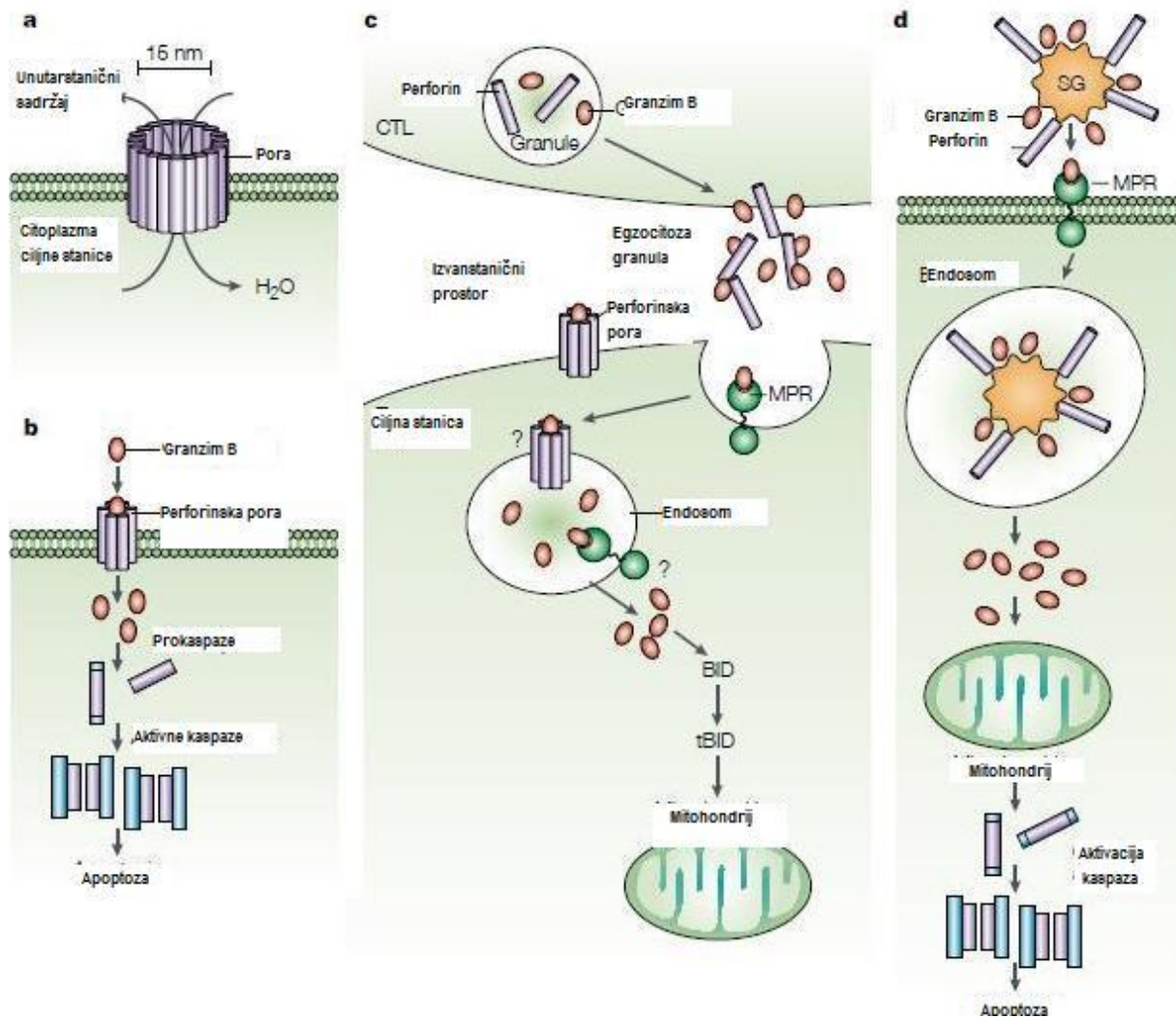
Većina neuroblastoma kao i stanične linije neuroblastoma pokazuju Fas ekspresiju. Neke su studije prikazale odsutnu ili slabu ekspresiju gdje se ona mogla povezati s lošom prognozom. Međutim, u nekim je istraživanjima opaženo da iako je ekspresija Fas-a prisutna, stanice su otporne na apoptozu putem Fas-a. S druge strane, potvrđeno je da određeni kemoterapeutici induciraju apoptozu tumorskih stanica putem Fas/FasL sustava te da o tim procesima ovisi i kemorezistencija pojedinih tumora.

2.2.3.2 Perforin (smrt stanice putem citotoksičnih granula)

Toksini pohranjeni u citoplazmatskim granulama, od kojih glavninu čine perforin i obitelj strukturno sličnih serinskih proteaza – granzima, oslobađaju se egzocitozom iz citotoksičnih T limfocita i induciraju apoptozu u ciljnim stanicama (133). Ovaj je tip apoptoze ciljnih stanica ovisan o kaspazama, iako može biti i neovisan o njima (134, 135). Istraživanja na genetički modificiranim miševima jasno su pokazala da je perforinski put izrazito važan u obrani od virusa i promijenjenih stanica (136). Najnovije studije ga prikazuju kao ključnog

medijatora imunskog nadzora nad spontano mutiranim stanicama. Pokazano je da može uzrokovati neke autoimune bolesti kao što je diabetes ovisan o inzulinu u miševa, ali i suprimirati, odnosno spriječiti druge, npr. poput eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa. Signalni putevi kojima se odvija egzocitoza su poznati, kao što je i poznato da neke tumorske stanice nakon kontakta s citotoksičnim T limfocitima mogu te puteve blokirati. Također postoje studije koje pokazuju da je ulazak granzima u stanicu ovisan o vezanju na specifični receptor i da pojedini tumori sintetiziraju serpine (inhibitore serinskih proteaza) koji mogu neutralizirati granzime i tako izbjeći imunski odgovor organizma (137, 138).

Mehanizam kojim toksini iz granula međusobno surađuju i pokreću apoptozu u ciljnoj stanici je posljednjih godina dodatno razjašnjen. Evolucija tih modela se odvijala na način prikazan na Slici 7. Na temelju strukturnih analiza tijekom osamdesetih godina prošlog stoljeća, zaključeno je da perforin uzrokuje povećanu membransku propusnost, osmotsku nestabilnost i posljedično tome lizu ciljne stanice - nekrozu (Slika 7a.). Desetak godina kasnije, kada je otkrivena proapoptotska aktivnost granzima, promijenjen je prethodni model u sljedeći – poliperforinske pore služe kao kanali za ulazak granzima u stanicu i indukciju apoptoze (Slika 7b). Kasnije, tijekom devedesetih godina (Slika 7c.) dokazano je da su perforinski kanali preuski, odnosno uži od samih molekula granzima te da perforin na neki drugi način olakšava ulazak granzima u stanicu. Na kraju (Slika 7d.), najnoviji model, koji je još uvijek predmet znanstvenih rasprava, govori o stvaranju makromolekularnih kompleksa koje čine perforin, granzimi i molekule poput serilglicina (SG) koji se uz pomoć manoza-6-fosfatnih receptora (MPR) unose u ciljnu stanicu bez značajnog doprinosa perforinskih pora (139).



Slika 7. Evolucija teorija o smrti stanice ovisnoj o perforinu

Preuzeto iz: ref. 139.

Perforin je jedan od proteina, koji se jednom kad je otpušten u blizinu ciljne stanice uz prisutnost kalcijevih iona polimerizira, ulazi u membranu i tamo stvara pore. Nije još sasvim potvrđeno istraživanjima da li prvo dolazi do stvaranja polimera pa zatim do ulaska u membranu ili se polimerizacija događa unutar membrane. Na koji god način se to događa, nastaju pore širine 16 nm koje su lipofilne izvana, a hidofilne u središtu. Kroz te novonastale otvore u membrani u ciljnu stanicu brzo ulaze voda i elektroliti što naposljetku dovodi do vrlo brze smrti stanice. Pretpostavka je da kroz taj otvor u membrani ulaze i ostali citotoksični čimbenici iz granula, u prvom redu granzimi, proteolitički enzimi, iako postoji studija koja

upućuje na to da je granzimska molekula veća od novostvorenih pora i da stoga na neki drugi način ulazi u stanicu. Da li se perforin direktno veže za membranu ili putem specifičnog receptora još nije poznato. Pokazalo se i da NK stanice istovremeno s perforinom oslobađaju i čimbenik aktivacije trombocita (PAF). Berthou i suradnici (2000) su pokazali da stanične linije osjetljive na perforin imaju prisutnu ekspresiju PAF receptora na membrani dok stanične linije neosjetljive za perforin nemaju, što upućuje da je ekspresija PAF receptora na membrani ciljne stanice nužna za citolitičku aktivnost perforina (140). Granzimi su grupa serinskih proteaza, s najvećim udjelom granzima B koji nakon ulaska u stanicu aktivira, odnosno cijepa određene prokaspaze i tako pokreće cijelu kaskadu događaja koji dovode do smrti stanice (141, 142).

Protutmetastatska aktivnost NK stanica, bilo prirodna bilo inducirana pomoću IL-12 je ovisna o perforinu. To je dokazano na raznim tumorima, poput melanoma, karcinoma prostate i dojke (143). Pokazano je i da NK stanice s manjkom perforina imaju sposobnost regulacije ekspresije Fas-a na nekim tumorskim stanicama i indukcije apoptoze putem sustava Fas/FasL (144). Nadalje, inhibitori apoptoze mogu blokirati ove procese (144, 145). Izazivanje smrti stanice putem citotoksičnih granula ima vrlo važnu ulogu *in vitro*. Poznato je da je jedno od najuspješnijih CTL cjepiva protiv agresivnih mišjih tumora ovisno o perforinskom putu izazivanja smrti stanice (146). S druge strane, jasno je i da neki procesi odbacivanja tumora putem CTL-a nisu ovisni o perforinu (147-149). Ipak, treba napomenuti da je u većini tih studija gdje su korišteni citotoksični T limfociti deficijentni u ekspresiji perforina, u zaustavljanju rasta tumora imala ulogu sekrecija citokina poput IFN-gama i TNF.

Jasno je da je imunosuprimiranost predisponirajući čimbenik za razvoj nekih tumora i da imunosni nadzor ima važnu ulogu u tom razvoju (150-153). Sva ta istraživanja naglašavaju ulogu stanica koje ekspimiraju perforin na svojoj površini u prevenciji razvoja tumora i to osobito limfatičkog podrijetla. Pitanje je mogu li citotoksični limfociti spriječiti i druge epitelne ili embrionalne tumore. Mogućnost pojačanja, odnosno modulacije njihove aktivnosti mogla bi biti značajan dodatak sadašnjim onkološkim protokolima liječenja. Objavljeni su radovi koji upućuju da su kemijski inducirani sarkomi i adenokarcinom pluća povezani s ekspresijom i funkcijom perforina (154). Napredak u području molekularno bioloških tehnika i predklinički modeli tumora epitelnih karcinoma pokazali su povezanost ekspresije perforina i razvitka karcinoma prostate, dojke i kolona. Možda najveći nedostatak takvih modela je što se najčešće tumorske stanice iz kulture stanice injiciraju imunokompromitiranoj životinji pa tako nemamo adekvatni imunosni odgovor (155, 156). Ti modeli će možda pokazati na kojoj razini razvoja tumora se uključuje perforinski put (hiperplaziji, karcinoma *in situ* ili kod

invazivnog karcinoma) i kako djeluje na njega. Do sada nije objavljena studija o povezanosti bioloških značajki neuroblastoma i perforina (157).

2.2.3.3 Protein toplinskog šoka - HSP70

Ekspresija proteina toplinskog šoka (engl. *heat shock protein* - HSP) opažena je u raznim uvjetima, poput izloženosti visokoj temperaturi, teškim metalima, oksidansima i infekcijama. Njihova je uloga zaštita stanice kod izlaganja štetnim, stresnim čimbenicima (158). Oni omogućavaju normalnu funkciju proteinima pa ih se često naziva molekularnim čuvarima ili pratiteljima. Molekularni pratitelji - šaperoni (engl. *chaperon*) omogućuju pravilno smatanje proteina u trodimenzionalnu strukturu i tako onemogućavaju interakcije proteina štetne za stanicu (159).

Nakupljanje pratitelja zabilježeno je u brojnim patološkim stanjima kao i u tumorima (160). Imaju značajnu ulogu u normalnom staničnom ciklusu kao i u apoptozi (161). Jedna od teorija kako granzim B ulazi u stanicu jest da se to odvija uz pomoć HSP70 (162). Posebna značajka HSP70 je njegov zaštitni učinak na stanice. Više studija je dokazalo da je mehanizam zaštite stanice putem inhibicije apoptoze (163). Ovi autori dokazali su da HSP70 štiti stanicu od brojnih proapoptotskih agensa kao što su oštećenje DNA, zračenje ili neki citostatici. Njegova pojačana ekspresija je povećala transformaciju stanica dok je njegova smanjena ekspresija bila dovoljna da ubije tumorske stanice pokretanjem apoptoze (164). Postoje dokazi da svoju antiapoptotsku funkciju HSP70, između ostalog, ostvaruje djelovanjem na prokaspazu-9, ali putem koji ne ovisi o kaspazama, već putem inhibicije Bcl-2 proteina koji inače potiče oslobađanje citokroma c iz mitohondrija i formiranje apoptotskog kompleksa, apoptosoma (163-165).

Povezanost ekspresije HSP70 i slabo diferenciranih tumora u visokim stadijima s lošom prognozom pokazana je u različitim tumorima što sugerira njegov potencijal da bude nezavisni prognostički čimbenik. Ta povezanost je dokazana kod karcinoma dojke, želuca, debelog crijeva, mokraćnog mjehura i usne šupljine (166-171). Naravno, nasuprot tome, postoje dokazi o povezanosti ekspresije HSP70 i ranih stadija tumora s dobrom prognozom kod karcinoma jednjaka, melanoma i nefroblastoma (172-175). Povezanost nije nađena kod karcinoma prostate, jajnika, jezika ili osteosarkoma (176-179). Obzirom da nema podataka o povezanosti ekspresije HSP70 i kliničkih, odnosno bioloških karakteristika neuroblastoma namjera nam je istražiti da li ta povezanost postoji kako bi se priroda ovog dječjeg tumora bolje razumjela.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijal

Ispitivanja su izvršena na tumorskom tkivu neuroblastoma dobivenom biopsijom. Uključeni su samo uzorci ispitanika koji su izuzeti prije započete kemoterapije ili radioterapije. Tumorsko tkivo je nakon kirurškog zahvata uklopljeno u parafinske blokove na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb te na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Iz tumorskog tkiva su određeni histološka dijagnoza neuroblastoma, MKI, status onkogenog *MYCN* i ploidijski indeks tumorskih stanica. Iz HE preparata određena je histološka klasifikacija tumora prema Međunarodnoj histopatološkoj klasifikaciji (INPC, modificirana Shimadina klasifikacija) na osnovi morfoloških indikatora, odnosno ovisno o mitotskom kariorekcijskom indeksu te stupnju neuroblastičke diferencijacije. Dobiveni podaci su se uz pomoć dobi ispitanika u vrijeme postavljanja dijagnoze razvrstali u histološki povoljnu skupinu (PH) i histološki nepovoljnu skupinu (NH) - Tablica 4. i Tablica 5. (48, 49, 50, 180, 181).

3.2 Imunohistokemijske metode

Imunohistokemija je metoda koja omogućuje prikazivanje specifičnih antigena u tkivu. Temelji se na prepoznavanju antigena od strane za njega specifičnog, primarnog protutijela. Primarno protutijelo se veže na antigen, međutim to se još ne može vidjeti svjetlosnim mikroskopom. Stoga se u postupku dodaje sekundarno protutijelo, koje će se vezati na primarno. To protutijelo može biti obilježeno fluorescentnom bojom i tada se taj postupak naziva imunofluorescencija ili biti, kao u ovom istraživanju, konjugirano s enzimom, peroksidazom. Nakon toga se dodaje kromogen kojeg enzim razgrađuje i precipitira na mjestu interakcije antigena i primarnog protutijela i ta precipitacija je ono što se promatra na svjetlosnom mikroskopu. Da bismo uzorak tkiva mogli analizirati prvo ga je potrebno fiksirati, odnosno očuvati stanice bez oštećenja ili raspadanja. Uklapanjem u parafin tkivo se fiksira bez toplinskog i kemijskog oštećenja. Parafinske kocke s tumorskim tkivom narezane su na više uzastopnih rezova, po jedan rez na jedno predmetno staklo, svaki rez

debljine 5 μm . Nakon rezanja preparati se deparafiniziraju te zadnji u nizu boji hemalaun-eozinom (HE) kako bi se provjerilo ima li u materijalu još tumorskog tkiva.

Deparafinizacija i digestija je rađena u PTLinku (Dako, Danska).

Za imunohistokemiju korišteni su pripremljeni neobojeni rezovi, po uputama proizvođača, te sustav bojenja DAKO Autostainer. Za vizualizaciju protutijela Fas (B10) (Santa Cruz, USA) te CD8 (DAKO, Danska) korišten je komplet EnVision (DAKO, Danska) dok je za FasL (N-20), HSP70/HSC70 (W27) i perforin 1 (H-315) protutijela (sva od Santa Cruz, USA) korišten komplet LSAB+ (DAKO, Danska). Sva navedena protutijela razrijeđena su u omjeru 1:50, a inkubacija je trajala 30 min. Na kraju su rezovi kontrastirani hemalaunom. Kao pozitivna kontrola za protein Fas korištena je sluznica tankog crijeva, za FasL epitel nazofarinksa, za HSP70/HSC70 koža, za perforin slezena te za CD8 limfni čvor prema uputama proizvođača. Imunohistokemijsko bojanje se izvodilo u aparatu Dako autostainer (Dako, Danska). Postupak imunohistokemijskog bojanja je bio sljedeći: preparat je prvo inkubiran kroz 5 minuta u fosfatnoj otopini koja sadrži vodikov peroksid, 15 mmol NaN_3 i deterđent (*EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent*) te nakon toga ispran puferom (*EnVision™ FLEX Substrate Buffer*). Slijedilo je kapanje primarnog antitijela s inkubacijom od 30 minuta. Sva protutijela su bila razrijeđena u omjeru 1:50, a njihove karakteristike su sljedeće: Fas – mišje monoklonalno IgG_1 ; FasL - zečje poliklonalno IgG protutijelo; CD8 - mišje monoklonalno IgG_1 ; perforin - zečje poliklonalno IgG protutijelo i Hsp70 – mišje monoklonalno IgG protutijelo. Nakon inkubacije protutijelom preparat je ispran (*EnVision™ FLEX Wash Buffer*) i u trajanju od 30 minuta inkubiran sekundarnim protutijelom (*EnVision™ FLEX /HRP – kompleks dekstrana i molekula peroksidaze te kozjih sekundarnih protutijela protiv mišjih ili zečjih imunoglobulina*). Ponovljeno je ispiranje (*EnVision™ FLEX Wash Buffer*) i nakon toga apliciran kromogen, otopina DAB (*EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklirid*) u razrijeđenju 1:400 i trajanju 10 minuta. Potom je preparat ispran u destiliranoj vodi, dodan (radi kontrasta) hemalaun kroz 30 sekundi te ispran vodovodnom vodom 5 minuta i nakon toga dehidriran alkoholnim nizom do ksilola i pokriven pokrovnim staklom.

Radi usporedbe ponovljeno je i standardno bojanje hemalaun eozinom na rezovima debljine 5 μm . Hemalaun boji jezgru plavo i dobro prikazuje jezgrine detalje - kromatin, membranu i jezgricu, a eozin različitim intenzitetom crvene boje boji eritrocite crveno, mišićna vlakna crvenkasto ružičasto, a vezivo ružičasto. Kod standardnog hemalaun eozin bojanja prvo je provedena deparafinizacija i rehidracija na sljedeći način. Parafinski rezovi tkiva su deparafinizirani u ksilenu 3x3 minute, a potom rehidrirani u padajućem nizu etanola

(u 100% etanolu 3 puta po 3 minute, 3 minute u 96% etanolu i 3 minute u 70% etanolu) i potom kroz 5 minuta u destiliranoj vodi. Slijedilo je bojenje hemalaunom tako da je kroz 3 minute dodan hemalaun nakon čega je preparat ispran u destiliranoj vodi. Slijedi plavljenje u vodovodnoj vodi kroz 5 minuta, te odbojavanje u kiselom alkoholu 8 do 12 puta. Ispiranje u vodovodnoj vodi 2 puta po 1 minuta i u destiliranoj kroz 2 minute. Za bojenje eozinom i dehidraciju dodan je eozin kroz 30 sekundi, a potom u 96% etanolu 3 puta po 5 minuta, 100% etanolu 3x5 min i naposljetku ksilolu 3x15 min.

Određivanje broja citotoksičnih T limfocita

Broj citotoksičnih T limfocita (stanica pozitivnih na CD8) određen je brojanjem na sljedeći način: koristeći mikroskop Olympus BX40 i povećanje objektiva x40 uslikala su se tri vidna polja unutar područja najveće gustoće pozitivnih stanica (engl. „hot spots“), koristeći kameru Hitachi. Broj limfocita izražen je kao prosječan broj po vidnom polju.

Određivanje udjela stanica pozitivnih na Fas i FasL

Za protutijela Fas i FasL određen je udio pozitivno obojanih stanica neuroblastoma na cijelom preparatu u odnosu na ukupan broj stanica. Na pozitivnim stanicama vidljivo je bilo bojanje membrane i granula u citoplazmi. Intenzitet reakcije je opisan kao negativan, slabo, srednje ili jako izražen.

Određivanje udjela citotoksičnih T limfocita pozitivnih na perforin

Za perforinsko protutijelo određen je udio pozitivno obojanih citotoksičnih T limfocita u „vrućim točkama“. Na pozitivnim stanicama bilo je vidljivo citoplazmatsko bojanje. Intenzitet reakcije je opisan kao negativan, slabo, srednje ili jako izražen.

Određivanje udjela stanica pozitivnih na HSP70

Za protutijela HSP70 određen je udio pozitivno obojanih stanica neuroblastoma na cijelom preparatu u odnosu na sve stanice. Na pozitivnim stanicama vidljivo je bilo bojanje jezgre i citoplazme. Intenzitet reakcije je opisan kao negativan, slabo, srednje ili jako izražen.

3.3 Ispitanici

U istraživanje su uključena sva djeca s dijagnozom neuroblastoma operirana na KBC Zagreb u razdoblju od 1994. do 2013. godine. Uključeni su samo ispitanici s cjelovitom medicinskom dokumentacijom iz koje su određeni sljedeći parametri:

- dob u vrijeme postavljanja dijagnoze, odnosno dobna skupina,
- spol,
- ishodište tumora,
- stadij neuroblastoma po INSS-u i po INRGSS-u,
- status onkogeno *MYCN*,
- DNA sadržaj tumorskih stanica (ploidijska),
- PH i NH skupine na osnovi histološke dijagnoze,
- MKI i dobi po INPC,
- rizične skupine na osnovu kriterija COG,
- lokalizacija metastaza.

Zabilježeno je i vrijeme praćenja ispitanika, te povoljan ili nepovoljan ishod liječenja u tom razdoblju.

Tijekom navedenog razdoblja dijagnoza neuroblastoma je postavljena kod 74 djeteta. Kriterije istraživanja zadovoljilo je njih 42, od kojih je 24 (57,1%) bilo muškog spola. Prosječna dob ispitanika bila je 22,5 mjeseci (medijan) (\pm 18,25 (poluinterkvartilno raspršenje), raspon dobi: 0-182). U skupini mlađih od 18 mjeseci nalazilo se 19 (45,2%) ispitanika.

Prema klasifikaciji INSS, u prvom stadiju nalazilo se 17 (40,5%) ispitanika, u drugom 9 (21,4%), u trećem 6 (14,3%), a u četvrtom stadiju 10 (23,8%) ispitanika. Prema klasifikaciji INRGSS, u L1 stadiju nalazilo se 20 (47,6%) ispitanika, u L2 stadiju 11 (26,2%) i u M stadiju 11 (26,2%) ispitanika. Povezanost (Spearmanov koeficijent korelacije) između dviju metoda stupnjevanja neuroblastoma iznosi 0,888 ($p < 0,001$) što je visoka podudarnost.

MYCN amplificiranih tumora bilo je 13 (31,0%), a neamplificiranih 29 (69,0%). Povoljna histologija nalazila se kod 24 (57,1%), a nepovoljna kod 18 (42,9%) ispitanika. Na osnovi kriterija COG u nisko rizičnoj skupini nalazilo se 25 (59,5%) ispitanika, u srednje rizičnoj skupini 6 (14,3%), a u visoko rizičnoj skupini 10 (23,8%) ispitanika. Za jednog

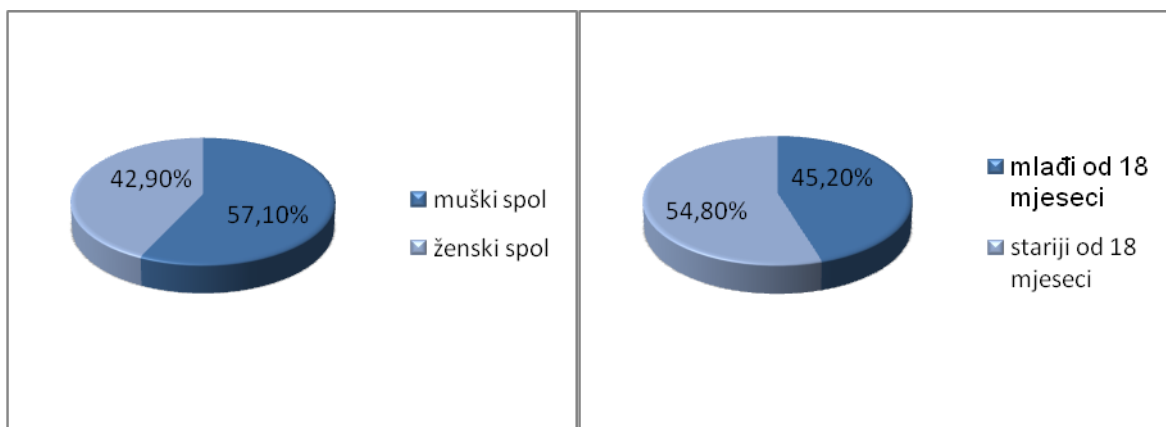
ispitanika ne postoji podatak o riziku. Nepovoljan ishod ustanovljen je kod 14 (33,3%) ispitanika.

Primarna lokalizacija tumora, odnosno njegovo ishodište bili su nadbubrežna žlijezda (N = 16 (38.1%)), medijastinum (N = 13 (30,9%)), paraspinalni gangliji (N = 10 (23,8%)), mala zdjelica (N = 2 (4,8%)) i vrat (N = 1 (2,4%)).

U svrhu bolje preglednosti i uvida u karakteristike uzorka, podaci su također prikazani tablično i slikovno.

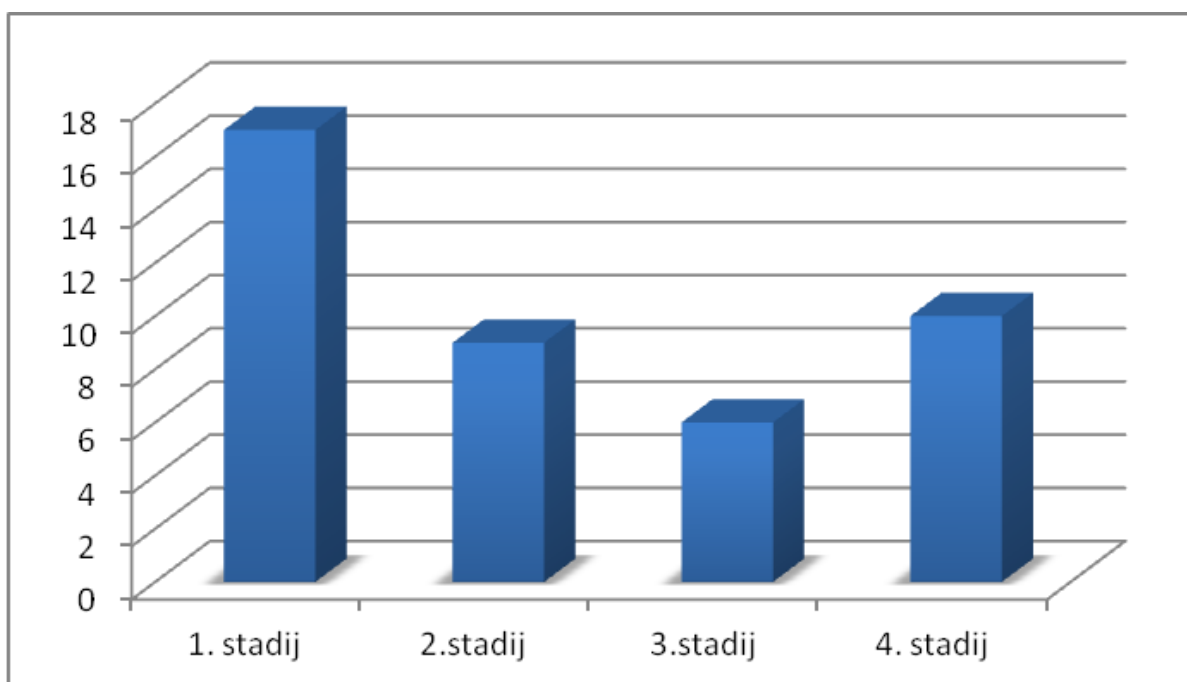
Tablica 7. Karakteristike uzorka (N= 42)

Varijable	Kategorije	N (%)
Spol	Muški	24 (57,1%)
	Ženski	18 (42,9%)
Dob	<18 mjeseci	19 (45,2%)
	>18 mjeseci	23 (54,8%)
INSS klasifikacija	1. Stadij	17 (40,5%)
	2. Stadij	9 (21,4%)
	3. Stadij	6 (14,3%)
	4. Stadij	10 (23,8%)
INRGSS klasifikacija	L1 stadij	20 (47,6%)
	L2 stadij	11 (26,2%)
	M stadij	11 (26,2%)
MYCN	Amplificiranih tumora	13 (31,0%)
	Neamplificiranih tumora	29 (69,0%)
Histologija	Povoljna	24 (57,1%)
	Nepovoljna	18 (42,9%)
COG rizične skupine	Niski rizik	25 (59,5%)
	Srednji rizik	6 (14,3%)
	Visoki rizik	10 (23,8%)
Ishod	Nepovoljan	14 (33,3%)
	Povoljan	28 (66,7%)
Primarna lokalizacija tumora	Nadbubrežna žlijezda	16 (38,1%)
	Medijastinum	13 (30,9%)
	Paraspinalni gangliji	10 (23,8%)
	Zdjelica	2 (4,8%)
	Vrat	1 (2,4%)

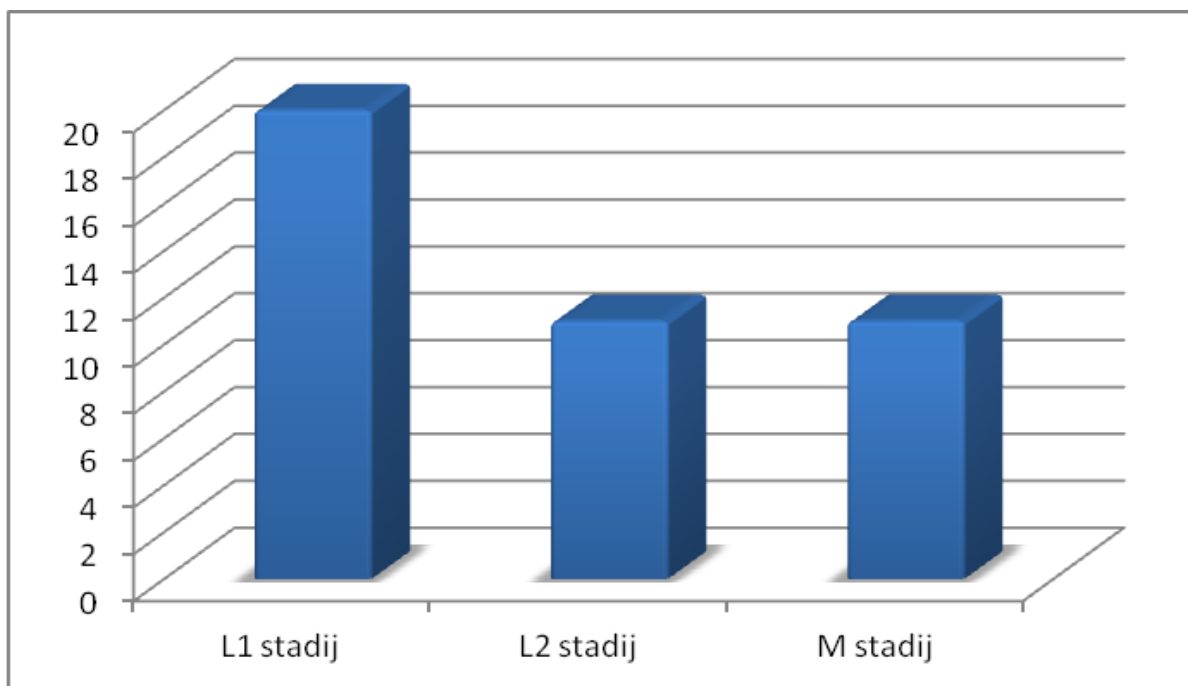


Slika 8. Raspodjela uzorka po spolu

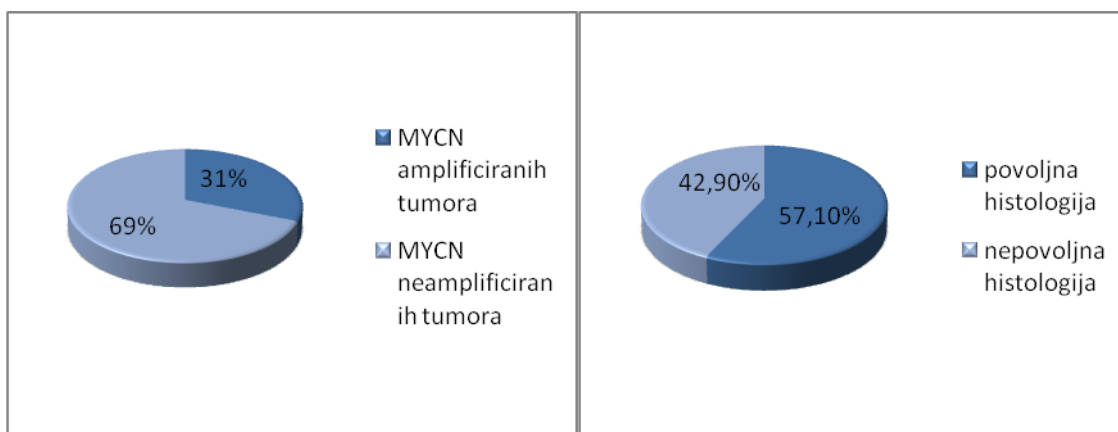
Slika 9. Raspodjela uzorka po dobi



Slika 10. Broj ispitanika prema stadijima INSS klasifikacije

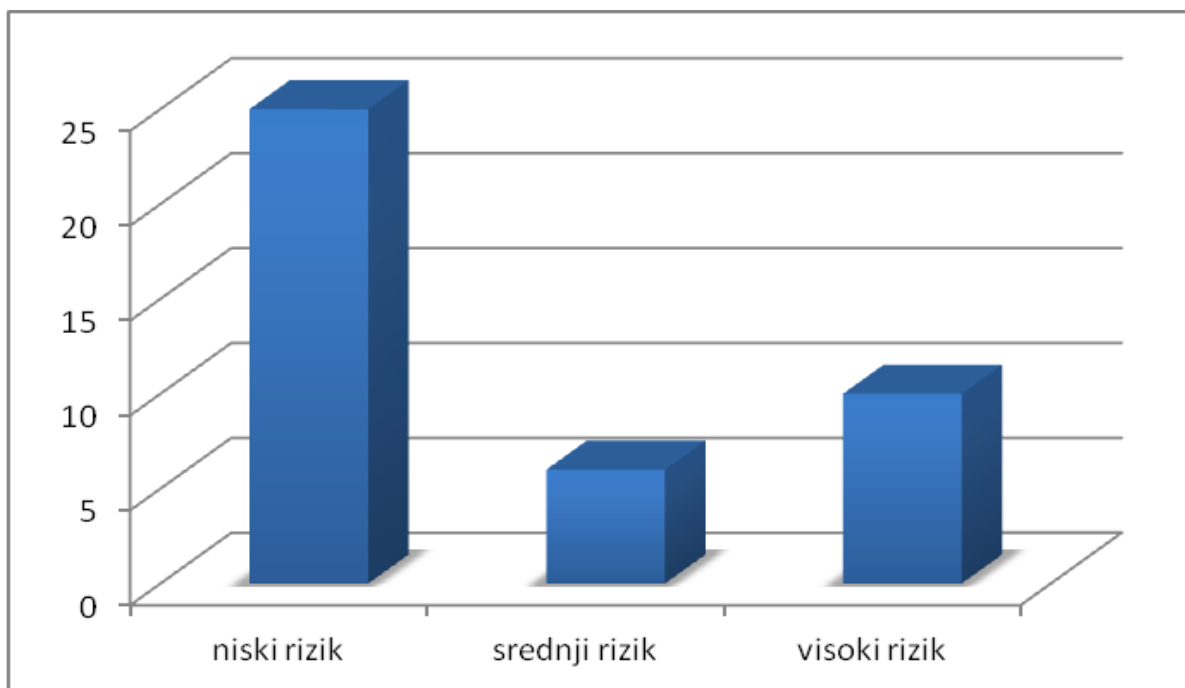


Slika 11. Broj ispitanika prema stadijima INRGSS klasifikacije

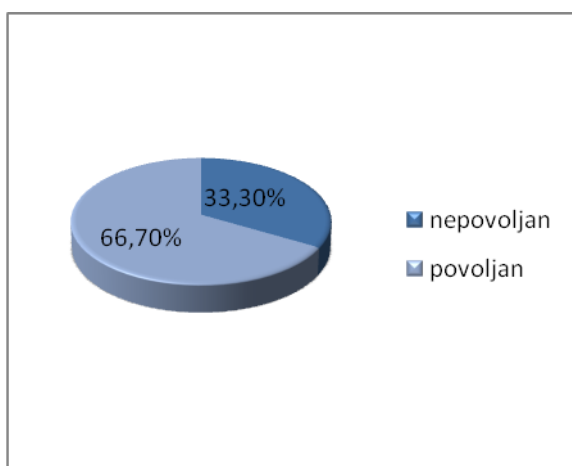


Slika 12. Raspodjela uzorka prema *MYCN* amplifikaciji

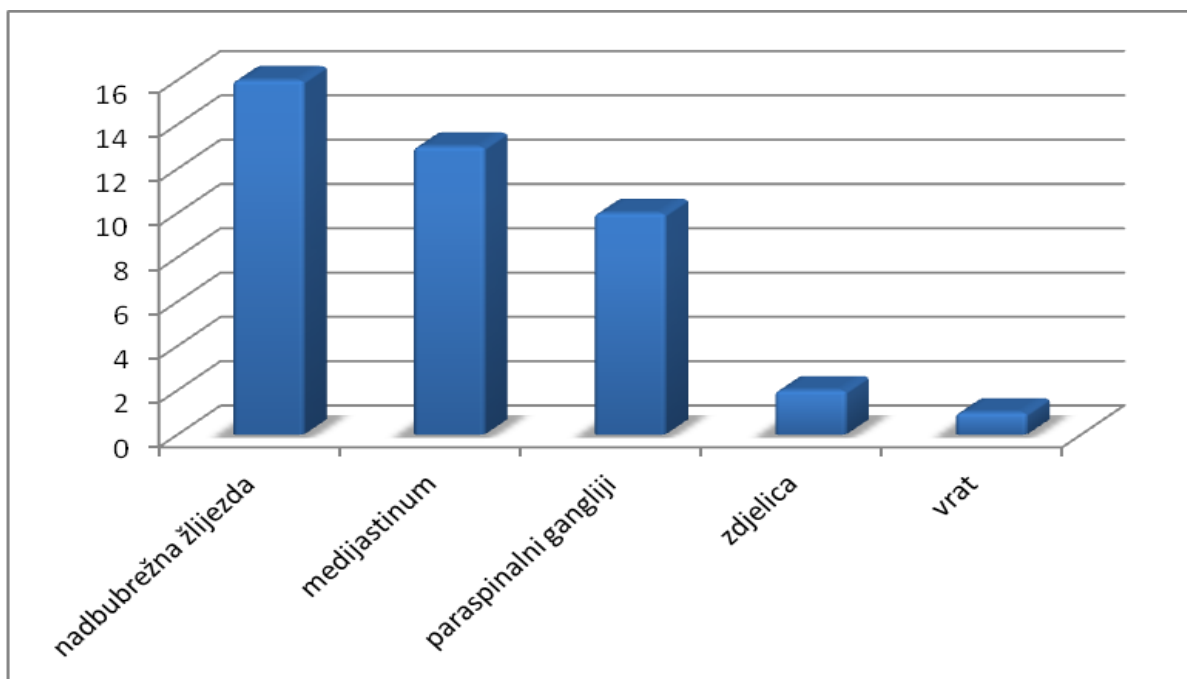
Slika 13. Raspodjela uzorka prema (ne)povoljnosti histologije



Slika 14. Broj ispitanika prema COG riziku



Slika 15. Raspodjela uzorka prema (ne)povoljnosti ishoda



Slika 16. Broj ispitanika prema primarnoj lokalizaciji neuroblastoma

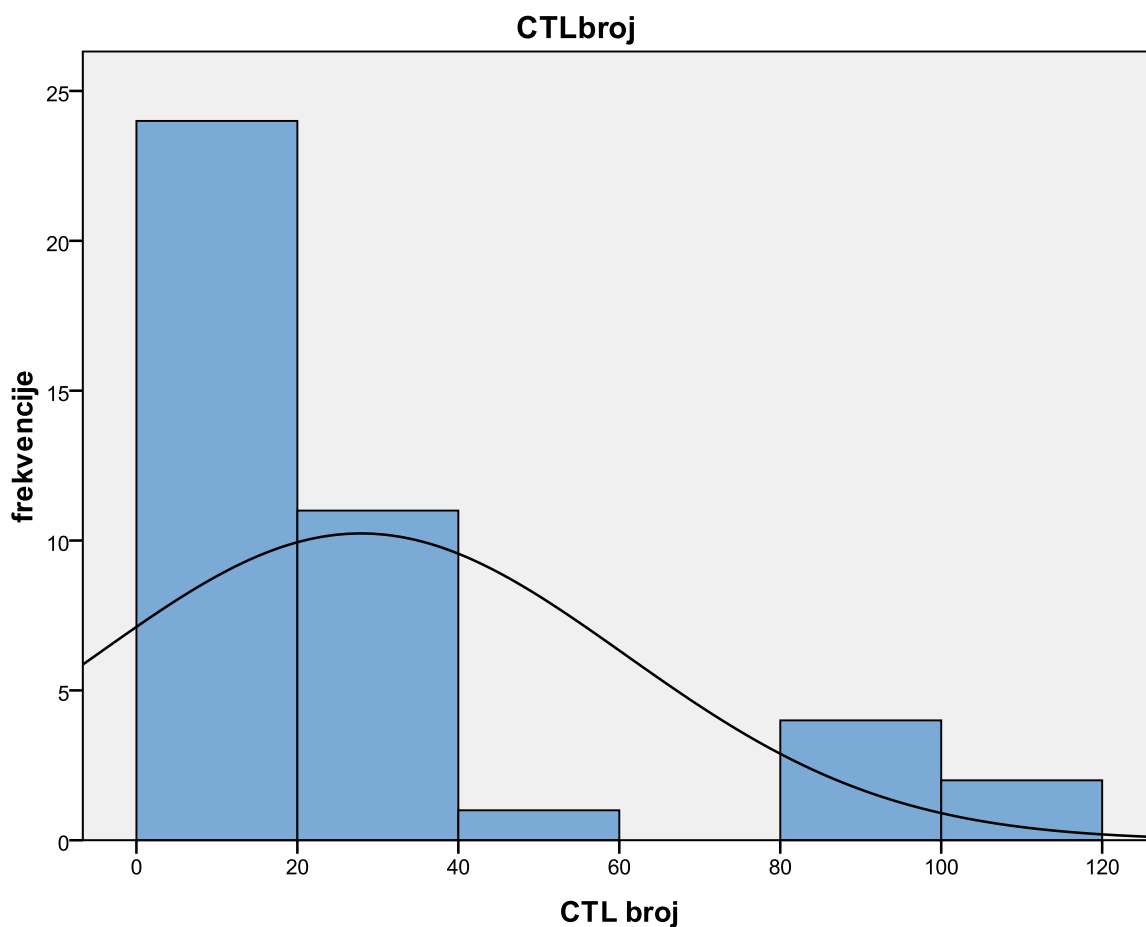
3.4 Statističke metode

Obzirom na relativno mali uzorak i značajno odstupanje distribucija rezultata od normalne raspodjele, za procjenu ekspresije čimbenika stanične smrti korištene su mjere neparametrijske statistike (medijan i poluinterkvartilno raspršenje). Povezanost između izraženosti čimbenika stanične smrti, karakteristika uzorka te stadija neuroblastoma, ekspresije *MYCN*, povoljne/nepovoljne histologije, COG rizika, i (ne)povoljnosti ishoda ispitana je Spearmanovim koeficijentom korelacije, Mann-Whitney U testom, Kruskal-Wallis testom i hi-kvadrat testom. Rezultati su prikazani tablično i grafički. P vrijednosti manje od 0,05 su se smatrale statistički značajnima. Statistička obrada napravljena je pomoću programskog paketa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), verzija 20.

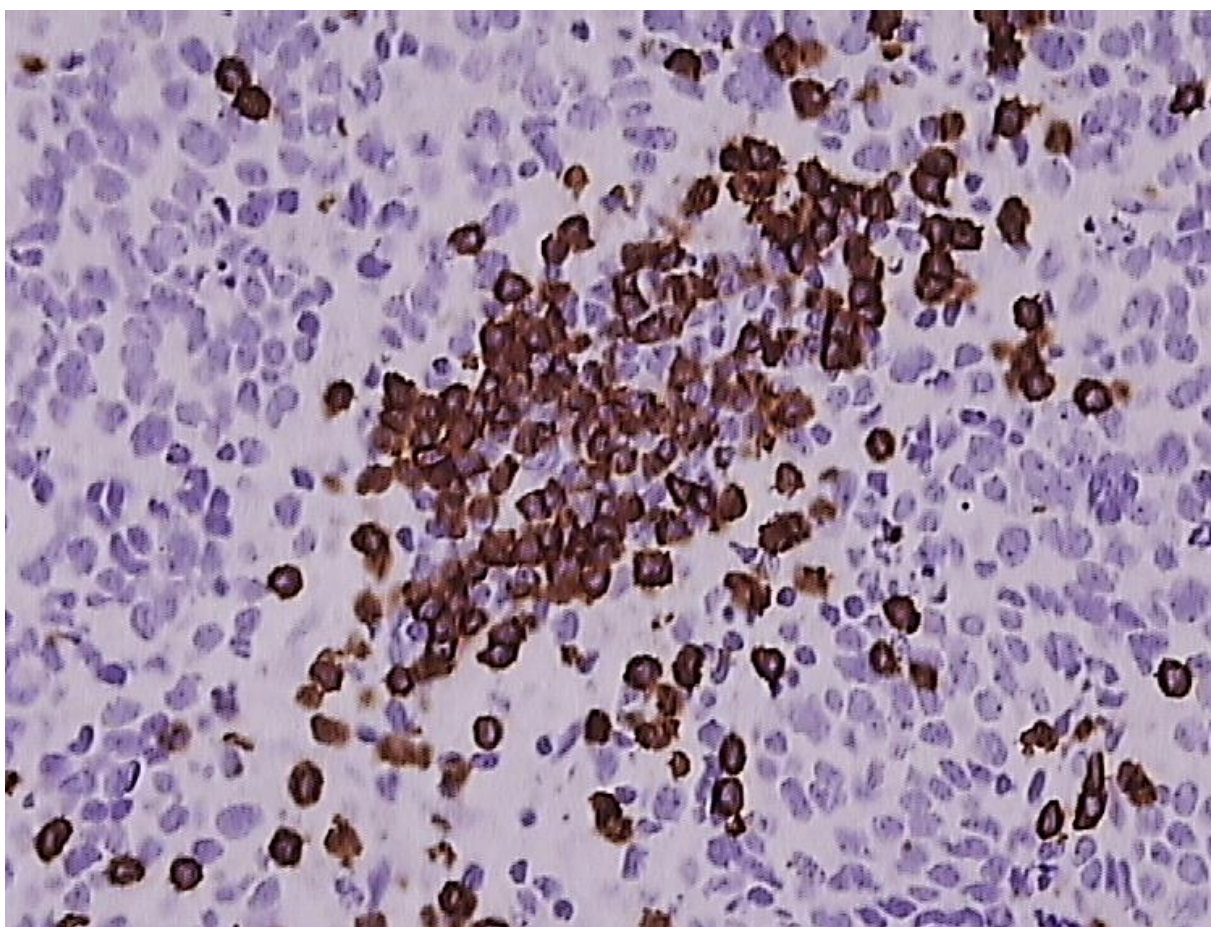
4 REZULTATI

Ekspresija čimbenika stanične smrti

Iz arhive Zavoda za patologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu odabrali smo 42 preparata tumorskog tkiva uklopljenog u parafinske blokove. Prosječan broj CTLa na našim uzorcima iznosi $16 (\pm 16,125)$, a određen je brojanjem na sljedeći način: koristeći mikroskop Olympus BX40 i povećanje objektiva x40 uslikala su se tri vidna polja unutar područja najveće gustoće pozitivnih stanica (engl. „*hot spots*“), koristeći kameru Hitachi. Broj limfocita izražen je kao prosječan broj po vidnom polju. Minimalna vrijednost je 1, a maksimalna 114. Distribucija je pozitivno asimetrična, što znači da se rezultati grupiraju oko nižih vrijednosti.



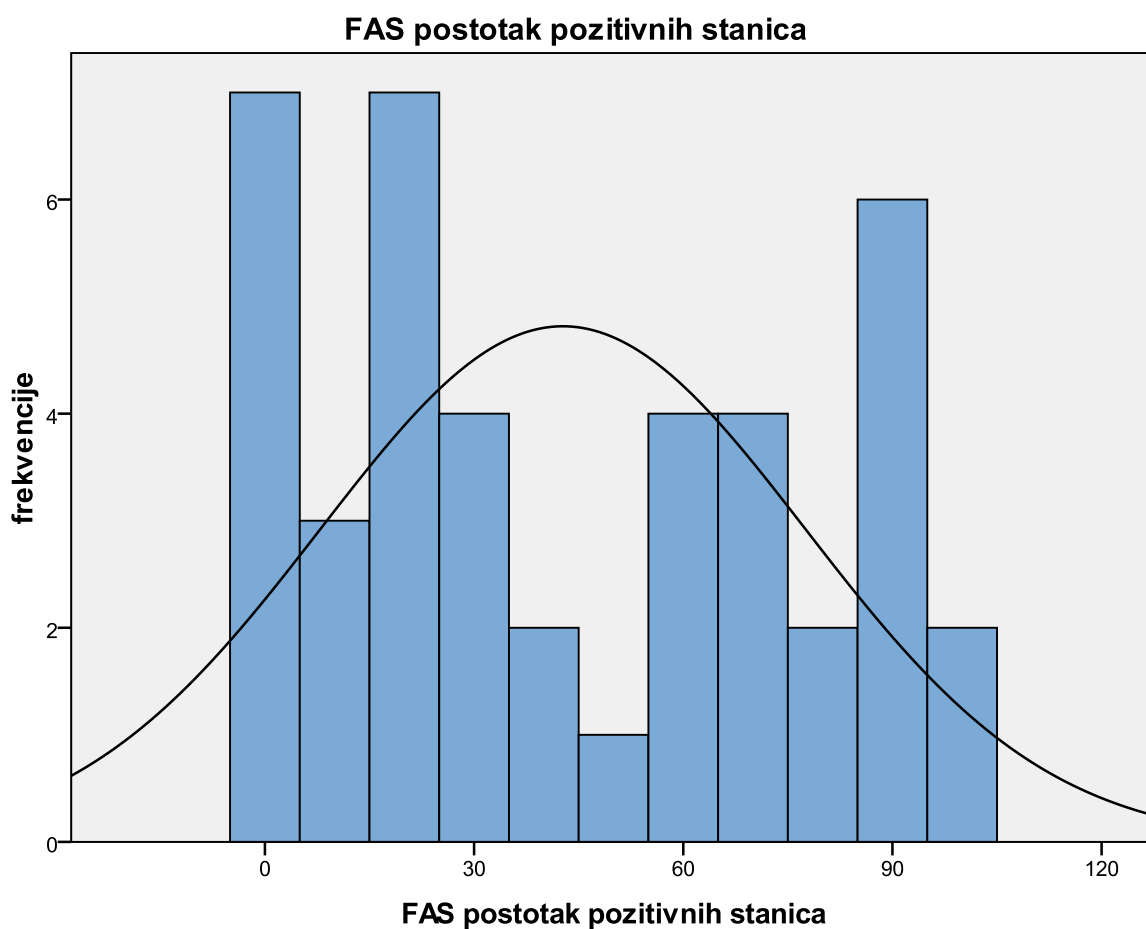
Slika 17. Distribucija prosječnog broja CTL-a



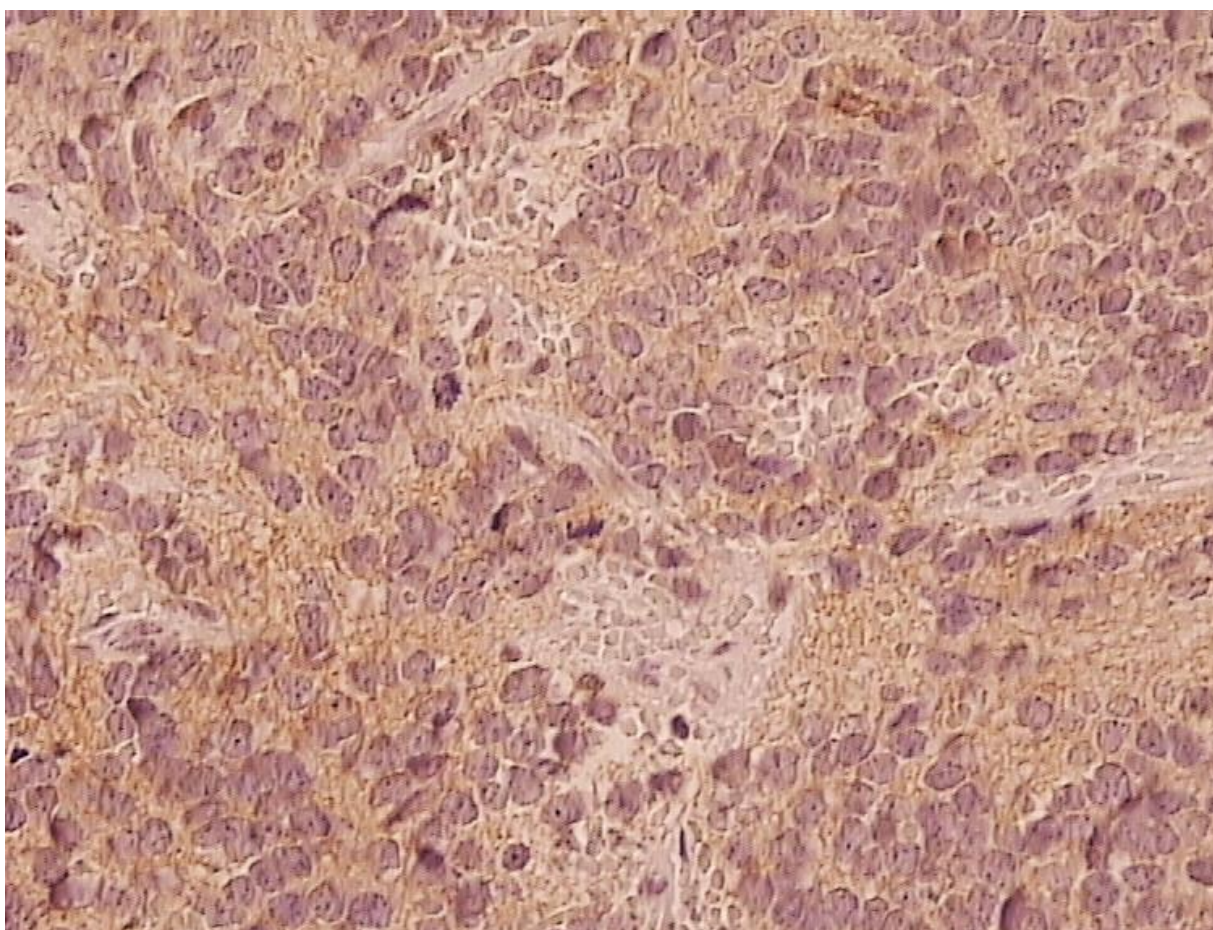
Slika 18. Imunohistokemijsko bojanje deparafiniziranih preparata tumorskog tkiva na mjestima najvećeg nakupljanja limfocita ("hot spot") pokazuje pozitivno bojanje CD8 pozitivnih stanica. Ovo povećanje je korišteno i za brojanje pozitivnih stanica. Oko njih se vide tumorske stanice. (Olympus BX40, objektiv x40)

Analiza ekspresije proteina Fas

Prosječan udio stanica pozitivnih na Fas je 32,50 ($\pm 29,375$), no distribucija nalikuje bimodalnoj, što znači da se rezultati grupiraju oko nižih (najčešća je 0) i oko viših vrijednosti (najčešća je 90), dok su srednje vrijednosti najmanje zastupljene. Minimalna vrijednost je 0, a maksimalna 100%.



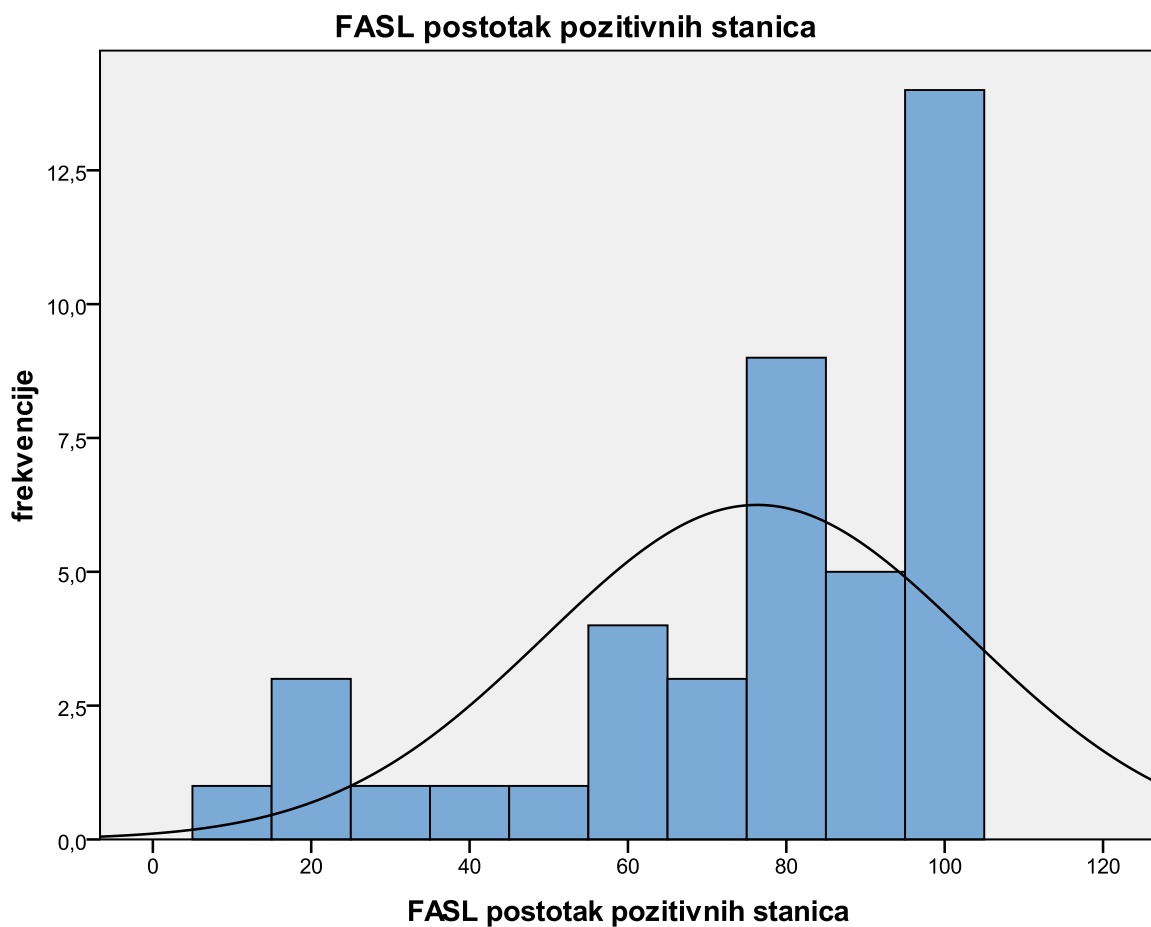
Slika 19. Distribucija stanica pozitivnih na Fas



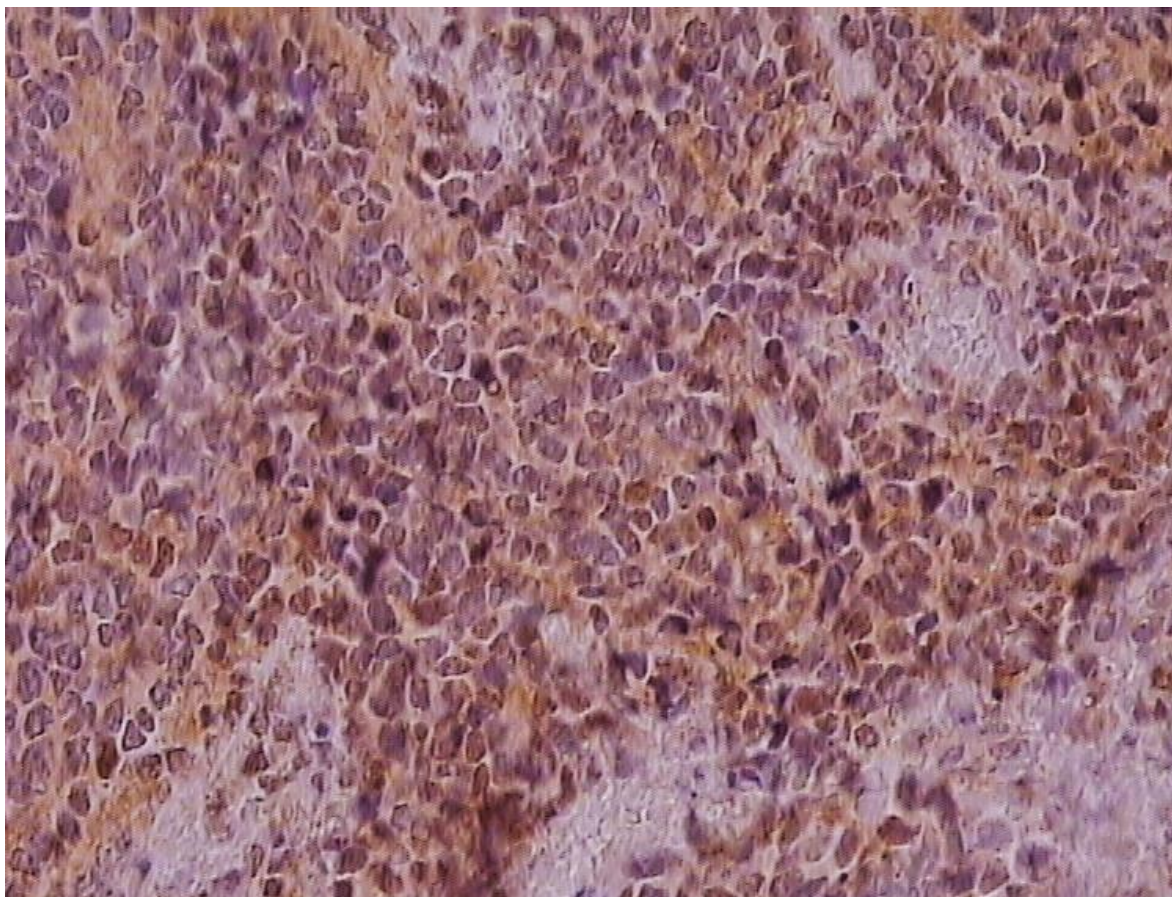
Slika 20. Imunohistokemijsko bojanje deparafiniziranih preparata tumorskog tkiva. Pozitivnim su označene one stanice na kojima je bilo vidljivo bojanje membrane i granula u citoplazmi. Pregledan je cijeli preparat i određen je udio stanica pozitivnih na Fas u ukupnom broju tumorskih stanica. (Olympus BX40, objektiv x40)

Analiza ekspresije proteina FasL

Prosječan udio stanica pozitivnih na FASL je 80,00 ($\pm 20,00$). Minimalna vrijednost je 0, a maksimalna 100%. Distribucija je negativno asimetrična, što znači da se rezultati grupiraju oko viših vrijednosti.



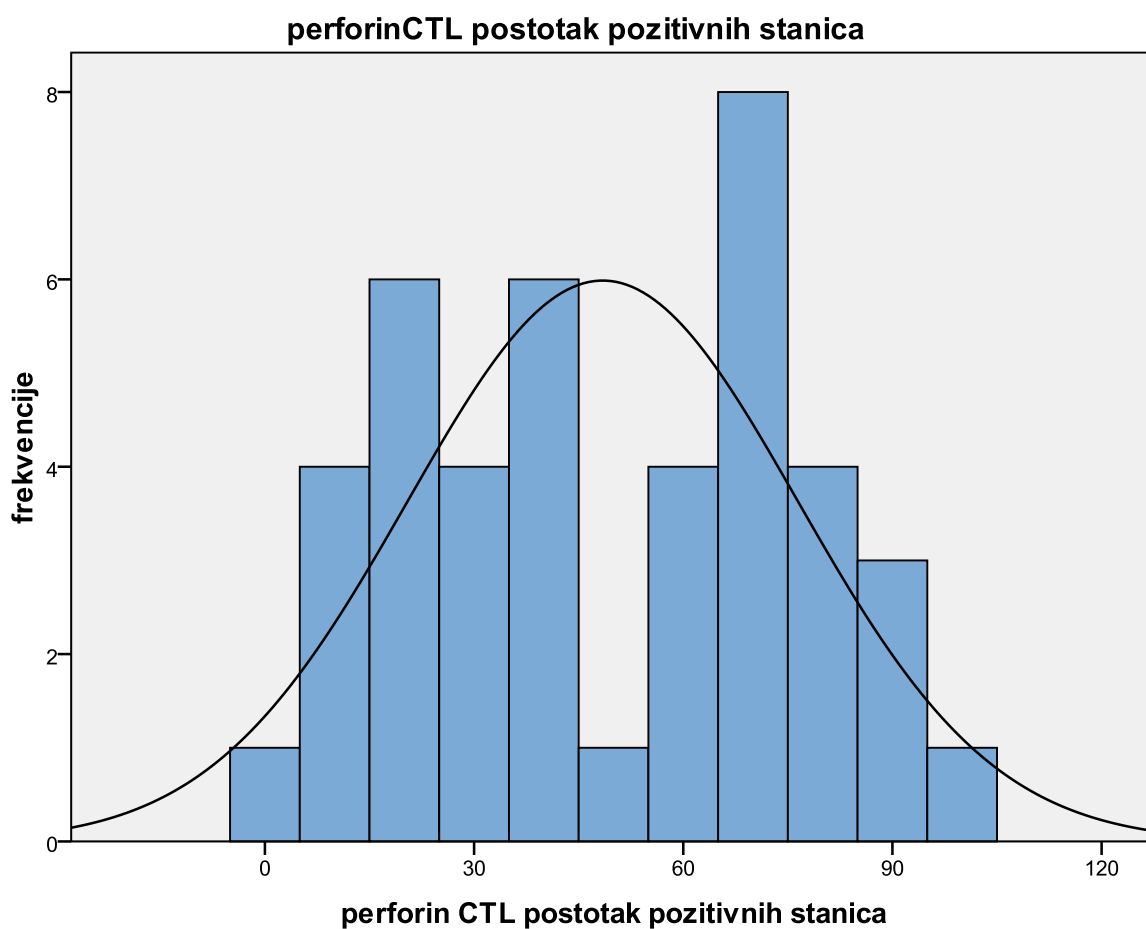
Slika 21. Distribucija stanica pozitivnih na FasL



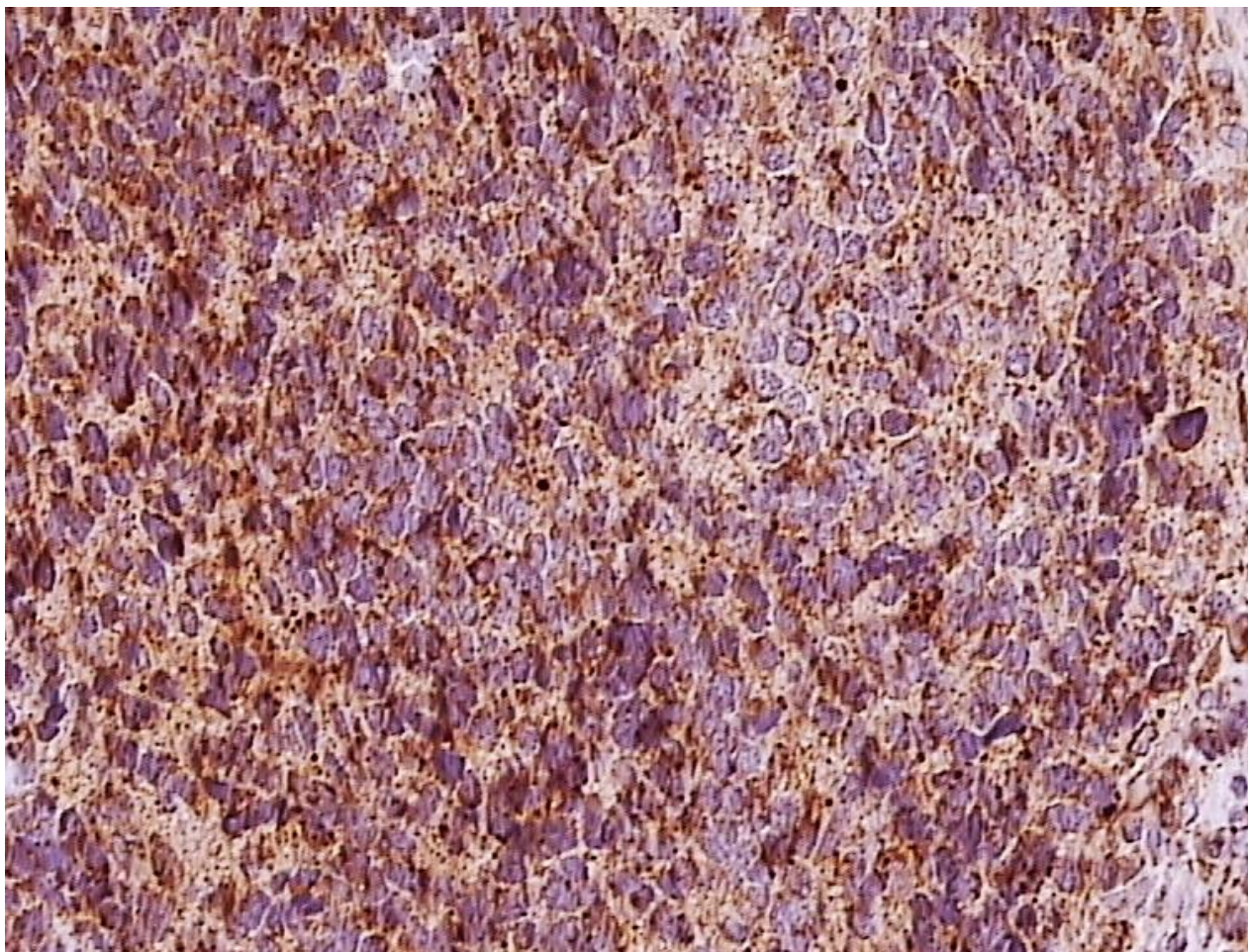
Slika 22. Imunohistokemijsko bojanje deparafiniziranih preparata tumorskog tkiva. Pozitivnim su označene one stanice na kojima je bilo vidljivo bojanje membrane i granula u citoplazmi. Pregledan je cijeli preparat i određen je udio stanica pozitivnih na FASL u ukupnom broju tumorskih stanica. (Olympus BX40, objektiv x40)

Analiza udjela citotoksičnih T limfocita pozitivnih na perforin

Prosječan udio CTL-a pozitivnih na perforin je 45,00 (\pm 25,00), no distribucija nalikuje bimodalnoj što znači da se rezultati grupiraju oko nižih (najčešće su 20 i 40), ali i oko viših vrijednosti (najčešća je 70). Minimalna vrijednost je 0, a maksimalna 100%.



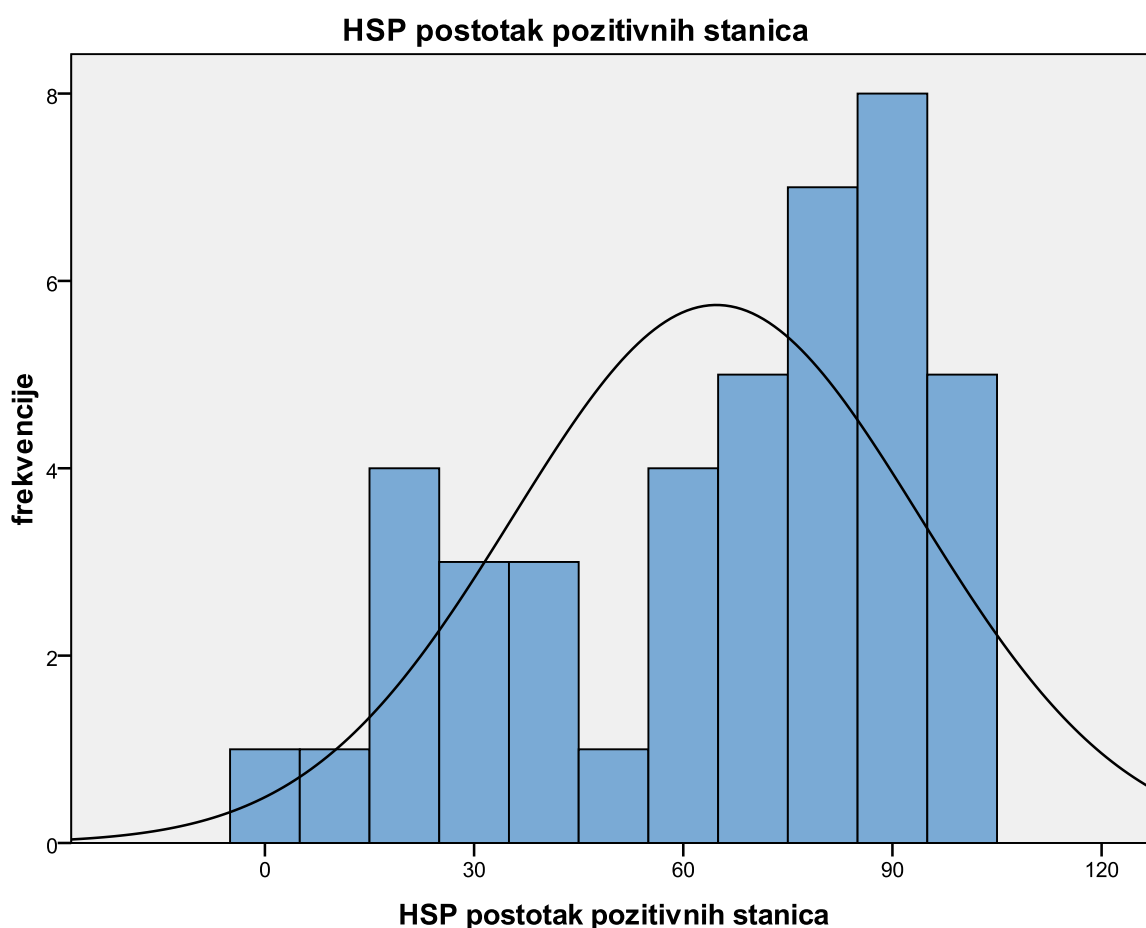
Slika 23. Distribucija CTLa pozitivnih na perforin



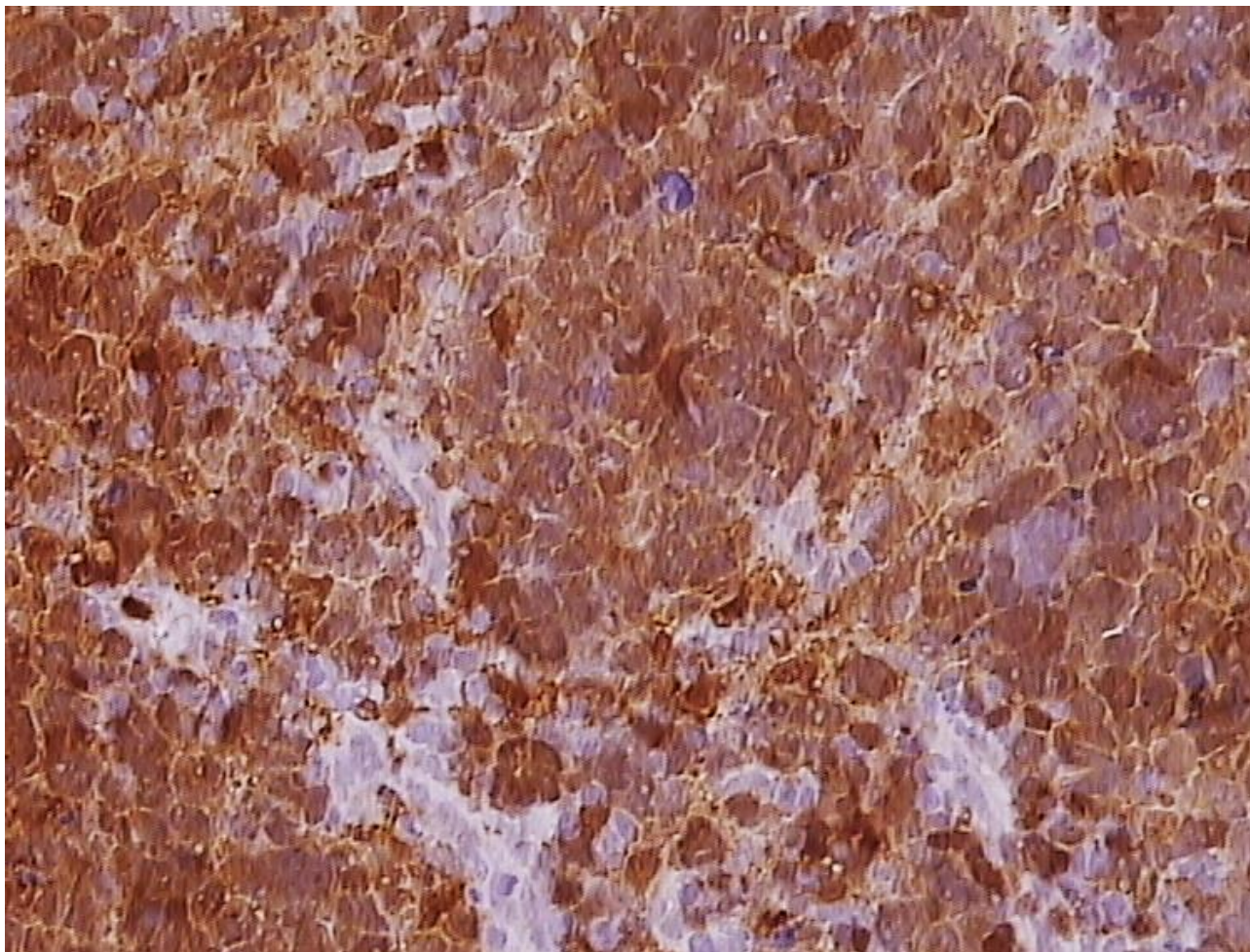
Slika 24. Imunohistokemijsko bojanje deparafiniziranih preparata tumorskog tkiva. Točkasta smečkasta obojenost unutar citoplazmi citotoksičnih T limfocita kao prikaz pozitivne reakcije protutijelom na perforin. Pregledan je cijeli preparat i određen je udio CTL-a pozitivnih na perforin. U okolini se nalaze tumorske stanice. (Olympus BX40, objektiv x40)

Analiza ekspresije proteina Hsp70

Prosječan udio stanica pozitivnih na HSP je 70,00 ($\pm 30,00$). Minimalna vrijednost je 0, a maksimalna 100%. Distribucija je negativno asimetrična, što znači da se rezultati grupiraju oko viših vrijednosti.



Slika 25. Distribucija udjela stanica s ekspresijom proteina HSP



Slika 26. Imunohistokemijsko bojanje deparafiniziranih preparata tumorskog tkiva. Pozitivnim su označene one stanice na kojima su nakon imunobojanja antitijelom Hsp70 bili vidljivi pozitivni signali u citoplazmi i jezgrama tumorskih stanica. Pregledan je cijeli preparat i određen je udio pozitivnih u ukupnom broju tumorskih stanica. (Olympus BX40, objektiv x40)

Analiza povezanosti ekspresije proteina stanične smrti i anamnestičkih i patohistoloških tumorskih parametara

Nije ustanovljena statistički značajna povezanost spola uzorka i izraženosti čimbenika stanične smrti (provjereno Spearmanovim koeficijentom korelacije i Mann-Whitney U testom). Povezanost dobi i izraženosti čimbenika stanične smrti značajna je samo u slučaju udjela stanica pozitivnih na FasL (0,535; $p < 0,001$): kod starijih ispitanika udio stanica pozitivnih na FasL je veći.

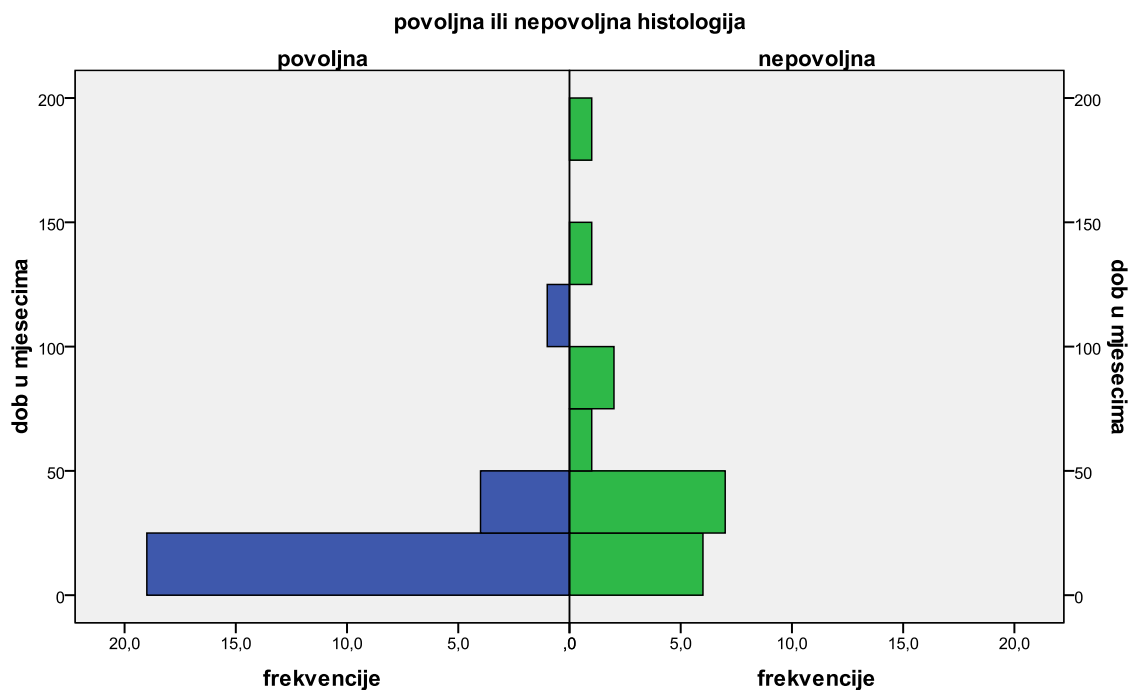
Povezanost između izraženosti različitih čimbenika stanične smrti (broj CTL, udio stanica pozitivnih na Fas, udio stanica pozitivnih na FasL, udio CTL-a pozitivnih na perforin, udio stanica pozitivnih na HSP)

Statistički značajna povezanost (provjereno Spearmanovim koeficijentom korelacije) utvrđena je između udjela stanica pozitivnih na Fas i udjela CTL-a pozitivnih na perforin (0,341; $p = 0,027$): što je veći udio stanica pozitivnih na Fas, veći je i udio CTL-a pozitivnih na perforin, i između udjela stanica pozitivnih na FasL i udjela stanica pozitivnih na HSP (0,344; $p = 0,026$): što je veći udio stanica pozitivnih na FasL, veći je i udio stanica pozitivnih na HSP. Ostale povezanosti među čimbenicima stanične smrti, a osobito povezanost ekspresije FasL na stanicama neuroblastoma i ekspresije Fas-a na citotoksičnim limfocitima nisu statistički značajne.

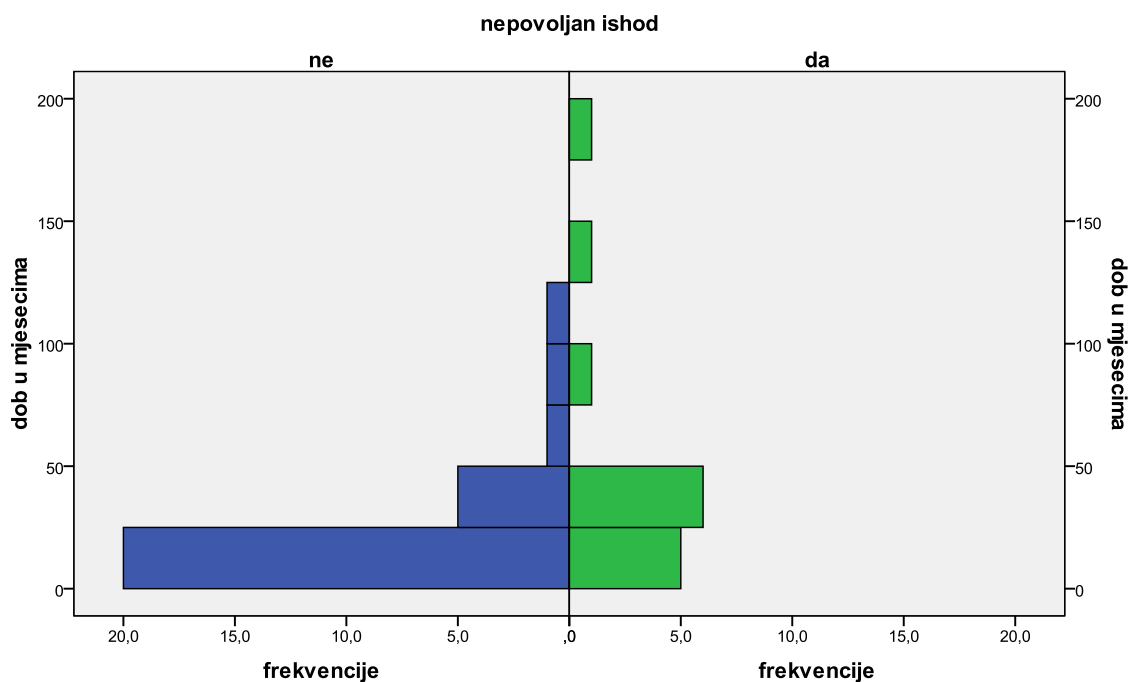
Povezanost između spola i dobi uzorka te stadija neuroblastoma, MYCN ekspresije, povoljne/nepovoljne histologije, COG rizika i (ne)povoljnosti ishoda

Uspoređene su povezanosti spola sa stadijima neuroblastoma, MYCN ekspresijom, povoljnom/nepovoljnom histologijom, COG rizikom i (ne)povoljnosti ishoda (provjereno Spearmanovim koeficijentom korelacije i hi-kvadrat testom) i nisu nađene statistički značajne razlike. Što se tiče dobi, statistički značajne povezanosti dobivene su s: povoljnom/nepovoljnom histologijom (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,515; $p < 0,001$; Mann Whitney U= 345,500, N1=18, N2=24, $p = 0,001$, Slika 27.), s (ne)povoljnosti ishoda (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,363, $p = 0,018$; Mann Whitney U= 283,500, N1=14, N2=28, $p = 0,020$, Slika 28.), te s COG rizičnim skupinama (Kruskal-Wallis test: $\chi^2 = 6,837$,

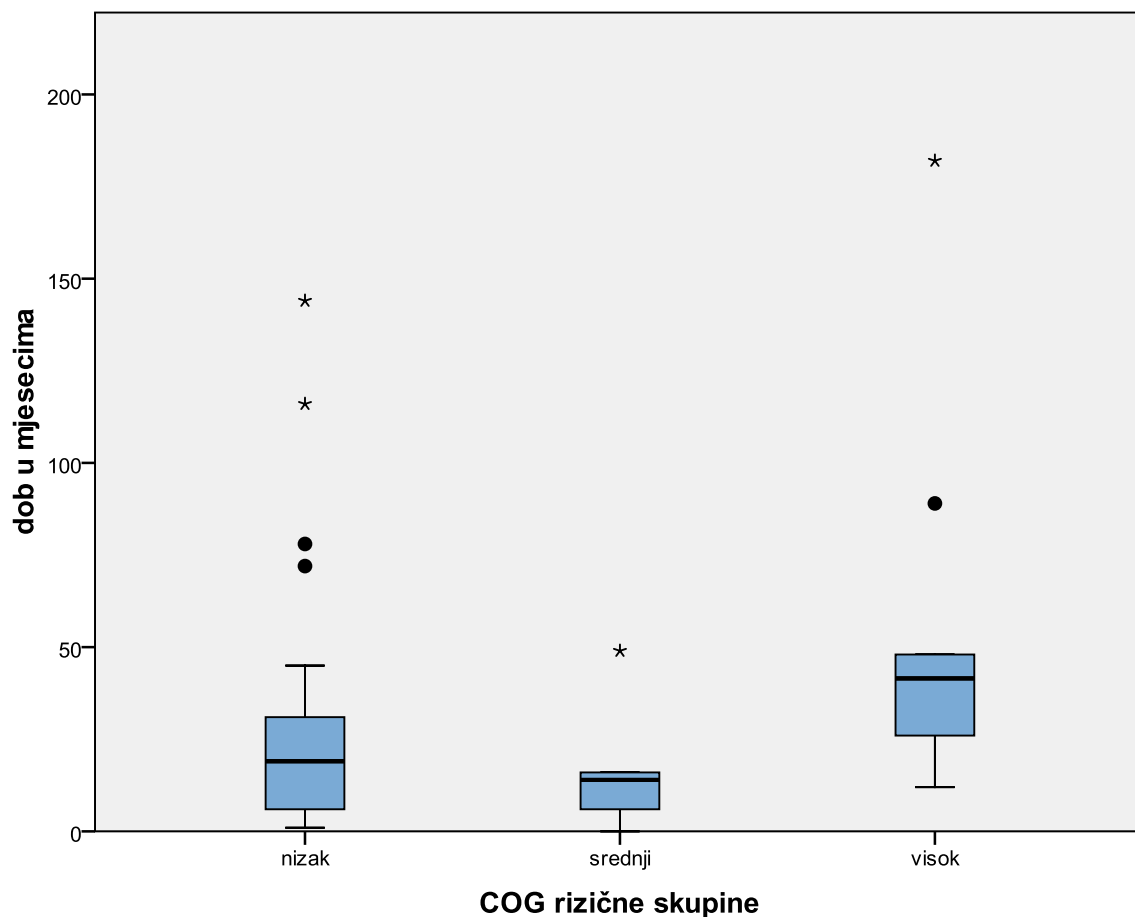
df=2, p=0,033, Slika 29.): nepovoljna histologija i nepovoljan ishod češći su kod starijih ispitanika u ovom istraživanju, kao što je i za starije ispitanike procijenjen veći rizik (COG) nego za mlađe. Ostale povezanosti nisu statistički značajne.



Slika 27. Usporedba skupine s povoljnom i skupine s nepovoljnom histologijom obzirom na dob



Slika 28. Usporedba skupine s povoljnim i skupine s nepovoljnim ishodom obzirom na dob



Slika 29. Usporedba skupina s različitim razinama rizika obzirom na dob

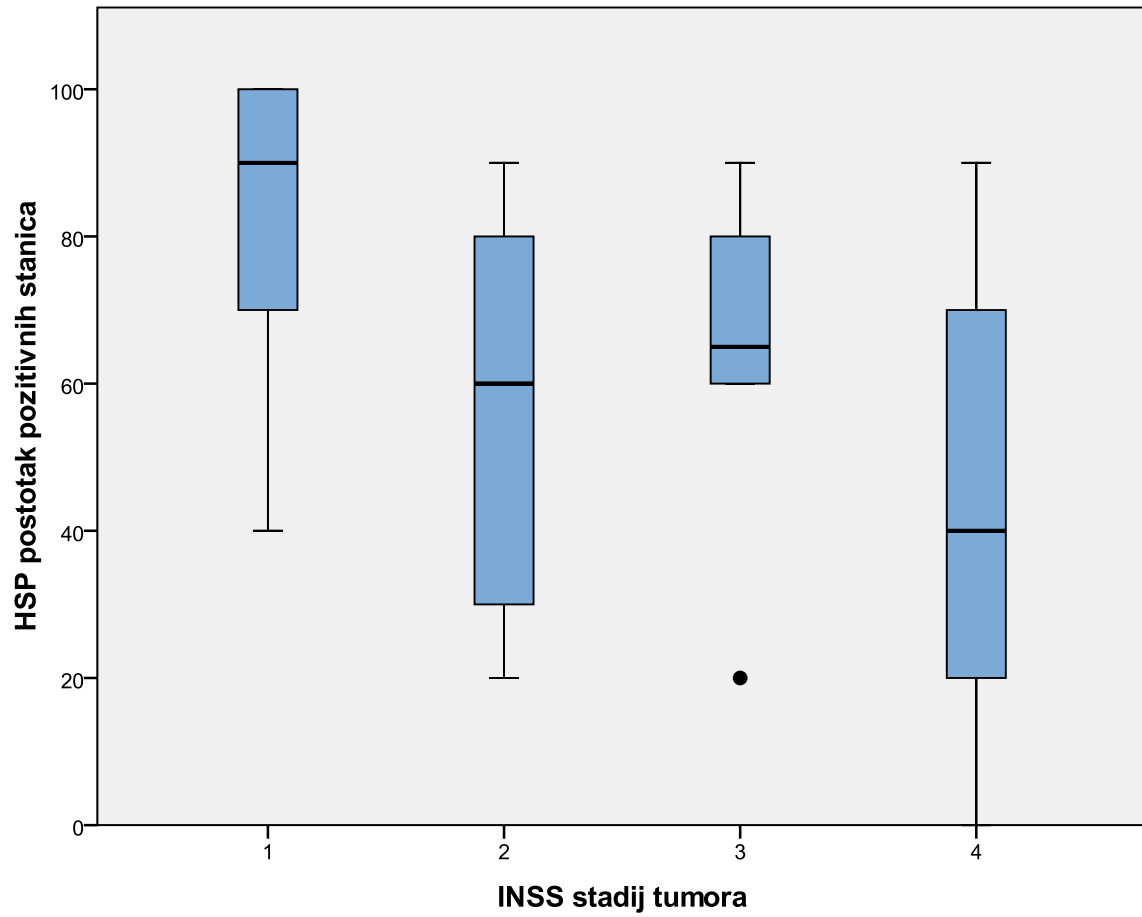
Povezanost između stadija neuroblastoma, MYCN ekspresije, povoljne/nepovoljne histologije, COG rizika, i (ne)povoljnosti ishoda

Utvrđene su statistički značajne povezanosti između INSS stadija tumora i COG rizičnih skupina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,810, $p < 0,001$; hi-kvadrat test: $\chi^2 = 33,954$, $df = 6$, $p < 0,001$), kao i između INRGSS stadija tumora i COG rizičnih skupina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,696, $p < 0,001$; hi-kvadrat test: $\chi^2 = 21,033$, $df = 4$, $p < 0,001$): kod viših stadija tumora procijenjen je veći rizik; između INSS stadija tumora i (ne)povoljnosti ishoda (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,488, $p < 0,001$; hi-kvadrat test: $\chi^2 = 15,509$, $df = 3$, $p = 0,001$), kao i između INRGSS stadija tumora i (ne)povoljnosti ishoda (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,511, $p < 0,001$; hi-kvadrat test: $\chi^2 = 13,998$, $df = 2$, $p = 0,001$): kod viših stadija tumora, nepovoljan ishod je češći; između ekspresije MYCN i povoljne/nepovoljne histologije (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,357, $p = 0,020$; hi-

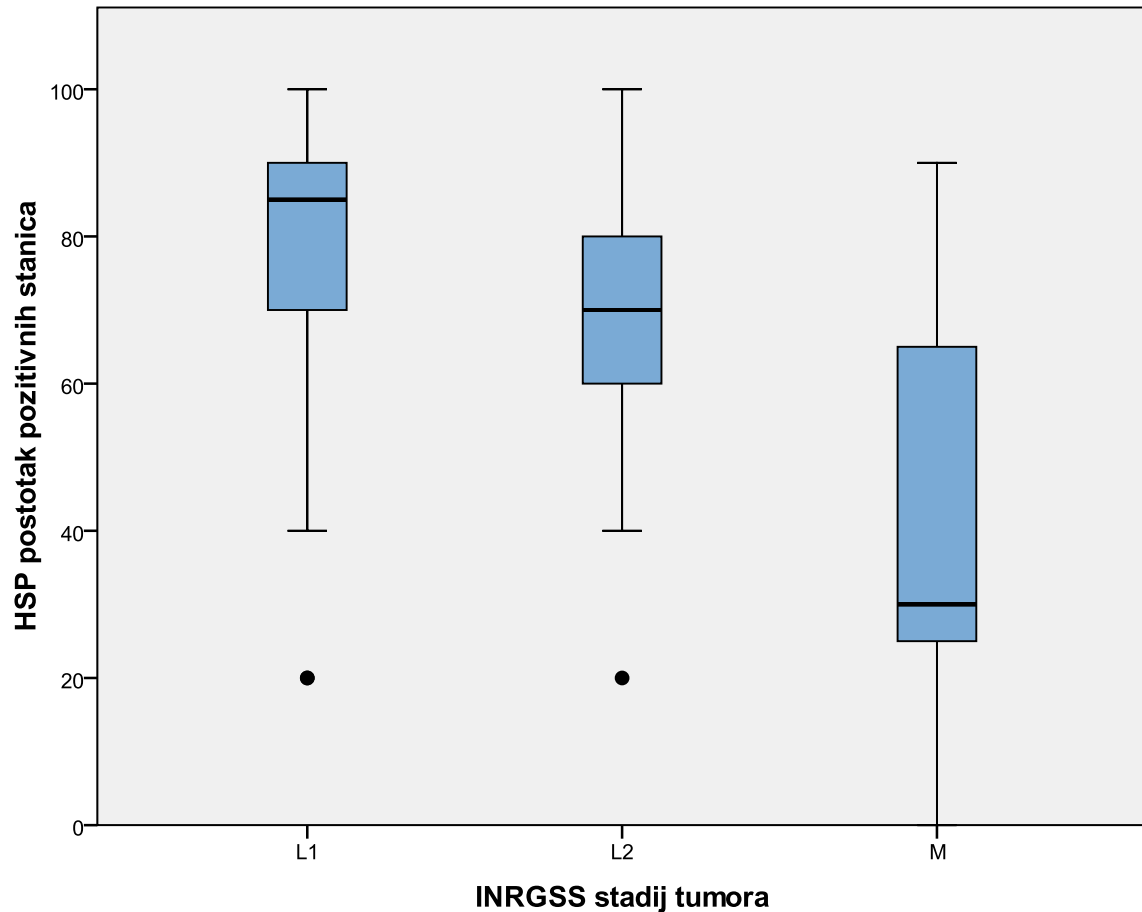
kvadrat test: $\chi^2=5,347$, $df=1$, $p=0,021$): u slučajevima s amplificiranim *MYCN* češća je nepovoljna histologija; između ekspresije *MYCN* i COG rizičnih skupina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,428, $p=0,005$; hi-kvadrat test: $\chi^2=15,138$, $df=2$, $p=0,001$): u slučajevima s amplificiranim *MYCN* procijenjen je veći rizik; između ekspresije *MYCN* i (ne)povoljnosti ishoda (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,510, $p=0,001$; hi-kvadrat test: $\chi^2=10,918$, $df=1$, $p=0,001$): u slučajevima s amplificiranim *MYCN* češći je nepovoljan ishod; između povoljne/nepovoljne histologije i COG rizičnih skupina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,471, $p=0,002$; hi-kvadrat test: $\chi^2=11,467$, $df=2$, $p=0,003$): u slučajevima s nepovoljnom histologijom procijenjen je veći rizik; između povoljne/nepovoljne histologije i (ne)povoljnosti ishoda (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,510, $p=0,001$; hi-kvadrat test: $\chi^2=10,938$, $df=1$, $p=0,001$): u slučajevima s nepovoljnom histologijom češći je nepovoljan ishod; između COG rizičnih skupina i (ne)povoljnosti ishoda (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,652, $p<0,001$; hi-kvadrat test: $\chi^2=19,328$, $df=2$, $p<0,001$): kod slučajeva s većim rizikom češći je nepovoljan ishod.

Povezanost izraženosti čimbenika stanične smrti, stadija neuroblastoma, MYCN ekspresije, povoljne/nepovoljne histologije, COG rizika, i (ne)povoljnosti ishoda

Dobivene su statistički značajne povezanosti između INSS stadija tumora i udjela HSP pozitivnih stanica (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,543, $p<0,001$; Kruskal-Wallis test: $\chi^2=13,399$, $df=3$, $p=0,004$; Slika 30.), kao i između INRGSS stadija tumora i udjela HSP pozitivnih stanica (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,462, $p<0,001$; Kruskal-Wallis test: $\chi^2=9,166$, $df=2$, $p=0,01$, Slika 31.): kod tumora nižih stadija utvrđen je veći udio HSP pozitivnih stanica u odnosu na tumore viših stadija.

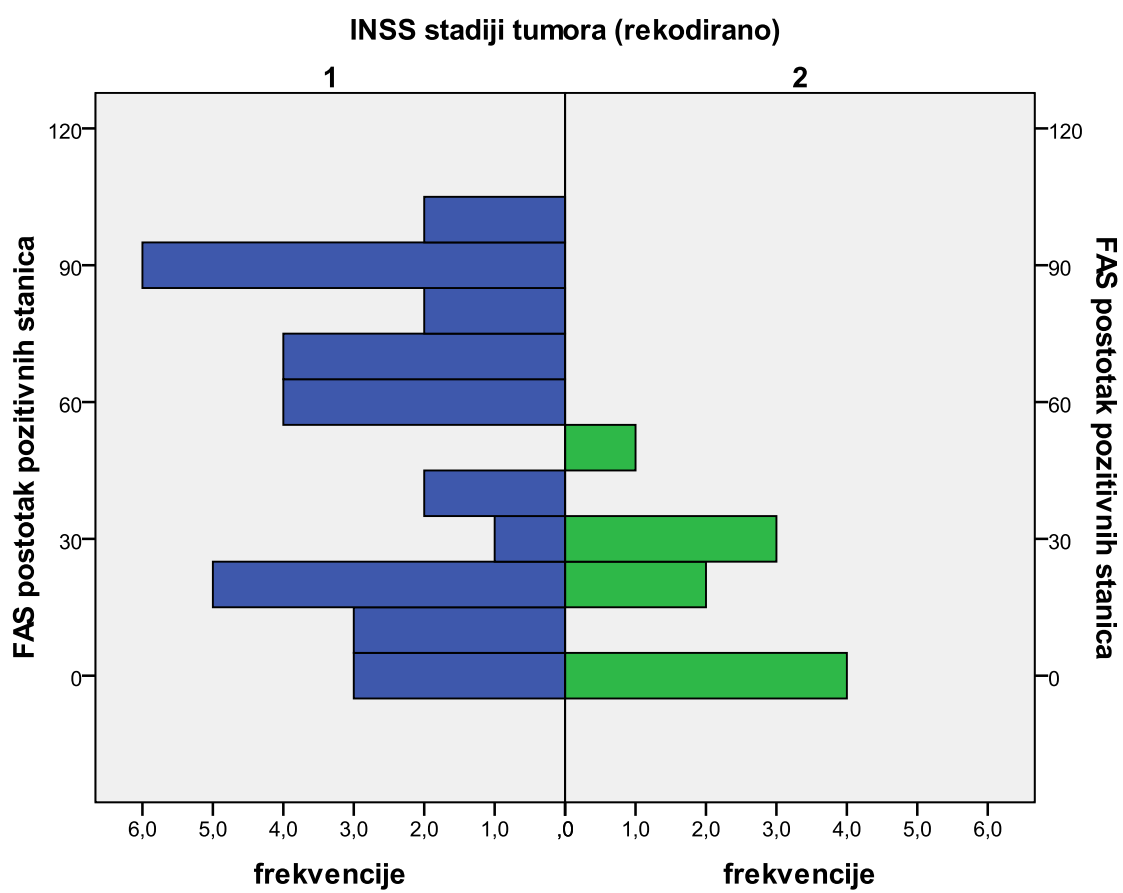


Slika 30. Usporedba različitih stadija tumora (INSS klasifikacija) obzirom na izraženost stanica pozitivnih na HSP



Slika 31. Usporedba različitih stadija tumora (INRGSS klasifikacija) obzirom na izraženost stanica pozitivnih na HSP

Mogući razlog zbog kojeg nisu dobivene značajne povezanosti između stadija tumora i drugih čimbenika stanične smrti jest mali broj ispitanika po pojedinim stadijima tumora. Ukoliko se spoje stadiji I, II i III INSS klasifikacije (broj ispitanika = 32; 76,2%), a metastatski stadij IV se ostavi (broj ispitanika=10; 23,8%), osim značajne povezanosti s udjelom HSP pozitivnih stanica (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,388, $p=0,011$; Mann Whitney U: $U= 76,500$, $N1=32$, $N2=10$, $p=0,012$), dobiva se i značajna povezanost s udjelom FAS pozitivnih stanica (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,415, $p=0,006$; Mann Whitney U: $U= 70,500$, $N1=32$, $N2=10$, $p=0,007$, Slika 32.): što je tumor agresivniji, to je manji udio stanica pozitivnih na Fas!



Slika 32. Usporedba različitih stadija tumora (INSS klasifikacija) obzirom na udio stanica na FAS

Povezanosti između izraženosti čimbenika stanične smrti i *MYCN* ekspresije, povoljne/nepovoljne histologije, COG rizika i (ne)povoljnosti ishoda nisu statistički značajne (provjereno Spearmanovim koeficijentom korelacije, Mann-Whitney U testom i Kruskal-Wallis testom).

5 RASPRAVA

Gotovo svaki originalni rad, pregledni članak ili poglavlje u udžbeniku o neuroblastomu počinje istom rečenicom – neuroblastom je poseban tumor, izrazito varijabilnog kliničkog i biološkog tijeka. Svrstati pacijenta u ispravnu rizičnu skupinu, osim procjene ishoda, vrlo je važno i za odabir liječenja, jer je za određene skupine kirurška terapija dovoljna dok je za druge potrebna intenzivna multimodalna terapija sa svim njenim mogućim rizicima i nepovoljnim događajima. Stoga se iznova analiziraju postojeći nezavisni rizični čimbenici i istovremeno se traga za novim, pouzdanijim i preciznijim (157, 182, 183, 184).

U ovom istraživanju pokušano je na uzorcima tkiva analizirati korelaciju s različitim čimbenicima stanične smrti i tako dati dodatni uvid u biologiju neuroblastoma i način njegove interakcije s imunostimulacijskim sustavom. Ono što analizu ekspresije bilo kojeg čimbenika u neuroblastomu čini dodatno otežanim je i njegova raznolika histološka slika. Postoji sedam histoloških tipova neuroblastoma i na većini njih se može na istom preparatu naći mitotski aktivne neuroblaste i zrele ganglijske stanice koji sigurno potpuno različito reagiraju s bilo kojim protutijelima da dođu u kontakt.

Promatrajući povezanost ekspresije Fas-a i FasL-a nađeno je samo da postoji povezanost između pojačane ekspresije Fas-a i nižih (prva 3) stadija, a smanjene kod četvrtog, metastatskog stadija. Qiang-Song Tong i suradnici (185), istražujući ekspresiju Fas i FasL-a na stanicama neuroblastoma našli su pojačanu ekspresiju Fas-a i smanjenu ekspresiju FasL-a kod prva dva stadija, a suprotno tome, smanjenu ekspresiju Fas-a i pojačanu FasL-a kod trećeg i četvrtog. U istom istraživanju također su pronašli povezanost ekspresije Fas/FasL-a s povoljnom odnosno nepovoljnom histologijom tumora. Uzorak tog istraživanja kao i metoda su gotovo identični ovom istraživanju, a moguće objašnjenje za različite rezultate možda leži u tome da su oba uzorka relativno mala, te u činjenici da su Tong i suradnici prema dobivenim udjelima pozitivnih stanica rezultate svrstali u četiri skupine, odnosno stupnja, koji međusobno nemaju niti jednake razmake niti su utemeljeni na statističkoj analizi. Radi dodatne provjere, u ovom istraživanju, mi smo učinili i analizu određivši skupine na njihov način, ali nije dobivena značajna razlika. S druge strane, značajan rezultat dobiven je u našem istraživanju, kada su tumori grupirani u lokalno ograničene (prva tri stadija) i metastatski, četvrti stadij. Tako dobiveni rezultati odgovaraju studiji Takehare i suradnika na stanicama hepatocelularnog karcinoma (16). Moguće objašnjenje rezultata ovog istraživanja je da tumor smanjenom ekspresijom Fas-a može izbjeći lokalni imunostimulacijski odgovor i tako metastazirati. Kod stanica kolorektalnog karcinoma primijećeno je, međutim, da se ekspresija

Fas i FasL može dovesti u vezu samo s intratumorskom gustoćom krvnih žila (koja govori o neoangiogenezi i može se povezati s agresivnijim oblicima tumora), a ne s ostalim karakteristikama tumora. U drugim studijama dokazano je da kod stanica kolorektalnog karcinoma postoji značajno jača ekspresija FasL u odnosu na normalne stanice kolorektalne sluznice (17-20), iako kod jednog određenog podtipa kolorektalnog karcinoma ta povezanost nije dokazana (186). Lim i suradnici (21) nisu našli povezanost ekspresije Fas/FasL-a sa stadijima adenokarcinoma želuca niti s njegovim drugim biološkim i prognostičkim čimbenicima. Utvrdili su, međutim, povezanost ekspresije Fas/FasL-a i citotoksičnih T limfocita. Našli su statistički značajno smanjen broj limfocita oko FasL pozitivnih regija uz jače izraženu apoptozu limfocita. Ovi rezultati sugeriraju da stanice karcinoma želuca putem Fas receptora na limfocitima mogu inducirati njihovu apoptozu, što ide u prilog teoriji o „tumorskom protunapadu“ (21). Neke studije upućuju na činjenicu da Fas receptor može biti prisutan na staničnoj membrani, ali da ne bude aktivan i da se pod određenim utjecajem „aktivira“ (22). Ti rezultati ohrabruju jer otvaraju mogućnost da pojačavanjem ekspresije Fas-a na membrani tumorske stanice ona postane osjetljivija na imunski napad.

Ono što je također utvrđeno u ovom istraživanju je statistički značajna povezanost između udjela Fas pozitivnih stanica i udjela perforin CTL pozitivnih stanica (0,341; $p=0,027$). Što je veći udio Fas pozitivnih stanica, veći je i udio perforin CTL pozitivnih stanica. Obzirom da su Fas/FasL i perforinski put prema mehanizmu djelovanja dva odvojena puta, može se samo pretpostavljati da oni kod neuroblastoma djeluju istovremeno, odnosno da postoji neki zajednički aktivator. Analizom podataka dobivena je i povezanost između udjela FasL pozitivnih stanica i udjela HSP pozitivnih stanica (0,344, $p=0,026$). Što je veći udio FasL pozitivnih stanica, veći je i udio HSP pozitivnih stanica. Moguće je da ova dva puta imaju zajedničkog aktivatora, ali prema pretpostavci bi FasL udio trebao biti veći kod agresivnijih, metastatskih tumora (u ovom istraživanju takav rezultat nije dobiven), a HSP prema ovim rezultatima snižen. Naglasio bih da ova povezanost može biti i slučajna obzirom na veličinu uzorka.

Nije nađena povezanost ekspresije perforina na citotoksičnim T limfocitima s bilo kojom karakteristikom tumora. Nakanishi i suradnici su još prije dvadeset godina pokazali da kod nižih stadija kolorektalnog karcinoma (Dukes A) postoji pojačana ekspresija, odnosno povećan broj perforin pozitivnih citotoksičnih T limfocita u okolini tumora, a kod viših manji i te predložili da je to mehanizam kojim se odvija interakcija tumora i imunskog sustava (187).

Najkonzistentnija povezanost bioloških i prognostičkih karakteristika ustanovljena je kod analize HSP70. Tumorske stanice imaju veće metaboličke potrebe nego normalna stanica i stoga imaju veću potrebu za pratiteljima kao što je HSP70, nego netransformirana stanica (188). Istraživanja su pokazala da HSP70 ima značajnu ulogu u zaštiti stanice od brojnih proapoptičkih čimbenika kao što su oštećenje DNA, zračenje ili protutumorski lijekovi (163). Poznato je da HSP70 direktno inhibira nekoliko ključnih koraka u unutarnjem i vanjskom putu programirane stranične smrti. Na razini receptora HSP70 se veže na receptore stanične smrti DR4 i DR5 i na taj način inhibira nastajanje i aktivnost DISC-a. Na premitohondrijskoj razini, HSP70 se veže i blokira aktivnost nesavijenog proteina JNK1 (engl. *JunN terminal kinase*), također se veže na nefosforiliranu protein kinazu C i Akt i stabilizira oba proteina (183). Na mitohondrijskoj razini, HSP70 inhibira translokaciju Bax i njegovo umetanje u membranu mitohondrija i na taj način prevenira permeabilizaciju membrane i oslobađanje citokroma c i AIF. Na postmitohondrijskoj razini HSP70 se veže izravno na Apaf1 i sprečava prijenos prokaspaze 9 u apoptosom. Tijekom posljednje faze apoptoze, kromosomska DNA se razgrađuje pomoću dnaze CAD (engl. *caspase activated Dnase*) nakon aktivacije kaspaze 3. Enzimatska aktivnost i pravilno savijanje CAD je regulirano pomoću HSP70. Stoga povećana ekspresija HSP70 u različitim vrstama tumorskih stanica povećava njihovu sposobnost preživljavanja, dok je njeno smanjenje ekspresija dovoljna da omogući apoptozu stanice (164, 189). Ova pojačana ekspresija HSP70 je kod većine tumora udružena sa slabom diferencijacijom tumora, višim stadijem bolesti, s lošom prognozom i većom rezistencijom tumora na kemoterapeutike i to kod brojnih tumora kao što su karcinom dojke, želuca, debelog crijeva, mokraćnog mjehura i karcinom usne šupljine (166-171). Iako je u svim ovim studijama analizirana ekspresija u odnosu na stadij tumora, a ne sam način na koji HSP70 djeluje i zašto je pojačano eksprimiran, pretpostavka je svih autora da pojačana ekspresija na mitohondrijskoj razini inhibira apoptozu premalignih stanica. Međutim, uloga HSP70 kao mogućeg prognostičkog čimbenika je i dalje proturječna. Pojačana ekspresija HSP70 kod nižih stadija karcinoma jednjaka udružena je s povoljnijom prognozom kao i kod malignih melanoma i nefroblastoma (172-175), dok nije nađena povezanost između ekspresije HSP70 i prognoze za karcinome prostate, jajnika i jezika, kao niti osteosarkoma (176-179). Kod neuroblastoma značaj HSP70 nije još dovoljno istražen budući da postoji samo jedno istraživanje s relativno malim brojem uzoraka na temelju kojih nije moguće izvući detaljnije zaključke. Iz rezultata našeg istraživanja može se zaključiti da je HSP70 pojačano izražen kod tumora nižih stadija koji imaju bolju prognozu. Naime, u određenim uvjetima povećana ili smanjena ekspresija HSP može utjecati ne samo na

programiranu staničnu smrt nego i na proces diferencijacije stanice. Iako se čini da su apoptoza i diferencijacija dva suprotna fiziološka procesa, oni imaju zajednička obilježja kao što su kondenzacija kromatina i aktivacija kaspaza. Dokazano je da je tijekom diferencijacije, oslobađanje mitohondrijalnih apoptotičkih molekula ključno za aktivaciju kaspaza što upućuje na to da su kaspaze posrednici između apoptoze i diferencijacije. Vrijeme, intenzitet i smještaj kaspaza unutar stanice, mogu je usmjeriti prema smrti ili diferencijaciji, a HSP bi mogao biti ključni čimbenik u određivanju njene sudbine. Da HSP imaju značajnu ulogu u diferencijaciji stanica zaključilo se iz činjenice da je njegova ekspresija strogo nadzirana tijekom različitih stadija staničnog rasta i preobrazbe, kao na primjer tijekom procesa enhondralnog stvaranja kosti (190). Tijekom postnatalnog razvoja, u vrijeme kada se događa izražena diferencijacija, ekspresija HSP-a strogo je nadzirana u svim tkivima, a posebno u stanicama neuralnog tkiva (191). U diferencijaciji K562 eritroleukemijskih staničnih linija induciranoj heminom, povećano su inducirani geni koji kodiraju HSP. Kada se diferencijacija hematopoetskih stanica potakne s M-CSF dolazi do dramatičnog porasta ekspresije HSP70 (192). Čini se da HSP70 ima značajnu ulogu i u diferencijaciji stanica bubrega. Radovi su pokazali da postoji kolokalizacija WT1 i HSP70 u embrionalnim bubrežnim stanicama kod štakora, podocitima tijekom ranih faza razvoja bubrega i stanicama Wilmsovog tumora. Čini se da je njihova kolokalizacija nužna za funkciju supresora WT1 u inhibiciji proliferacije ovih stanica (193). Možemo pretpostaviti da uloga HSP70 u ovom tumoru nije inhibicija apoptoze nego koregulacija proliferacije stanice zajedno s tumorskim supresorom. Stoga ne iznenađuje da je HSP70 pojačano izražen kod stanica nefroblastoma nižih stadija, dok je kod viših stadija kod kojih postoji mutacija WT1 gena, smanjeno izražen što je pokazala jedna druga studija (194). Ovi rezultati nas navode da je utjecaj HSP70 na procese diferencijacije veći nego na inhibiciju apoptoze kod dječjih tumora. Ekspresija HSP27 također je jedan od diferencijacijskih čimbenika za keratinocyte iz kože i C2C12 mišićne stanične linije. Ova uloga HSP27 u diferencijaciji stanica mogla bi biti povezana s činjenicom da se ekspresija HSP27 povećava kako se stanica približava neproliferativnom stadiju staničnog ciklusa (195, 196). Subcelularna lokalizacija je drugi mehanizam pomoću kojem HSP može odrediti hoće li stanica umrijeti ili se diferencirati. Nedavna istraživanja su pokazala presudnu ulogu nuklearnog HSP70 u diferencijaciji eritrocita. Tijekom njihovog nastanka, pod utjecajem diferencijacijskih čimbenika iz okoline, HSP70 i aktivirana kaspaza 3 nakupljaju se u jezgri eritroblasta pri čemu je HSP70 združen s GATA1 te time štiti ovaj transkripcijski čimbenik, koji je potreban za normalnu eritropoezu, od djelovanja kaspaze 3. Kao posljedica toga eritroblasti se nastavljaju diferencirati umjesto da uđu u programiranu staničnu smrt. Osim

toga, tijekom eritropoeze, HSP70 se veže na AIF i time blokira AIF-om induciranu apoptozu te tako omogućava staničnu diferencijaciju (197). O važnosti smještaja HSP 70 u stanici govori i istraživanje na stanicama nazofaringealnog karcinoma. Različit smještaj HSP70 podudara se s različitom prognozom bolesti. Pojačana ekspresija membranskog i citoplazmatskog HSP70 povezana je s povoljnijom prognozom, nižim stadijem tumora, povratom bolesti i metastazama, dok je njegova pojačana ekspresija u jezgri povezana s nepovoljnim ishodom, uznapredovalim stadijem bolesti, povratom tumora, metastazama i histološki nepovoljnijim tipom tumora. Membranski i citoplazmatski HSP70 bi tako mogao imati protumorsku ulogu, dok bi jezgri oblik bio udružen s protumorskom ulogom (198). Dokazano je također da pojedini kemoterapeutici poput triptolida mogu blokirati HSP70 na staničnim linijama neuroblastoma i tako potaknuti apoptozu, odnosno regresiju tumora (199). Osim toga HSP ima značajnu ulogu u imunogeničnosti tumora obzirom da nosi tumorske antigene. Peptidi kojima HSP70 služi kao nosač, dobiveni iz citoplazme humanih tumora mogu aktivirati T stanice posredovani imunski odgovor koji obuhvaća prezentaciju kompleksa HSP-peptid antigen prezentirajućim stanicama i prezentacija antigena u sklopu MHC I razreda i specifičnim CD8+ T limfocitima (198).

Iz dostupnih studija može se zaključiti da uloga ovog molekularnog pratitelja u diferencijaciji određuje njegovu prolaznu ekspresiju, staničnu raspodjelu i/ili posttranslacijsku preinaku potaknutu u različitim staničnim stadijima različitim čimbenicima diferencijacije. HSP ometanjem aktivnosti kaspaza u određenom trenutku, u specifičnom staničnom odjeljku može odrediti hoće li se stanica diferencirati ili umrijeti posredstvom apoptoze, a može utjecati i na diferencijaciju nadziranjem prometa proteina između jezgre i citoplazme. Stoga se može pretpostaviti da je uloga HSP70 kod neuroblastoma s jedne strane u poticanju stanične diferencijacije, a s druge strane kao nositelj tumorskih antigena potiče imunski sustav na prepoznavanje tumora kao stranog i aktivira stanice imunskog sustava da takve stanice imunskim mehanizmima odstrane (188).

6 ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem utvrđen je slabije izražen Fas na metastatskim stadijima tumora tako da se može pretpostaviti da tumorske stanice smanjenjem ekspresije Fas-a na svojoj površini mogu izbjeći lokalni odgovor imunskog sustava i tako metastazirati.

Našli smo također, da postoji povezanost ekspresije HSP70 i stadija neuroblastoma. Viši stadiji imaju smanjenu ekspresiju što je u suprotnosti s većinom tumora koji su do sada istraživani, no s druge strane se slaže s istraživanjima na nefroblastomu, drugom najčešćem solidnom tumoru dječje dobi. Najvjerojatnije objašnjenje, prema dosadašnjim istraživanjima i prema rezultatima našeg istraživanja, je da kod tumora dječje dobi sudjelovanje HSP70 u inhibiciji apoptoze nije toliko značajno kao sudjelovanje u diferencijaciji tumora te da njegova pojačana ekspresija u neuroblastoma dovodi do sazrijevanja tumora.

Daljnja istraživanja na većim uzorcima, kao i istraživanja načina poticanja ili inhibicije apoptotičkih i diferencijacijskih čimbenika su nužni za bolje razumijevanje i bolje ishode u liječenju neuroblastoma.

7 LITERATURA

1. Castleberry RP. Neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997;33:1430-7.
2. Castleberry RP. Predicting outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1999;340:1992-3.
3. Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol Today.* 1995;16:194-201.
4. Smyth MJ, Trapani JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today.* 1995;16:202-6.
5. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281:1305-8.
6. Gross C, Koelch W, DeMaio A, Arispe N, Multhoff G. Cell surface-bound heat shock protein 70 (HSP70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *J Biol Chem.* 2003;278:41173-81.
7. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, i sur. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer.* 2009;100:1471-82.
8. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell.* 1995 Apr 7;81(1):9-12.
9. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 1995;267:1449-56.
10. Hahne M, Rimoldi D, SchröterM, Romero P, SchreierM, French LE, i sur. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science.* 1996; 274:1363-6.

11. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, i sur. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells a mechanism of immune evasion? *Nat Med.* 1996; 2:1361-6.
12. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.* 1998;254:439-59.
13. Vaux DL. Immunopathology of apoptosis - introduction and overview. *Springer Semin Immunopathol.* 1998;19:271-8.
14. Maher S, Toomey D, Condron C, Bouchier-Hayes D. Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol Cell Biol.* 2002;80:131-7.
15. Bagatell R, Beck-Popovic M, London WB, Zhang Y, Pearson AD, Matthay KK, i sur. Significance of MYCN amplification in International Neuroblastoma Staging System stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Risk Group Database. *J Clin Oncol.* 2009;27:365-70.
16. Takehara T, Hayashi N. Fas and Fas ligand in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2001;36:727-8.
17. Okada K, Komuta K, Hashimoto S, Matsuzaki S, Kanematsu T, Koji T. Frequency of apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes induced by fas counterattack in human colorectal carcinoma and its correlation with prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3560-4.
18. Zhang W, Ding EX, Wang Q, Zhu DQ, He J, Li YL. Fas ligand expression in colon cancer: a possible mechanism of tumor immune privilege. *World J Gastroenterol.* 2005;11:3632-5.
19. Zhu Q, Liu JY, Xu HW, Yang CM, Zhang AZ, Cui Y, i sur. Mechanism of counterattack of colorectal cancer cell by Fas/Fas ligand system. *World J Gastroenterol.* 2005;11:6125-9.

20. Pryczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K, Kemon A. Fas/FasL expression in colorectal cancer. An immunohistochemical study. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010;48:425-9.
21. Lim SC. Fas-related apoptosis in gastric adenocarcinoma. *Oncol Rep.* 2003;10:57-63.
22. Bernstorff WV, Glickman JN, Odze RD, Farraye FA, Joo HG, Goedegebuure PS, i sur. Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape. *Cancer.* 2002; 15;94:2552-60.
23. Sawada T, Sugimoto T, Kawakatsu H, Matsumura T, Matsuda Y. Mass screening for neuroblastoma in Japan. *Pediatr Hematol Oncol.* 1991;8:93–109.
24. Woods W, Gao RN, Shuster JJ, Robinson LL, Bernstein M, Weitzman S, i sur. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2002;346:1041-6.
25. Schilling FH, Parker C. Mass screening in neuroblastoma: the European experience. U: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Vote Pa (eds). *Neuroblastoma.* Amsterdam: Elsevier;200, 281-92.
26. Oue T, Inoue M, Yoneda A, Kubota A, Okuyama H, Kawahara H, i sur. Profile of neuroblastoma detected by mass screening, resected after observation without treatment: results of the Wait and See pilot study. *J Pediatr Surg.* 2005;40:359-63.
27. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer.* 1995;3:203-16.
28. Hasse GM, LaQuaglia MP. Neuroblastoma. U: Ziegler M, Azizkhan RG, Weber TR (eds). *Operative pediatric surgery.* New York: McGraw-Hill; 2003,181-91.
29. Grosfeld JL. Neuroblastoma. U: Grosfeld JL, O'Neill JA Jr, Coran AG, Fonkalsrud EW (eds). *Pediatric surgery.* Vol 1, 6th ed. Philadelphia: Mosby; 2006.
30. Al-Rashid RA, Cress C. Hypercalcemia associated with neuroblastoma. *Am J Dis Child.* 1979;133:838-41.

31. Brock CE, Ricketts RR. Hemoperitoneum from spontaneous rupture of neonatal neuroblastoma. *Am J Dis Child.* 1982;136:370-1.
32. Young DG. Thoracic neuroblastoma/ganglioneuroma. *J Pediatr Surg.* 1983;18:37-41.
33. Grosfeld JL. Risk based management of childhood solid tumors. *J Am Coll Surg.* 1999;189:407-25.
34. Adkins ES, Sawin R, Gerbing RB, London WB, Matthay SK, Haase GM. Efficacy of complete resection for high risk neuroblastoma: a Children's Cancer Group study. *J Pediatr Surg.* 2004;39:931-6.
35. Rudnick C, Khakoo Y, Antunes NL. Opsoclonus-myoclonus ataxia syndrome in neuroblastoma: clinical outcome and antineural antibodies – a report from the Children's Cancer Group study. *Med Pediatr Oncol.* 2001;36:612-22.
36. Kudo K, Kitajima S, Munakata H, Yagihashi S. WDHA syndrome caused by VIP-producing ganglioneuroblastoma. *J Pediatr Surg.* 1982;17:426-8.
37. Green AA, Hayes FA, Hustu HO. Sequential cyclophosphamide and doxorubicin for induction and complete remission in children with disseminated neuroblastoma. *Cancer.* 1981;48:2310-7.
38. Hayes FA, Green AA, Hustu HO, Kumar ML. Surgicopathologic staging of neuroblastoma: prognostic significance of regional lymph node metastases. *J Pediatr.* 1983;102:59-62.
39. Brodeur GM. Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas. *Eur J Cancer.* 1995;31A:505-10.
40. Jaing TH, Yang CP, Hung IJ, Wang HS, Tseng CK, Hsueh C. Brain metastases in children with neuroblastoma – a single institution experience. *Med Pediatr Oncol.* 2003;41:570-1.

41. Laug WE, Siegel SE, Shaw KN, Landing B, Baptista J, Gutenstein M. Initial urinary catecholamine metabolite concentrations and prognosis in neuroblastoma. *Pediatrics*. 1978;62:77-83.
42. Tapia FJ, Barbosa AJ, Marangos PM, Polak JM, Bloom SR, Dermody C. Neuron specific enolase is produced by neuroendocrine tumors. *Lancet*. 1981;8224:808-11.
43. Odelstad L, Pålman S, Läckgren G, Larson E, Grotte G, Nilsson K. Neuron specific enolase: a marker for differential diagnosis of neuroblastoma and Wilms' tumor. *J Pediatr Surg*. 1982;17:381-5.
44. Shuster JJ, McWilliams MB, Castleberry R, Nitschke R, Smith EI, Altshuler G. Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma: a POG recursive partitioning study. *Am J Clin Oncol*. 1992;15:295-303.
45. Evans AE, D'Angio GJ, Randolph JG. A proposed staging for children with neuroblastoma. *Cancer* 1971;27:374-8.
46. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D'Angio GJ. International criteria for diagnosis of staging and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1988;6:1874-81.
47. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castleberry RP. Revision of the international criteria for neuroblastoma diagnosis staging and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993;11:1466-77.
48. Shimada H, Chatten J, Newton WA Jr, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T. Histopathologic prognostic factors in neuroblastoma: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 1984;73:405-16.
49. Shimada H. The International Neuroblastoma Pathology Classification. *Pathologica*. 2003;95:240-1.

50. Peuchmaur M, d'Amore ESG, Joshi VV, Hata J, Roald B, Dehner LP, i sur. Revision of the international neuroblastoma pathology classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer*. 2003;98:2274-81.
51. Breslow N, McCann B. Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma. *Cancer Res*. 1971;31:2098-103.
52. London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, i sur. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2005;23:6459-65.
53. George RE, London WB, Cohn SL, Maris JM, Kretschmar C, Diller L, i sur. Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2005;23:6466-73.
54. Schmidt ML, Lal A, Seeger RC, Maris JM, Shimada H, O'Leary M, i sur. Favorable prognosis for patients 12 to 18 months of age with stage 4 nonamplified MYCN neuroblastoma: Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol*. 2005;23:6474-80.
55. Weinstein JL, Katzenstein HM, Cohn SL. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist*. 2003;8:278-92.
56. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010;362: 2202-11.
57. Goto S, Umehara S, Gerbing RB, Stram OD, Brodeur GM, Seeger RC, i sur. Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors. *Cancer*. 2001;92:2699-708.
58. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, i sur. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*. 1983;305:245-8.

59. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, Grzeschik KH, Naylor SL, Sakaguchi AY, et al. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature*. 1984;308:288-91.
60. Schwab M, Amler LC. Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1990;1:181-93.
61. Wenzel A, Cziepluch C, Hamann U, Schürman J, Schwab M. The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max (p20/22) in human neuroblastoma cells. *EMBO J*. 1991;10:3703-12.
62. Schwab M. Molecular cytogenetics of human neuroblastoma. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1114:43-50.
63. Schwab M. Amplification of N-myc as a prognostic marker for patients with neuroblastoma. *Semin Cancer Biol*. 1993;4:13-8.
64. Corvi R, Amler LC, Savelyeva L, Gehring M, Schwab M. N-myc is retained in single copy at 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:5523-7.
65. Schneiderman J, London WB, Brodeur GM, Castleberry RP, Look AT, Cohn SL. Clinical significance of MYCN amplification and ploidy in favorable-stage neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2008;26:913-8.
66. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007;369:2106-20.
67. Papac RJ. Spontaneous regression of cancer. *Cancer Treat Rev*. 1996;22:395-423.
68. D'Angio GJ, Evans AE, Koop CE. Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis. *Lancet*. 1971;1:1046-9.

69. Evans AE, Gerson J, Schnauffer L. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1976;44:49-54.
70. Haas D, Ablin AR, Miller C, Zoger S, Matthay KK. Complete pathologic maturation and regression of stage IVS neuroblastoma without treatment. *Cancer.* 1988;62:818-25.
71. Hellstrom KE, Hellstrom I. Immunity to neuroblastomas and melanomas. *Annu Rev Med.* 1972;23:19-38.
72. Cole WH. Efforts to explain spontaneous regression of cancer. *J Surg Oncol.* 1981;17:201-9.
73. Pritchard J, Hickman JA. Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously? *Lancet.* 1994;344:869-70.
74. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, et al. Fetal growth and development. In: Cunningham FG, Leveno KL, Bloom SL, et al., eds. *Williams Obstetrics*. 23rd ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2010.
75. Pećina-Šlaus N. Genetsko molekularni aspekti apoptoze – zajedničko obilježje živih organizama. *Acta Med Croatica.* 2009;63 (Supl. 2):13-9.
76. Cohen SM, Cordeiro-Stone M, Kaufman DG. Early replication and the apoptotic pathway. *J Cell Physiol.* 2007;213:434-9.
77. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or death decisions. *Mol Immunol.* 2003;39:615-47.
78. Dash P. Apoptosis. 2008. [<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/>].
79. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:552-65.

80. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996;85:803–15.
81. Muzio, M. et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. 1996;85:817–27.
82. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91:479–89.
83. Schmitz, I., Walczak, H., Krammer, P. H. & Peter, M. E. Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. *Cell Death Differ*. 6, 821–822 (1999).
84. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102:33–42.
85. Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem*. 2002;277:432–8.
86. Jiang X, Kim H-E, Shu H, Zhao Y, Zhang H, Kofron J, et al. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin- α in a death regulatory pathway. *Science*. 2003;299:223–6.
87. Susin SA, Zamzani N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med*. 1996;184:1331–41.
88. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001;412:95–9.
89. Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, Fan Z, Greer EL, Russo ML, et al. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem*. 2001;276:43285–93 .

90. Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik, Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science*. 2002;297:1352–4.
91. Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2002;277:29803–9.
92. Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D. & Lieberman, J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 112, 659–672 (2003).
93. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. 1995;270:1189–92.
94. Poggi A, Massaro AM, Negrini S, Contini P, Zocchi MR. Tumor-induced apoptosis of human IL-2-activated NK cells: role of natural cytotoxicity receptors. *J Immunol*. 2005;174(5):2653-60.
95. Tweardy DJ, Jing N. Enhancing or eliminating signals for cell survival to treat disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2006;117:33-51; discussion 51-2.
96. Grimm M, Kim M, Rosenwald A, von Raden BH, Tsaui I, Meier E, Heemann U, Germer CT, Gasser M, Waaga-Gasser AM. Tumour-mediated TRAIL-Receptor expression indicates effective apoptotic depletion of infiltrating CD8+ immune cells in clinical colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2010 ;46(12):2314-23.
97. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest*. 2004;114: 1198–208.
98. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood*. 2006;108:804-11.
99. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:295-307.

100. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997;88:355–65.
101. Blumenthal R, Millard PJ, Henkart MP, Reynolds CW, Henkart PA. Liposomes as targets for granule cytolysin from cytotoxic large granular lymphocyte tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81:5551–5.
102. Lichtenheld MG, Olsen KJ, LuP, Lowrey DM, Hameed A, Hengartner H, i sur. Structure and function of human perforin. *Nature*. 1988;335:448–51.
103. Masson D, Peters PJ, Geuze HJ, Borst J, Tschopp J. Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH. *Biochem*. 1990;29:11229–35.
104. Griffiths GM, Argon Y. Structure and biogenesis of lytic granules. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;198:39–58.
105. Griffiths GM. Protein sorting and secretion during CTL killing. *Semin Immunol*. 1997;9:109–15.
106. Grujic M, Braga T, Lukinius A, Eloranta ML, Knight SD, Pejler G i sur. Serglycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. *J Biol Chem*. 2005;280:33411–8.
107. Grujic M, Christensen JP, Sorensen MR, Abrink M, Pejler G, Thomsen AR. Delayed contraction of the CD8₊ T cell response toward lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice lacking serglycin. *J Immunol*. 2008;181:1043–51.
108. Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol*. 2002 Jun;71(6):907-20.
109. Igney FH, Krammer PH. Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunol Immunother*. 2005 Nov;54(11):1127-36.

110. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1–27.
111. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, *i sur.* FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death—inducing signaling complex. *Cell.* 1996;85:817–827.
112. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, *i sur.* FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.* 2000;12:599–609.
113. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, *i sur.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998;17:1675–87.
114. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:67–71.
115. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, *i sur.* The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 1991;66:233–43.
116. Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, *i sur.* Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995;181:71–7.
117. Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, *i sur.* Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol.* 1995;22:3806–13.
118. Hargreaves RG, Borthwick NJ, Gilardini Montani MS, Piccolella E, Carmichael P, Lechler RI, *i sur.* Induction of apoptosis following antigen presentation by T cells: anergy and apoptosis are two separate phenomena. *Transplant Proc.* 1997;29:1102–4.

119. Ayraldi E, Zollo O, Cannarille L, D'Adamio F, Grohmann U, Delfino DV, i sur. Interleukin-6 (IL-6) prevents activation-induced cell death: IL-2-independent inhibition of Fas/FasL expression and cell death. *Blood*. 1998;92:4212–9.
120. Szabo I, Lepple-Wienhues A, Kaba KN, Zoratti M, Gulbins E, Lang F. Tyrosine kinase dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:6169–74.
121. Choi C, Benveniste EN. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004;44(1):65-81.
122. Chavarría A, Cárdenas G. Neuronal influence behind the central nervous system regulation of the immune cells. *Front Integr Neurosci*. 2013;2;7:64.
123. Greil R, Egle A, Villunger A. On the role and significance of Fas (Apo-1/CD95) ligand (FasL) expression in immune privileged tissues and cancer cells using multiple myeloma as a model. *Leuk Lymphoma*. 1998;31:477–90.
124. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*. 1998; 271:12687–90.
125. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, i sur. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. 1994;263:1759–62.
126. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J*. 1995;14: 1129–35.
127. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today*. 1996;16:569–74.

128. Ogino T, Ma Y, Than TA, Omori M, Okada S. Monochloramine enhances Fas (Apo-1/CD95) -induced apoptosis in Jurkat T cells. . *Leucok Bio.* 2000;67:46–52.
129. Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, Liston JC, Salerno CT, Knapp DJ. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res.* 1997;57:1007–12.
130. Skulachev VP. Cytochrome *c* in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 1998; 423:275–80.
131. von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signalling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation.* 1999;99:2934–41.
132. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 5th ed. New York: Garland Science; 2001.
133. Smyth MJ, Trapani JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today.* 1995; 16:202–6.
134. Sarin A, Williams MS, Alexander-Miller MA, Berzofsky JA, Zacharchuk CM, Henkart PA. Target-cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity.* 1997;6:209–15.
135. Trapani JA, Jans DA, Jans PJ, Smyth MJ, Browne KA, Sutton VR. Efficient nuclear targeting of granzyme B and the nuclear consequences of apoptosis induced by granzyme B and perforin are caspase-dependent, but cell death is caspase-independent. *J Biol Chem.* 1998;273:27934–8.
136. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis *in vivo*. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:207–32.
137. Kaiserman D, Bird PI. Control of granzymes by serpins. *Cell Death Differ.* 2010;17(4):586-95.

138. Losasso V, Schiffer S, Barth S, Carloni P. Design of human granzyme B variants resistant to serpin B9. *Proteins*. 2012;80(11):2514-22.
139. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:735-47.
140. Berthou C, Bourge JF, Zhang Y, Soulié A, Geronim D, Denizot Y, i sur.. Interferon-gamma-induced membrane PAF-receptor expression confers tumor cell susceptibility to NK perforin-dependent lysis. *Blood*. 2000;95:2329-36.
141. Lord SJ, Rajotte RV, Korbitt GS, Bleackley RC. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev*. 2003 Jun;193:31-8.
142. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:389-420.
143. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Venturo I, Marcenaro L, Giacomini P, i sur. Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:6719–23.
144. Johnsen A K, Templeton DJ, Sy M, Harding CV. Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol*. 1999;163:4224–31.
145. Ossendorp F, Eggers M, Neisig A, Ruppert T, Groettrup M, Sijts A, i sur. A single residue exchange within a viral CTL epitope alters proteasome-mediated degradation resulting in lack of antigen presentation. *Immunity*. 1996;5:115–24.
146. Pasche B. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol*. 2001;186:153–68.
147. Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino Jr, MA. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1987;166:991–8.

148. Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li XF, i sur. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol.* 1991;146:1077–82.
149. Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med.* 2001;7:1118–22.
150. Plescia OJ, Smith AH, Grinwich K. Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 1975;72:1848–51.
151. Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL, i sur. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:1486–90.
152. Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, i sur. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med.* 1993;177:265–72.
153. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, i sur. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med.* 1996;2:1096–103.
154. McLemore TL, Hubbard WC, Litterst CL, Liu MC, Miller S, McMahon NA, i sur. Profiles of prostaglandin biosynthesis in normal lung and tumor tissue from lung cancerpatients. *Cancer Res.* 1988;48:3140–7.
155. Rosen D, Li JH, Keidar S, Markon I, Orda R, Berke G. Tumor immunity in perforin-deficient mice: a role for CD95 (Fas/APO-1). *J Immunol.* 2000;164(6):3229-35.
156. Curcio C, Di Carlo E, Clynes R, Smyth MJ, Boggio K, Quaglino E, i sur. Nonredundant roles of antibody, cytokines, and perforin in the eradication of established Her-2/neu carcinomas. *J Clin Invest.* 2003;111(8):1161-70.

157. Teitz T, Stanke JJ, Federico S, Bradley CL, Brennan R, Zhang J, i sur. Preclinical models for neuroblastoma: establishing a baseline for treatment. *PLoS One*. 2011 Apr 29;6(4):e19133.
158. Suzuki T, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol Med*. 2002;31:488–93.
159. Beck F, Neuhofer W, Muller E. Molecular chaperones in the kidney: Distribution, putative roles, and regulation. *Am. J. Physiol*. 2000;279:203–15.
160. Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase—role and significance in cancer. *Int J Med Sci*. 2004;1:101–15.
161. Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg*. 1999;29:748–51.
162. Gross C, Koelch W, DeMaio A, Arispe N, Multhoff G. Cell surface-bound heat shock protein 70 (HSP70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *J Biol Chem*. 2003;278:41173-81.
163. Beere HM, Green DR. Stress management—heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2001;11:6–10.
164. Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, i sur. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene*. 2003; 22:6669–78.
165. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*. 2000; 2:469–75.

166. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SAW, Welch MJ, McGuire WL. Heat shock protein HSP70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:570–4.
167. Thanner F, Sütterlin MW, Kapp M, Rieger L, Kristen P, Dietl J, i sur. Heat-shock protein 70 as a prognostic marker in node-negative breast cancer. *Anticancer Res.* 2003;232A:1057–62.
168. Canöz O, Belenli O, Papiroglu TE. General features of gastric carcinomas and comparison of HSP70 and NK cell immunoreactivity with prognostic factors. *Pathol Oncol Res.* 2002;8:262-9.
169. Lazaris AC, Theodoropoulos GE, Davaris PS, Panoussopoulos D, Nakopoulou L, Kittas C, i sur. Heat shock protein 70 and HLA-DR molecules tissue expression. Prognostic implications in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1995;38:739-45.
170. Syrigos KN, Harrington KJ, Karayiannakis AJ, Sekara E, Shatziyianni E, Syrigou EI, i sur. Clinical significance of heat shock protein-70 expression in bladder cancer. *Urology.* 2003;61:677-80.
171. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Expression of 70-kDa heat shock protein in oral lesions: marker of biological stress of pathogenicity. *Oral Oncol.* 1998;34:496-501.
172. Nakajima M, Kuwano H, Miyazaki T, Masuda N, Kato H. Significant correlation between expression of heat shock proteins 27, 70 and lymphocyte infiltration in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2002;178:99-106.
173. Noguchi T, Takeno S, Shibata T, Uchida Y, Yokoyama S, Müller W. Expression of heat shock protein 70 in grossly resected esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg.* 2002;74:222-6.
174. Ricaniadis N, Katakaki A, Agnantis N, Androulakis G, Karakousis CP. Long-term prognostic significance of HSP-70, c-myc and HLA-DR expression in patients with malignant melanoma. *Eur J Surg Oncol.* 2001;27:88–93.

175. Efferth T, Schulten HG, Thelen P, Bode ME, Beniers AJ, Granzen B, i sur. Differential expression of the heat shock protein 70 in the histological compartments of nephroblastomas. *Anticancer Res.* 2001;21:2915-20.
176. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M, i sur. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res.* 2000;60:7099-105.
177. Elpek GO, Karaveli S, Simşek T, Keles N, Aksoy NH. Expression of heat-shock proteins HSP27, HSP70 and HSP90 in malignant epithelial tumour of the ovaries. *APMIS.* 2003;111:523-30.
178. Ito Y, Ando A, Ando H, Ando J, Saijoh Y, Inoko H. Genomic structure of the spermatid-specific HSP70 homolog gene located in the class III region of the major histocompatibility complex of mouse and man. *J Biochem.* 1998;124:347-53.
179. Uozaki H, Ishida T, Kakiuchi C, Horiuchi H, Gotoh T, Iijima T, i sur. Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis. *Pathol Res Pract.* 2000;196:665–73.
180. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the international neuroblastoma pathology committee. *Cancer.* 1999;86:349-63.
181. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, i sur. The international neuroblastoma pathology classification (the Shimada system). *Cancer.* 1999;86:364-72.
182. Coran et al. *Neuroblastoma in Pediatric surgery.* Mosby; 7th edition (February 28, 2012).
183. Fu-Jen Huang, Yan-Der Hsuuw, Wen-Hsiung Chan. Characterization of Apoptosis Induced by Emodin and Related Regulatory Mechanisms in Human Neuroblastoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 20139-20156.

184. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, i sur.. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet.* 2013 Mar;45(3):279-84.
185. Tong QS, Zheng LD, Tang ST, Li SW, Jiang GS, Cai JB, i sur. Expression of Fas and FasL in human neuroblastoma and its clinical significance. *World J Pediatr* 2007;3:209-13.
186. Houston et al. The „Fas counterattack“ is not an active mode of tumor immune evasion in colorectal cancer with high-level microsatellite instability. *Human Pathology* (2008) 39, 243–250.
187. Nakanishi H, Monden T, Morimoto H, Kobayashi T, Shimano T, Mori T. Perforin expression in lymphocytes infiltrated to human colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1991;64:239–42.
188. Jegou G, Hazoumé A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* 2013 May 28;332(2):275-85. doi: 10.1016/j.canlet.2010.10.014.
189. Stephanou A, Latchman DS. Transcriptional modulation of heat-shock protein gene expression. *Biochem Res Int.* 2011;2011:238601.
190. Loones MT, Morange M. Hsp and chaperone distribution during endochondral bone development in mouse embryo. *Cell Stress Chaperones.* 1998 Dec;3(4):237-44.
191. Afzal E, Ebrahimi M, Najafi SM, Daryadel A, Baharvand H. Potential role of heat shock proteins in neural differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells (P19). *Cell Biol Int.* 2011 Jul;35(7):713-20.
192. Yoshima T, Yura T, Yanagi H. Heat shock factor 1 mediates hemin-induced hsp70 gene transcription in K562 erythroleukemia cells. *J Biol Chem.* 1998;273(39):25466-71.
193. Mahesvaren H, Englert C, Zheng G, Lee SB, Wong J, Harkin DP, i sur. Inhibition of cellular proliferation by the Wilms tumor suppressor WT1 requires association with the inducible chaperone HSP70. *Genes Dev.* 1998;12:1108-20.

194. Yang Y, Niu ZB, Hou Y, Wang CL. The expression of HSP70 and HSP90alpha in children with Wilms tumor. *J Pediatr Surg.* 2006 Jun;41(6):1062-6.
195. Edwards MJ, Marks R, Dykes PJ, Merrett VR, Morgan HE, O'Donovan MR. Heat shock proteins in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1991 Mar;96(3):392-6.
196. Wang D, Eiz-Vesper B, Zeitvogel J, Dressel R, Werfel T, Wittmann M. Human keratinocytes release high levels of inducible heat shock protein 70 that enhances peptide uptake. *Exp Dermatol.* 2011 Aug;20(8):637-41.
197. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. Apoptosis versus cell differentiation Role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. Mini-review. *Prion.* 2007;1:53-60.
198. Cai MB, Wang XP, Zhang JX, Han HQ, Liu CC, Bei JX, i sur. Expression of heat shock protein 70 in nasopharyngeal carcinomas: different expression patterns correlate with distinct clinical prognosis. *J Transl Med.* 2012;10:96.
199. Antonoff MB, Chugh R, Skube SJ, Dudeja V, Borja-Cacho D, Clawson KA, Vickers SM, Saluja AK. Role of Hsp-70 in triptolide-mediated cell death of neuroblastoma. *J Surg Res.* 2010 Sep;163(1):72-8.

8 POPIS KRATICA

- AIF: čimbenik indukcije apoptoze; engl. *apoptosis-inducing factor*
- APAF 1: čimbenik aktivacije apoptoze; engl. *apoptosis activating factor*
- CCG: Skupina za istraživanje tumora dječje dobi; engl. *Children's Cancer Group*
- COG: Dječja onkološka skupina; engl. *Children's Oncology Group*
- CT: kompjutorizirana tomografija; engl. *computerized tomography*
- CTL: citotoksični T limfociti; engl. *Cytotoxic T Lymphocytes*
- DISC: signalni kompleks koji inducira smrt; engl. *death-inducible signalling complex*
- DNA: deoksiribonukleinska kiselina; engl. *Deoxyribonucleic acid*
- FISH: fluorescentna hibridizacija *in situ*; engl. *fluorescent in situ hybridization*
- HE: hemalaun-eozin
- HSP: protein toplinskog šoka; engl. *heat shock protein*
- HVA: homovanilična kiselina; engl. *Homovanillic Acid*
- IAPs: inhibitori kaspaza; engl. *inhibitors of apoptosis proteins*
- ICAM: unutarstanična adhezijska molekula; engl. *intercellular adhesion molecule*
- IDRF: slikovnim pretragama određeni rizični čimbenici; engl. *image defined risk factors*
- IFN gama: interferon gama
- INPC: Međunarodna patološka klasifikacija neuroblastoma; engl. *The International Neuroblastoma Pathology Classification*
- INRGSS: Međunarodna klasifikacija stupnjeva neuroblastoma prema rizičnim skupinama; engl. *International Neuroblastoma Risk Group Staging System*
- INSS: Međunarodna klasifikacija stupnjeva neuroblastoma; engl. *International Neuroblastoma Staging System*
- LFA-1: limfocitni funkcijski antigen 1; engl. *lymphocyte function-associated antigen 1*
- MHC: glavni sustav tkivne snošljivosti; engl. *major histocompatibility complex*
- MKI: indeks mitoze i kariorekse; engl. *mitosis-karyorrhexis index*
- MPR: manoza-6- fosfat
- MR: magnetna rezonanca; engl. *magnetic resonance*
- MYCN onkogen: engl. *Myelocytomatose oncogene*
- NGF: čimbenik rasta živaca; engl. *nerve growth factor*
- p: statistička značajnost
- PAF: čimbenik aktivacije trombocita; engl. *platelet activating factor*
- pH: koncentracija vodikovih iona u nekoj tvari; lat. *pondus hydrogenii*
- POG: Pedijatrijska onkološka skupina; engl. *Pediatric Oncology Group*

SG: serilglicin

TNF: čimbenik nekroze tumora; engl. *tumor necrosis factor*

TNM: tumor, limfni čvor, metastaza; engl. *tumor, lymph nodes, metastasis*

TRAIL: ligand poveza s TNF-om koji inducira apoptozu ovisnu o TNF-u; engl. *TNF related apoptosis-inducing ligand*

VIP: vazoaktivni intestinalni peptid; engl. *Vasoactive intestinal peptide*

VMA: vanilmandelična kiselina; engl. *Vanillylmandelic Acid*

9 ŽIVOTOPIS

Marko Bogović rođen je u Zagrebu 1976. godine gdje je 1995. završio XVIII. Gimnaziju, a 2001. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Nakon položenog pripravničkog staža 2002. g. radio je kao liječnik u Zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu, a od veljače 2004. zaposlen je u Zavodu za dječju kirurgiju i urologiju Klinike za kirurgiju KBC-a Zagreb. Specijalistički ispit iz dječje kirurgije položio je 2008. g.

Prošao je tromjesečnu edukaciju u Klinici za dječju kirurgiju u Cincinnati Children's, USA, sudjelovao u radionici The European Transplant Fellow Workshop, ESOT, Edinburgh, te prošao Osnovni tečaj laparoskopske kirurgije za dječje kirurge, Aesculap akademija.

Od 2004. je službeni liječnik ŽKK "Medveščak", te jednom godišnje prisustvuje edukaciji iz sportske medicine u organizaciji HLK i Hrvatske udruge zdravstvenih djelatnika u košarci.

Doktorski poslijediplomski studij, Biologija, Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu upisao je 2004. godine.

Od 2008. je suradnik na izbornom predmetu „Kirurško liječenje genetskih malformacija” i sudjeluje u nastavi na Katedri za kirurgiju kao voditelj vježbi iz kirurške propedeutike, a od 2011. je predavač na poslijediplomskom tečaju stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije "Središnji venski kateteri za dugotrajnu upotrebu- standardi kvalitete". Od 2012. asistent je na Katedri za kirurgiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Autor i koautor je više radova u indeksiranim časopisima.

Oženjen je, otac jednog djeteta.

OBJAVLJENI ZNANSTVENI I STRUČNI RADOVI

a) Radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u CC

Antabak A, Luetić T, Sjekavica I, Karlo R, Čavar S, Bogović M, Sršen-Medančić S. Treatment outcomes of both-bone diaphyseal paediatric forearm fractures. *Injury*. 2013;44 Suppl 3:11-5.

Batinica S, Gunek G, Raos M, Jelašić D, Bogović M. Sclerosing haemangioma of the lung in a 4-year-old child. *Europ J Pediatr Surg*. 2002;12(3):192-4.

Čavar S, Bogović M, Luetić T, Antabak A i Batinica S. Intestinal duplications – Experience in six cases. *Eur Surg Res*. 2006;38:329-32.

b) Radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u drugim međunarodnim indeksnim publikacijama (Index Medicus, Excerpta Medica, SCI, SSCI i sl.) i zbornicima

Bogović M, Fiolić Z, Čavar S, Luetić T, Antabak A, Sršen-Medančić S, i sur. Liver tumors in childhood. *Libri Oncol*. 2008;36, No 1-3:37-9.

Bogović M. Njega središnjih venskih katetera. Poslijediplomski tečaj stalnog med. usavršavanja, Priručnik, 2011.

Batinica S, Bogović M. Urođene anomalije koje zahtijevaju hitno kirurško zbrinjavanje. *Pediatr Croat* 2004; 48: 107-110.

Batinica S, Bogović M. Hidronefroza. *Pediatr Croat* 2006; 50 (Supl 1): 295-298.

Batinica S, Bogović M. Akutni bolovi u trbuhu. Poslijediplom. tečaj stalnog med. usavršavanja, Priručnik: Nespecifični simptomi u ped. dijagnostici, Med. naklada, IV/2005.

Antabak A, Luetić T, Čavar S, Bogović M, Kukin D, Batinica S. Kirurška implantacija centralnog venskog katetera. 14. postdipl. tečaj stalnog med. usavršavanja iz kliničke mikrobiologije, Zagreb XII/2005.

Batinica S, Bogović M, Mihailović-Marasanov Sergej. Kirurško liječenje malformacija mokraćnog sustava. Poslijedipl. tečaj stalnog med. usavršavanja, Priručnik: Dojenče – trajni med. izazov. Med. naklada, XII/2005.

Batinica S, Bogović M. Kirurško liječenje komplikacija respiracijskih infekcija. Poslijedipl. tečaj stalnog med. usavršavanja, Priručnik: Sekundarna prevencija u pedijatriji, Slavonski Brod, ožujak 2005.

Batinica S, Bogović M, Sršen-Medančić S. Dugotrajni bolovi u trbuhu – moguća kirurška bolest. Poslijedipl. tečaj stalnog med. usavršavanja, Priručnik: Dijete s dugotrajnim bolovima u trbuhu – uvijek prisutan problem, Med. naklada, XII/2006.

Bogović M, Čavar S, Antabak A, Luetić T, Kukin D, Batinica S. Surgical Treatment of

progressive familiar intrahepatal cholestasis (Byler's disease). 5th Croat Congress of Pediatr Surg with International Participation, Cavtat, April 2007. Abstract book

Bogović M, Čavar S, Antabak A, Luetić T, Kukin D, Batinica S. Surgical Treatment of Congenital hyperinsulinism. 5th Croat Congress of Pediatr Surg with International Participation, Cavtat, April 2007. Abstract book

Bogović M, Čavar S, Antabak A, Luetić T, Kukin D, Batinica S. Intestinal duplication – Experiences of the Department of Pediatric Sur, Clinical Hospital Center Rebro, Zagreb. 5th Croat Congress of Pediatr Surg with International Participation, Cavtat, April 2007. Abstract book

Bogović M, Čavar S, Antabak A, Luetić T, Kukin D, Sršen S, Dujmović A, Batinica S. Tumors of the mediastinum in childhood-experiences of the Department of Pediatric Surgery, Clinical Hospital Center Rebro, Zagreb. 5th Croatian Congres of Pediatric Surgery with International Participation, Cavtat, April 2007. Abstract book

Antabak A, Đapić T, Luetić T, Čavar S, Bogović M, Sršen S, Batinica S, Kukin D. Bone fractures in childhood-poor outcomes of treatment. 5th Croatian Congress of Pediatric Surgery with International Participation, Cavtat, April 2007. Abstract book

Luetić T, Antabak A, Čavar S, Kukin D, Batinica S et al. Outcome of children with esophageal atresia – 15 year's experience. 5th Croatian Congres of Pediatric Surgery with International Participation, Cavtat, April 2007. Abstract book

Sršen S, Bogović M, Čavar S, Antabak A, Luetić T, Kukin D, Ille J, Dumić M, Batinica S. Surgical treatment of thyroid gland disease in children. 5th Croatian Congres of Pediatric Surgery with International Participation, Cavtat, April 2007. Abstract book

Batinica S, Fiolić Z, Vuković J, Luetić T, Antabak A, Čavar S, Kukin D, Bogović M, Sršen S. Value of portosystemic anastomosis in children. 5th Croatian Congress of Pediatric Surgery with International Participation, Cavtat, April 2007. Abstract book

Vuković J, Grizelj R, Senečić-Čala I, Dujšin M, sur(22), Batinica S. Pediatric Liver Transplantation in Croatia. 5th Croatian Congress of Pediatric Surgery with International Participation, Cavtata, April 2007. Abstract book

Čavar S, Bogović M, Antabak A, Luetić T, Fiolić Z, Kukin D, Sršen S, Dujmović A, Vuković J, Batinica S. Liver tumors – case reports. 5th Croat Congress of Pediatr Surg with International Participation, Cavtat, April 2007. Abstract book

Batinica S, Luetić T, Antabak A, Čavar S, Bogović M, Sršen S, Ille J, Dumić M. Perineum reconstruction in children with an ambivalent sex organ. 5th Croat Congress of Pediatr Surg with International Participation, Cavtat, April 2007. Abstract book

Sabolić Pipinić I, Čavar S, Batinica S, Bogović M, Sršen Medaničić S, Pasini M, Antabak A, Luetić T. Haemorrhaging duodenal stress ulcer in a 9 – year old boy - case report. 6th Croatian Congres of Pediatric Surgery with International Participation, Split, 2011.

Pasini M, Luetić T, Batinica S, Antabak A, Čavar S, Bogović M, Filipović Grčić I, Benjak V, Sršen Medančić S, Sabolić Pipinić I. Surgical treatment of necrotizing enterocolitis – our experience. 6th Croatian Congress of Pediatric Surgery with International Participation, Split, 2011.

Čavar S, Sršen Medančić S, Bogović M, Sabolić Pipinić I, Pasini M, Antabak A, Luetić T. Laparoscopic treatment in children – Our results. 6th Croatian Congress of Pediatric Surgery with International Participation, Split, 2011.

Bogović M, Luetić T, Antabak A, Čavar S, Sršen Medančić S, Sabolić Pipinić I, Pasini M. Handlebar injuries in childhood. 6th Croatian Congress of Pediatric Surgery with International Participation, Split, 2011.

Luetić T, Penezić L, Sršen Medančić S, Stilinović M, Filipović Grčić I, Tandara R, Antabak A, Čavar S, Bogović M, Sabolić I. Paediatric obesity in the surgical ward setting. 6th Croatian Congress of Pediatric Surgery with International Participation, Split, 2011.

Sabolić Pipinić I, Bogović M, Batinica S, Luetić T, Škegro M, Fiolić Z, Bulić K, Vuković J, Filipović Grčić I, Novak M. Pediatric liver transplantation in Croatia: A decade of experience. 6th Croatian Congress of Pediatric Surgery with International Participation, Split, 2011.

Sršen Medančić S, Čavar S, Bogović M, Sabolić Pipinić I, Pasini M, Antabak A, Luetić T. Peripancreatic lymph node gastrinoma in a 12-year old boy. 6th Croatian Congress of Pediatric Surgery with International Participation, Split, 2011.

Sršen Medančić S, Halužan D, Bulić K, Sabolić Pipinić I, Bogović M, Čavar S, Pasini M, Antabak A, Luetić T. Radial artery pseudoaneurysm in a 2-months old infant. 6th Croatian Congress of Pediatric Surgery with International Participation, Split, 2011.