

Нейробластома: морфологическая структура, молекулярно-генетические особенности и прогностические факторы

А.М. Строганова, А.И. Карселадзе

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анна Михайловна Строганова stroganova_am@mail.ru

Нейробластома — наиболее распространенная экстракраниальная опухоль у детей, происходит из развивающихся нейрональных клеток симпатической нервной системы (стволовых клеток нервного гребня) и имеет разнообразные биологические и клинические характеристики. Средний возраст дебюта заболевания — 18 мес. Нейробластома отличается рядом уникальных черт: способность к спонтанной регрессии у детей младше 12 мес даже с отдаленными метастазами, к дифференцировке (созревание в ганглионеврому) у детей после первого года жизни и к стремительному агрессивному развитию и бурному метастазированию. Существуют 2 клинические классификации нейробластомы: Международная система стадирования нейробластом (International Neuroblastoma Staging System), которая основывается на результатах оперативного вмешательства, и классификация предоперационного стадирования (International Neuroblastoma Risk Group Staging System). Одной из принципиально важных проблем для клинической картины нейробластомы является сложность прогнозирования. Наряду с параметрами клинического характера (возраст пациента, распространение и локализация опухоли) многообещающими оказались некоторые гистологические, молекулярно-биохимические (плоидность) и генетические (хромосомные aberrации, статус гена MYCN, делеция локусов 1p36 и 11q, увеличение длинного плеча хромосомы 17 и др.) характеристики опухолевых клеток. Амплификация гена MYCN наблюдается в 20–30 % первичных нейробластом и является одним из главных показателей агрессивности заболевания, ранней устойчивости к химиотерапии и неблагоприятного прогноза. Существует 2 типа амплификации гена MYCN: экстрахромосомная (наличие двойных ацентричных хромосом) и внутрехромосомная (гомогенно окрашенные регионы). При изучении двойных ацентричных хромосом был отмечен интересный факт: они могут быть элиминированы (удалены) из ядра путем формирования микроядер. Амплификация онкогена MYCN часто сопровождается делецией локуса 1p36 и увеличением плеча 17q, реже — делецией 11q23, что является факторами неблагоприятного прогноза заболевания. В статье подробно рассматриваются специфические черты биологического поведения нейробластомы, не свойственные другим опухолям; гистологическое строение; факторы, определяющие прогноз заболевания, в том числе статус гена MYCN; механизмы формирования амплификации и элиминации амплифицированных последовательностей из ядра.

Ключевые слова: нейробластома, история изучения, гистологическая структура, классификация, амплификация гена MYCN, гетерогенность амплификации, прогностические факторы, элиминация амплифицированных последовательностей, хромосомные aberrации

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-1-32-43

Neuroblastoma: morphological pattern, molecular genetic features, and prognostic factors

A.M. Stroganova, A.I. Karseladze

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Neuroblastoma, the most common extracranial tumor of childhood, arises from the developing neurons of the sympathetic nervous system (neural crest stem cells) and has various biological and clinical characteristics. The mean age at disease onset is 18 months. Neuroblastoma has a number of unique characteristics: a capacity for spontaneous regression in babies younger than 12 months even in the presence of distant metastases, for differentiation (maturation into ganglioneuroma) in infants after the first year of life, and for swift aggressive development and rapid metastasis. There are 2 clinical classifications of neuroblastoma: the International neuroblastoma staging system that is based on surgical results and the International Neuroblastoma Risk Group Staging System. One of the fundamentally important problems for the clinical picture of neuroblastoma is difficulties making its prognosis. Along with clinical parameters (a patient's age, tumor extent and site), some histological, molecular biochemical (ploidy) and genetic (chromosomal aberrations, MYCN gene status, deletion of the locus 1p36 and 11q, the longer arm of chromosome 17, etc.) characteristics of tumor cells are of considerable promise. MYCN gene amplification is observed in 20–30 % of primary neuroblastomas and it is one of the major indicators of disease aggressiveness, early chemotherapy resistance, and a poor prognosis. There are 2 types of MYCN gene amplification: extrachromosomal (double acentric chromosomes) and intrachromosomal (homogeneously painted regions). Examination of double acentric chromosomes revealed an interesting fact that it may be eliminated (removed) from the nucleus through the formation of micronuclei. MYCN oncogene amplification is accompanied frequently by 1p36 locus deletion and longer 17q arm and less frequently by 11q23 deletion; these are poor prognostic factors for the disease. The paper considers in detail the specific, unique characteristics of the biological behavior of neuroblastoma, which are untypical of other tumors; his-

tological structure; determinants of the prognosis of the disease, including MYCN gene status; and mechanisms for formation of the amplification and elimination of amplified sequences from the nucleus.

Key words: neuroblastoma, history of study, histological pattern, classification, MYCN gene amplification, amplification heterogeneity, prognostic factors, amplification of sequences, chromosomal aberrations

История изучения нейробластом

Нейробластома (более точный, но менее используемый термин «периферическая нейробластная опухоль») — наиболее распространенная экстракраниальная солидная опухоль детского возраста, происходит из развивающихся нейрональных клеток симпатической нервной системы (стволовых клеток нервного гребня).

Опухоль была впервые описана в 1864 г. немецким ученым Rudolf Ludwig Karl Virchow, который назвал ее «детской глиомой». В 1891 г. немецкий патолог Felix Marchand отметил, что опухоль развивается из симпатической нервной системы и надпочечников. Стадию IVS нейробластомы, которая характеризуется метастазированием в печень, но не в кости, описал William Ferrer в 1901 г. Название «нейробластома» было предложено James Homer Wright. Он в 1910 г. показал, что ряд опухолей забрюшинного пространства и заднего средостения имеет четкое морфологическое сходство с незрелой примитивной нервной тканью. J. Wright также документировал формирование в образцах костного мозга округлых структур из клеток, которые получили название псевдорозеток Homer-Wright.

В 1914 г. Karl Herxheimer применил серебряные красители, позволяющие визуализировать нейрональные фибриллы под микроскопом.

В 1927 г. H. Cushing и S. Wolbach заметили, что не все нейробластомы злокачественные, хотя многие из них широко метастазируют в печень, кожу, кости, костный мозг; другие исчезают вне зависимости от лечения. Авторы продемонстрировали, что в редких случаях опухоли становятся доброкачественными ганглионевромами, которые могут исчезать сами по себе [1]. В 1966 г. в своей монографии T. Everson и W. Cole добавили к этому, что трансформация злокачественной формы опухоли в доброкачественную было замечено у детей старше 6 мес [2].

Общая характеристика нейробластом

Наиболее часто нейробластомы диагностируют у детей, их доля составляет 7–10 % всех опухолей детского возраста, включая лейкозы. Средний возраст дебюта заболевания — 18 месяцев, при этом нейробластоме у 50 % пациентов диагностируют в возрасте 2 лет и у 90 % — до 6 лет.

В целях доклинического выявления нейробластомы в ряде стран (в Японии и Канаде более 35 лет назад и позднее в европейских странах) был введен массовый скрининг. Полученные результаты вызвали разногласия, так как скрининг в возрасте от нескольких

недель до 6 месяцев привел к существенному увеличению количества диагностируемых нейробластом с благоприятным прогнозом, но не привел к уменьшению опухолей с агрессивной IV стадией и снижению общей смертности. Это указывает на то, что генетически и биологически «благоприятные» опухоли особенно в возрасте до 6 месяцев клинически не обнаруживаются, но способны к спонтанной регрессии позднее [3–6]. Было рекомендовано прекращение скрининга у детей младше 7 месяцев. Скрининг в возрасте 9–12 месяцев, проводимый в Японии и Австрии, возможно, выявляет генетически неблагоприятные и гетерогенные опухоли.

Большинство нейробластом возникают спорадически. Семейные (наследственные) случаи описывают редко. Однако в работе американских и итальянских исследователей показано, что причиной возникновения большинства случаев наследственных нейробластом служат активирующие мутации в тирозинкиназном домене онкогена *ALK* (anaplastic lymphoma kinase). Соматические мутации, приводящие к активации этого онкогена, наблюдаются в 5–15 % нейробластом. Дети со спорадической или наследственной нейробластомой в сочетании с синдромом центральной гиповентиляции («проклятие Ундины») и/или болезнью Гиршпрунга обычно имеют мутации в области гена *PHOX2B* — гомеодомена фактора транскрипции, экспрессирующегося в клетках, формирующих ганглии. Хотя большинство семейных случаев нейробластом ассоциированы с нарушением в генах *ALK* и *PHOX2B*, скорее всего, будут найдены дополнительные гены, отвечающие за развитие нейробластомы. Возможно, вероятность возникновения нейробластомы увеличена у пациентов с нейрофиброматозом I типа, ассоциированного с нарушениями в генах *PHOX2B* и *NF1/2*. Возникновение опухоли под воздействием условий окружающей среды неизвестно [5, 7–9].

Анатомическая локализация нейробластом достаточно разнообразна: 50 % в надпочечниках, в пара- и превертебральных симпатических ганглиях и паранганглиях (5 % в цервикальных, 15 % в торакальных, 25 % в ретроперитонеальных и 5 % в тазовых). Нейробластома с локализацией первичного очага в надпочечнике статистически имеет более низкую безрецидивную выживаемость по сравнению с опухолями других локализаций [10].

Нейробластома принадлежит к группе эмбриональных опухолей, таких как гепатобластома, нефробластома, эмбриональная рабдомиосаркома. Все они характеризуются манифестацией в раннем возрасте,

имеют сходные цитоморфологические характеристики, свойственные эмбриональным опухолям. Эмбриональное происхождение нейробластомы установлено методом иммуногистохимии (ИГХ) с помощью таких белковых маркеров, как Phox2b и C-kit (маркеры стволовых клеток нервного гребня), Sox10 и AP2a (эмбриональные глиальные маркеры, которые экспрессируются в незрелых глиальных клетках нейробластных опухолей) [11].

Нейробластому отличает ряд специфических, уникальных черт ее биологического поведения, не свойственных другим злокачественным опухолям.

- Спонтанная регрессия опухоли (без цитотоксического лечения) у некоторых детей младше 12 месяцев [2, 5, 12, 13].
- Способность к дифференцировке (созревание в ганглионеврому) у детей после первого года жизни. Это удивительное свойство опухолевых клеток нейробластомы впервые описано Харви Кушингом в 1926 г. у пациента (1 год 8 месяцев) с низкодифференцированной нейробластомой, у которого спустя 9 лет остаточная опухоль дифференцировалась в ганглионеврому [1]. Также в литературе есть сообщение о том, что вероятность созревания опухоли зависела от пола и была выше у девочек, чем у мальчиков [14]. Процесс созревания также зарегистрирован при исследовании культуры клеток, взятых из агрессивно растущей опухоли. В процессе культивирования клетки приобретали черты дифференцирующейся нервной ткани. Различные агенты способны индуцировать этот процесс *in vitro* (ретиноевая кислота (фактор роста нервной ткани), некоторые цитостатики, папаверин) [12].
- Способность к стремительному агрессивному развитию и бурному метастазированию. У 60 % пациентов опухоли метастазируют в костный мозг, кости, лимфатические узлы, печень и кожу. Уникальный пример распространенных метастазов с благоприятным прогнозом — это стадия нейробластомы IVS [15–17, 18].

Клинические стадии нейробластомы

По Международной системе стадирования нейробластом (International neuroblastoma staging system, INSS, 1986) различают 4 клинические стадии. Данная система основывается на результатах оперативного вмешательства.

Стадия I. Локализованная опухоль, находящаяся в области первоначального развития; новообразование полностью удалено с микроскопическими признаками его остатков или без них; макроскопически — подтвержденное отсутствие поражения лимфатических узлов по обе стороны позвоночника.

Стадия IIa. Односторонняя опухоль с удалением большей ее части; микроскопически — нет поражения лимфатических узлов с обеих сторон.

Стадия IIb. Односторонняя опухоль, удаленная полностью или большая ее часть; микроскопически — имеется поражение односторонних лимфатических узлов.

Стадия III. Опухоль распространяется на противоположную сторону с метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов или без него; односторонняя опухоль с метастазами в противоположных лимфатических узлах; срединная опухоль с метастазами в лимфатических узлах с обеих сторон.

Стадия IV. Диссеминированная опухоль с метастазами в отдаленные лимфатические узлы, кости скелета, печень и поражением костного мозга.

Стадия IVS. Локализованная первичная опухоль I, IIa и IIb стадий, имеющая метастазы в печень, кожу и/или костный мозг.

В 2009 г. была введена новая клиническая классификация нейробластом (классификация предоперационного стадирования) — International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) [19].

Стадия L1. Локализованные опухоли, не затрагивающие жизненно важных структур, ограниченные в пределах одного отдела — шея, грудь, живот или таз.

Стадия L2. Локорегиональные опухоли с вовлечением 1 или нескольких радиологических факторов риска (по данным компьютерной томографии или магнитно-резонансной томографии): шея, шейно-грудной переход, грудная клетка, торакоабдоминальная область, брюшная полость/таз, распространение в спинномозговой канал, инфильтрация окружающих органов/структур.

Стадия M. Отдаленное метастазирование (исключая стадию MS).

Стадия MS. Метастатическая болезнь у пациентов младше 18 месяцев с метастазами в кожу, печень и/или костный мозг.

В классификации INRGSS, в отличие от INSS, локорегиональное поражение протекает 2 стадии вместо 3, так как возрастает важность биологических прогностических факторов, и отмечена хорошая общая выживаемость у пациентов с неметастатической нейробластомой. Система предоперационного стадирования INRGSS может быть использована в качестве самостоятельной и независимой классификации для определения группы риска и дальнейшей тактики лечения, однако она не предназначена для замены классификации INSS. Предполагается, что обе системы будут использоваться параллельно [19].

Гистологическое строение нейробластом

Микроструктура нейробластомы сложна и отражает процесс созревания опухоли. Существующие гистологические классификации морфологического строения нейробластом (INPC-Shimada, Joshi) основаны на степени дифференцировки опухоли: от недифференцированной мелкокруглоклеточной нейробластомы до высокодифференцированной ганглионевромы.

Клеточный состав нейробластомы:

1) нейробласты:

- мелкие клетки с круглыми ядрами, в которых хроматин распределен в виде мелких точек («соль и перец»), тонкий ободок эозинфильной цитоплазмы; хорошо видны границы между клетками,
- крупные клетки с ядрами в 1,5–2,0 раза больше типичных ядер нейробластов, с 1–4 видимыми ядрышками. Обычно встречаются в недифференцированных и низкодифференцированных нейробластомах (8–10 %). Ассоциированы с *MYCN*-амплификацией и плохим прогнозом;

2) ганглиозные клетки, имеющие крупные круглые ядра с видимыми ядрышками, широкую эозинфильную цитоплазму с тельцами Ниссля (базофильные гранулы, располагающиеся на эндоплазматической сети).

Строма, окружающая клетки нейробластомы, также отражает уровень дифференцировки:

1) шванновская строма – для идентификации методом ИГХ применяются антитела к S100 (позитивное окрашивание);

2) нейропилль – фибриллярные экстрацеллюлярные волокна;

3) плотный лимфоидный инфильтрат (присутствует нечасто).

В Международной гистологической классификации нейробластомы (INPC-Shimada system) выделяют 4 категории по степени клеточной дифференцировки [20]:

1) нейробластома (бедная шванновской стромой):

- недифференцированная, полностью состоящая из нейробластов. Отсутствуют зрелые ганглиозные клетки (часто требуется ИГХ-исследование для верификации диагноза). Характеризуется бедной шванновской стромой (менее 50 % окружающей стромы или может отсутствовать) (рис. 1а);
- низкодифференцированная, преимущественно состоящая из нейробластов. Имеется менее 5 % созревающих или зрелых ганглиозных клеток; по крайней мере 1 фокус нейропиля. Характеризуется бедной шванновской стромой (менее 50 % окружающей стромы или может отсутствовать) (рис. 1б);
- дифференцированная, преимущественно состоящая из нейробластов. Имеется более 5 % созревающих или зрелых ганглиозных клеток; по крайней мере 1 фокус нейропиля. Характеризуется бедной шванновской стромой (менее 50 % окружающей стромы или может отсутствовать);

2) нодулярная ганглионейробластома, преимущественно состоящая из созревающих или зрелых ганглиозных клеток. Имеется по крайней мере 1 ограниченный участок (узел) остаточных нейробластов. Нодулярная ганглионейробластома и все последующие типы (ганглионейробластома и ганглионеврома) богаты шванновской стромой (50 % и более окружающей стромы);

3) ганглионейробластома, преимущественно состоящая из созревающих или зрелых ганглиозных кле-

ток. Имеется ≥ 1 участка остаточных нейробластов, смешанных с ганглиозными клетками (изолированные участки нейробластов отсутствуют) (рис. 1в);

4) ганглионеврома:

- созревающая, полностью состоящая из созревающих или зрелых ганглиозных клеток. Отсутствуют остаточные нейробласты,
- зрелая, полностью состоящая из зрелых ганглиозных клеток. Отсутствуют остаточные нейробласты (рис. 1г).

В типичных случаях опухоль состоит из мелких однородных круглых клеток с гиперхромным ядром, окруженным тонким ободком цитоплазмы. Для нейробластомы характерно формирование псевдорозеток Homer-Wright – своеобразных морфологических структур, образованных по периферии ядрами нейробластов с расположенными по центру эозинфильными фибриллами. Опухоль часто содержит большие участки некроза. Интерстициальные кровоизлияния относительно часто встречаются в менее дифференцированных опухолях, диффузная инфильтрация лимфоцитами – в более дифференцированных. Наличие кальцификатов – характерный признак нейробластомы, их количество может увеличиваться в процессе ответа опухоли на терапию. Сообщается также, что присутствие видимых ядрышек в клетках нейробластомы является признаком амплификации гена *MYCN*. Предполагается, что это результат наличия большого количества транскриптов этого гена [21].

Для точной верификации диагноза практически всегда необходимо проведение ИГХ-исследования. Клеточные компоненты нейробластомы могут быть идентифицированы с помощью ряда белковых маркеров: S100, S100A6 (Calcyclin) (семейство кальцийсвязывающих белков для идентификации глиального компонента), нейрофиламенты (NF), хромогранин, синаптофизин, нейронспецифическая энолаза (NSE) [11].

Факторы, определяющие прогноз заболевания

Одной из принципиально важных проблем нейробластомы является сложность прогнозирования. Наряду с параметрами клинического характера (возраст пациента [22], распространение и локализация опухоли [7, 23]) многообещающими оказались гистологические (гистопатологическая классификация по системе Н. Shimada [20], количество клеток с митозом [24] и апоптозом), молекулярно-биохимические (ploidy [25, 26]) и генетические (хромосомные aberrации, статус гена *MYCN*, делеция локусов 1p36 и 11q, увеличение длинного плеча хромосомы 17 и др.) характеристики опухолевых клеток [17, 27–29].

К факторам благоприятного прогноза относят: возраст пациента младше 1 года, стадии I, II или IVS, отсутствие амплификации гена *MYCN* и сегментных хромосомных aberrаций, полисомия (увеличение количества целой хромосомы).

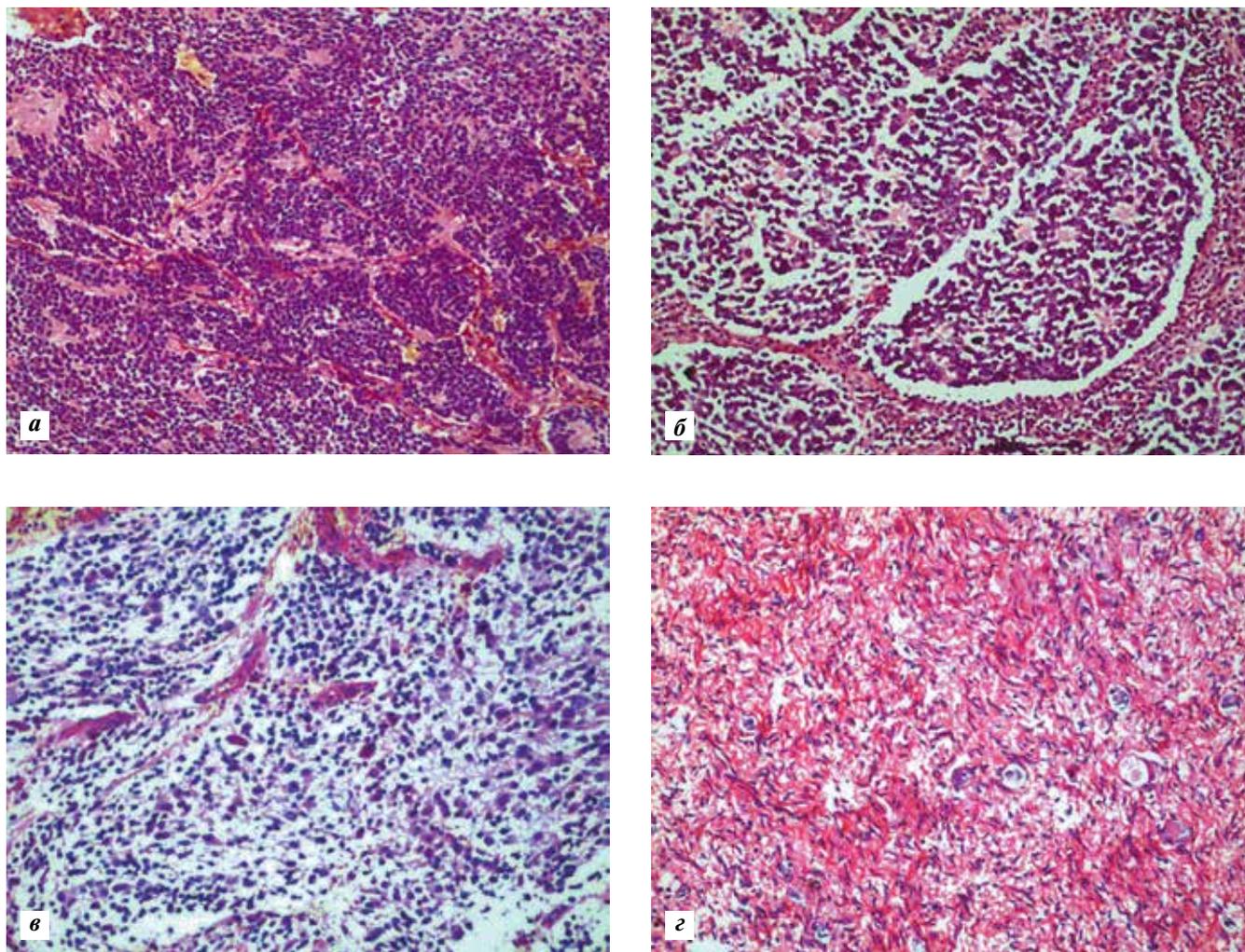


Рис. 1. Гистологическое строение нейробластомы (окраска гематоксилин-эозином) ($\times 100$): а – недифференцированная; б – низкодифференцированная; в – ганглионейробластома; г – зрелая ганглионеврома

Промежуточные прогностические факторы: возраст пациента старше 1 года, локализованная опухоль с поражением лимфатических узлов, у детей младше 1 года метастазы в кости и костный мозг, отсутствие амплификации гена *MYCN* и сегментных хромосомных aberrаций.

Факторы неблагоприятного прогноза включают: возраст пациента старше 1 года, метастазы в кости и костный мозг, сегментные хромосомные aberrации, такие как делеции субтеломерной области ($del1p36$) [27], длинного плеча хромосомы 11 ($del11q$), увеличение длинного плеча хромосомы 17 ($+17q$), амплификация гена *MYCN*, морфологически недифференцированная опухоль, высокий митотический индекс (см. таблицу).

Таким образом, определенный геномный ДНК-профиль опухоли предсказывает клиническую картину течения заболевания. Хромосомные aberrации могут изменять биологическое поведение опухолей в неблагоприятную сторону. Однако наибольшее значение в установлении прогноза, выборе оптимального объема лечения, устойчивости к химиотерапии приобрело изучение состояния гена *MYCN*.

Характеристика и функции гена *MYCN*

MYCN – клеточный протоонкоген семейства транскрипционных факторов. Он кодирует один из ядерных белков, который участвует в создании транскрипционных регуляторных комплексов со специфическими ДНК-связывающими свойствами. Располагается ген *MYCN* на коротком плече хромосомы 2 в локусе 2p24. Известно, что белки семейства MYC играют центральную роль в контроле клеточного цикла, клеточной пролиферации. *MYCN* выполняет важную регуляторную функцию в процессе миграции стволовых клеток, модуляции апоптоза, плюропотентности и дифференцировки [9, 16, 30]. Онкоген *MYCN* также регулирует гены множественной лекарственной устойчивости – *MRP1* и *MDR1* [31]. Важно отметить, что *MYCN* контролирует белки, участвующие в биогенезе рибосом, тем самым влияя на синтез белка. В нормальных клетках уровень белка *MYCN* строго регулируется фосфатидилинозитол-3-киназой (PI3K), которая стабилизирует белок и регулирует его включение в клеточный цикл [9].

Прогностические факторы нейробластомы

Характеристика	Прогностический фактор	
	благоприятный	неблагоприятный
Возраст	Младше 1 года	Старше 1 года
Клиническая стадия	I, II, IVS	III, IV
Гистологическое строение	Богатые шванновской стромой, дифференцированные	Бедные шванновской стромой, богатые стромой и нодулярные
Хромосомные aberrации	Отсутствует амплификация гена <i>MYCN</i> , делеция локуса 1p36 и другие сегментные хромосомные aberrации	Наличие амплификации гена <i>MYCN</i> , делеции локуса 1p36 и/или другие сегментные хромосомные aberrации

Амплификация гена *MYCN*. Особенности при нейробластоме

Амплификация ДНК – механизм, с помощью которого клетки злокачественной опухоли приобретают многочисленные копии части своего генома, что приводит к гиперэкспрессии клеточных онкогенов, посредством которой опухолевая клетка получает преимущество в росте и устойчивость к химиотерапии. Ген *MYCN* является первым онкогеном в солидных опухолях, для которого была обнаружена амплификация (более чем 4-кратное увеличение количества этого гена по сравнению с референсным участком, локализуемым на этой же хромосоме, чаще всего это центромерная область). Уровень амплификации этого гена при нейробластоме находится в диапазоне от 4- до 500-кратного увеличения, чаще от 50- до 100-кратного. Туморогенный потенциал *MYCN* связан именно с процессом амплификации, так как функциональные мутации в его пределах не обнаружены [16].

Амплификация *MYCN* наблюдается в 20–30 % первичных нейробластом [16, 27, 32] и является одним из главных показателей агрессивности заболевания, ранней устойчивости к химиотерапии и неблагоприятного прогноза. Амплификация этого гена – мощнейшая «движущая сила» для увеличения митотической активности и предотвращения созревания опухоли. Нейробластомы с амплификацией *MYCN* являются, как правило, недифференцированными или низкодифференцированными опухолями с высоким митотическим индексом и классифицируются как неблагоприятная гистологическая группа [28]. Корреляция между амплификацией гена *MYCN* и неблагоприятным исходом подтверждена в ходе многочисленных исследований, однако аналогичная ассоциация между экспрессией *MYCN* и исходом остается спорной.

В ряде доклинических исследований показано, что низкие уровни MYC-белков увеличивают пролиферацию, а высокие нужны для индукции апоптоза. Если это верно для нейробластомы, то предполагается, что амплификация гена *MYCN* служит в первую очередь для нарушения регуляции функции белка MYCN во время клеточного цикла, а не просто для увеличения его экспрессии. Эта гипотеза согласуется с утвержде-

нием, что именно амплификация, а не гиперэкспрессия, является показателем агрессивности заболевания [9]. При анализе нейробластом без амплификации гена *MYCN* было показано, что все пациенты с опухолями, в которых зафиксирован высокий уровень экспрессии MYCN, имели благоприятный исход болезни, без рецидивов и метастазов [6]. Также показано, что клетки с гиперэкспрессией MYCN сохраняют способность к дифференцировке [33]. Механизмы, посредством которых амплификация гена *MYCN* приводит к развитию агрессивной и резистентной опухоли, остаются неясными.

Размер ампликонов гена *MYCN* при нейробластоме может варьировать от 350 kb до 8 Mb, при этом наблюдается высокая вариабельность количества коамплифицированных генов. Часто коамплифицируется ген *DDXI* (локус 2p24), принадлежащий к семейству генов, кодирующих белки DEAD-боксы (Asp–Glu–Ala–Asp), вовлеченные в ряд клеточных процессов, таких как посттранскрипционная и трансляционная регуляция генов. Кроме того, опубликованы данные, касающиеся экспрессии гена *ID2* (ингибитор ДНК-связывания/дифференцировки), расположенного в локусе 2p25.1.

Ген *NAG* (*NBAS*, neuroblastoma amplified gene), также локализованный в локусе 2p24.3, коамплифицируется в 20–56 % нейробластом. Следует отметить, что случаи амплификации данного гена зафиксированы только в опухолях с амплификацией *MYCN*, и никогда в отсутствие последней. Продукт этого гена входит в состав комплекса, обеспечивающего белковый транспорт в системе эндоплазматического ретикула аппарата Гольджи [34]. Наконец, коамплификация гена *ALK* происходит редко и наблюдается только в случаях с плохим исходом [35].

Группа японских ученых [36] исследовала активность фермента теломеразы в 100 образцах нейробластомы. Теломеры – специальные структуры на концах хромосом, которые вовлечены в процесс репликации и играют важную роль в обеспечении генетической стабильности. Регуляция длины теломер контролируется ферментом теломеразой. В опухолевых и стволовых клетках наблюдают высокую экспрессию теломер-

разы, в результате чего длина теломерных участков хромосом этих клеток увеличивается или сохраняется на постоянном уровне, позволяя им делиться неограниченно долго. Все нейробластомы с амплификацией гена *MYCN* демонстрируют высокую теломеразную активность (это ассоциировано с плохим прогнозом и высокой генетической нестабильностью). Однако большинство нейробластом стадии IVS имели низкую теломеразную активность или короткие теломеры [5, 36, 37]. Таким образом, длина теломер является весьма важным прогностическим параметром клинической значимости у больных с диагнозом нейробластомы [38].

Примечательно, что и при отсутствии амплификации гена *MYCN* клетки нейробластомы могут содержать от 1 до 4 лишних копий этого гена относительно количества центромер хромосомы 2. Опухолевые клетки могут получить небольшое количество дополнительных копий гена посредством следующих механизмов:

- увеличение количества копий только короткого плеча хромосомы 2 или изохромосомы 2p (рис. 2) [39];
- дупликация гена *MYCN in situ* в локусе 2p24 (показано на 2 клеточных линиях);
- несбалансированная транслокация дистального конца короткого плеча хромосомы 2 (и, следовательно, *MYCN* и соседних генов) на другие хромосомы (ранее продемонстрировано на 5 клеточных линиях без амплификации гена *MYCN* и на некоторых первичных опухолях) [32].

Эти данные свидетельствуют о том, что присутствие дополнительных копий гена *MYCN* в неамплифицированной нейробластоме позволяет выявить клетки с комбинированными (сегментными и количествен-

ными) генетическими нарушениями, которые впоследствии помогают понять поведение этих опухолей [16].

Следует отметить, что в опухолях, которые имели амплификацию гена *MYCN*, наблюдали широкую внутриклеточную вариабельность в количестве копий этого гена [30].

Методы определения статуса гена *MYCN*

Надежное и своевременное определение амплификации гена *MYCN* – это ключевая точка в лечении нейробластом. На практике амплификация этого гена устанавливается разными способами.

До июля 1993 г. количество копий гена *MYCN* определяли с помощью Саузерн-блот-гибридизации. Однако с июля 1993 г. приобрел популярность и стал широко использоваться метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) для определения наличия амплификации гена *MYCN* [15, 40].

При сравнении этих 2 методов было показано, что при Саузерн-блот-анализе наряду с опухолевыми клетками нормальные клетки были также включены в исследование, тогда как при FISH-анализе каждое опухолевое ядро идентифицировалось отдельно [15, 16, 30]. Саузерн-блот-гибридизация без стандартизации сигнала для одной копии хромосомы 2 может привести к явной демонстрации амплификации гена *MYCN* вследствие анеуплоидии хромосомы 2 [30], тогда как для интерфазной FISH-реакции эта проблема была решена путем одновременной гибридизации со специфической α -сателлитной пробой, что позволяет прямо пересчитывать количество хромосомы 2 по отношению к количеству генов *MYCN*. Важно отметить, что количество копий одной хромосомы в клетках опухоли не обязательно отражает пloidность опухоли [3].

Таким образом, в настоящее время метод FISH является основным для оценки статуса гена *MYCN* («золотым стандартом» для характеристики нейробластомы). К преимуществам FISH следует отнести скорость и техническую простоту данного метода, а также возможность определять гетерогенность амплификации гена *MYCN* между отдельными нейробластами в пределах одной опухоли [39] как в интерфазных, так и метафазных ядрах. Одновременный анализ метафазных хромосом – важное дополнение к интерфазным исследованиям, так как позволяет получить ценную информацию о типе амплификации гена *MYCN*: экстрахромосомная (наличие двойных ацентричных хромосом, double minute – dmin) (рис. 3а), реже – внутривхромосомная (гомогенно окрашенные регионы, homogeneous stain region – HSR) (рис. 3б) или анеуплоидия хромосомы 2 (рис. 3в) [15, 16, 30].

Если речь идет о клинических образцах нейробластом, то метод интерфазной FISH позволяет быстро и надежно определить наличие амплификации гена *MYCN* даже в образцах, содержащих малое количество опухолевых клеток. Для младенцев и детей младшего

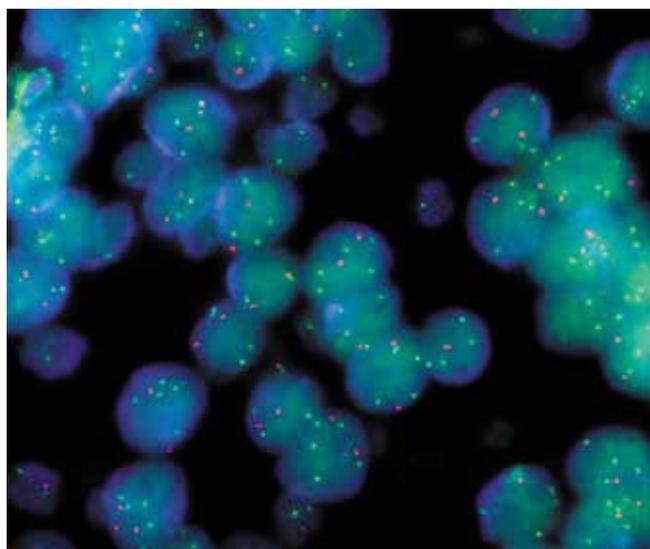


Рис. 2. Увеличение количества копий короткого плеча хромосомы 2 (FISH-реакция с флуоресцентным зондом LSI *MYCN* (2p24) Spectrum Green/CEP 2 (2p11.1-q11.1) Spectrum Orange) Dual Color Probe, Abbott-Molecular, $\times 1000$). Сигналы зеленого цвета – ген *MYCN*, красного – центромер хромосомы 2

возраста с подозрениями на нейробластому способность оценивать амплификацию гена в небольших образцах ткани, в том числе при тонкоигольной пункции опухоли или костного мозга, может служить альтернативой более инвазивным диагностическим хирургическим процедурам.

К недостаткам FISH следует отнести дороговизну, трудоемкость данного метода и сложности реализации мультиплексного анализа [17].

Гетерогенность амплификации гена *MYCN*

В некоторых случаях нейробластом описана внутриопухолевая гетерогенность копий *MYCN*. Она наблюдается как в локализованных, так и в диссеминированных опухолях. Различают 3 типа гетерогенности [39]:

- гетерогенность по клеткам – кластеры амплифицированных клеток, окруженные опухолевыми клетками без амплификации гена, и/или в опухоли встречаются единичные клетки с амплификацией гена *MYCN*. Такой тип гетерогенности чаще наблюдается в нейробластомах III и IV стадий и метастатических опухолях;
- гетерогенность наблюдается в первичном очаге и метастазе (амплификация гена *MYCN* в метастазе нейробластомы в костный мозг и отсутствие в первичной опухоли);
- гетерогенность по времени (появление амплификации гена *MYCN* в процессе течения болезни, часто после рецидива).

Клиническое значение гетерогенности амплификации гена *MYCN* практически не исследовано.

Механизм формирования ампликации

Несмотря на десятилетия интенсивных исследований, молекулярные механизмы амплификации гена остаются не полностью изученными. Тем не менее последние данные молекулярного анализа и цитогенетических исследований предлагают один часто используемый механизм формирования хромосомной нестабильности, который начинается с продукции ацентрических, циркулярных, экстрахромосомальных молекул ДНК, реплицирующихся автономно. Амплификация гена – результат неравномерной митотической сегрегации и аккумуляции этих элементов в определенных условиях. В большинстве случаев первоначально сформированные циркулярные ДНК очень малы и не могут быть визуализированы световым микроскопом, но они увеличиваются со временем и формируют гетерогенные по размеру двойные минихромосомы. Последние данные демонстрируют хронологию амплификации гена, в которой первоначальные экстрахромосомальные элементы интегрируются и образуют внутрихромосомные регионы амплификации гена. Процесс амплификации коротко можно описать по следующей схеме: вырезание, циркуляция, внутренняя реорганизация, амплификация и (при формировании HSR) внутрихромосомная интеграция и даль-

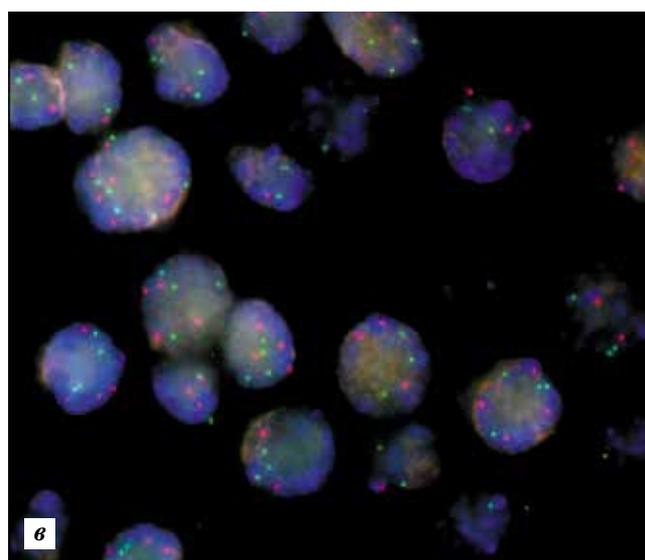
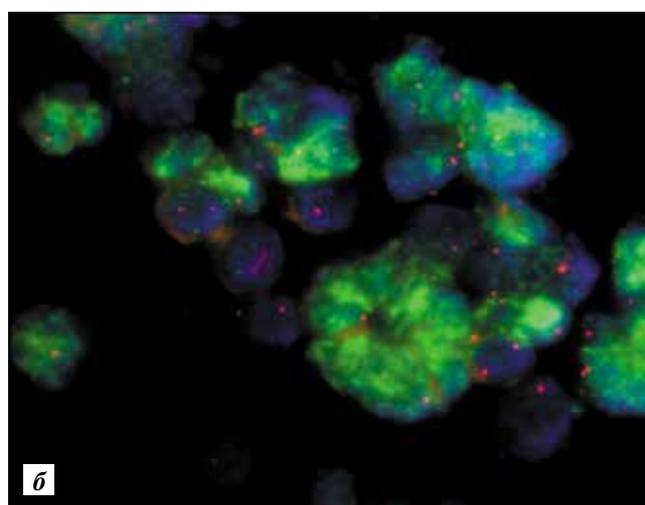
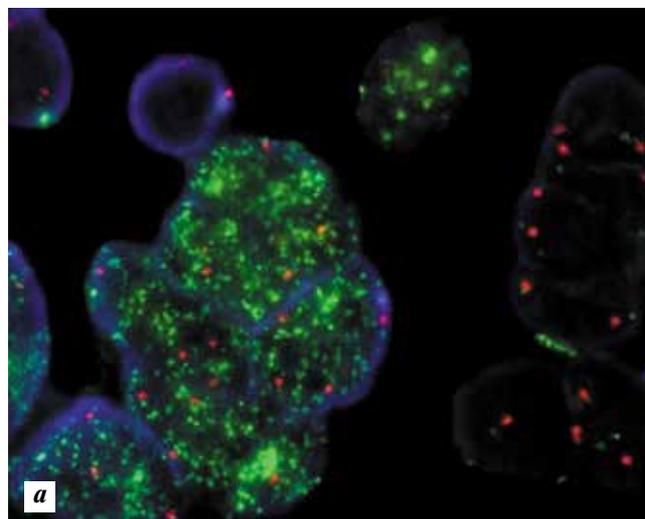


Рис. 3. Типы амплификации гена *MYCN* и анеуплоидия хромосомы 2 (FISH-реакция с флуоресцентным зондом LSI *MYCN* (2p24) Spectrum Green/CEP 2 (2p11.1-q11.1) Spectrum Orange Dual Color Probe, Abbott Molecular). Сигналы зеленого цвета – ген *MYCN*, красного – центромер хромосомы 2: а – в виде *dm1n* ($\times 1000$); б – в виде HSR ($\times 1000$); в – анеуплоидия хромосомы 2 ($\times 1000$)

нейшая амплификация [41–43]. Тип амплификации в виде HSR является более стабильным, так как при делении дополнительные копии гена могут передаваться дочерним клеткам [40]. В некоторых случаях *dmin* или HSR могут формироваться без предшественников [41].

Встречающуюся гетерогенность количества копий гена *MYCN* от клетки к клетке можно объяснить неравномерным разделением двойных минихромосом между дочерними клетками в процессе митоза, в результате которого они могут быть объединены в микроядра или потеряны через какое-то время [30, 40].

Типы амплификации гена *MYCN* и их прогностическое значение при нейробластоме. Элиминация амплифицированных последовательностей

Удобной моделью для изучения разных типов амплификации (*dmin* и HSR) послужила клеточная линия HL-60, полученная из крови больного острым промиелоцитарным лейкозом. На ранних стадиях культивирования клеток линии HL-60 амплификация гена *MYC* наблюдалась в виде *dmin*, которые затем заменялись HSR на более поздних стадиях культивирования [41]. При сравнении опухолевых клеток с разными типами амплификации значительной разницы в этих субгруппах по интенсивности роста или устойчивости к химиотерапии не выявлено. Тем не менее показано, что в опухолевых клетках, имеющих амплификацию гена *MYC* в виде HSR, не наблюдался апоптоз после дифференцировки, и после отмены химиопрепарата клетки возвращались в недифференцированное состояние. В тех клетках, которые содержали *dmin*, наблюдали существенное уменьшение уровня экспрессии *MYC*. Это предполагает, что клетки с амплификацией в виде HSR не так восприимчивы к действию дифференцирующих

агентов, возможно, из-за развития дополнительных механизмов резистентности [40].

Что касается нейробластомы, проведено исследование наличия возможной корреляции между разными типами амплификации гена *MYCN* и основными факторами риска при нейробластоме (возраст, стадия, плоидность и гистологическое строение нейробластомы по классификации Н. Shimada). Никакой статистически значимой ассоциации между этими параметрами выявлено не было. Однако отмечено, что опухоли с амплификацией гена *MYCN* в виде *dmin* по сравнению с HSR преобладали у пациентов более старшего возраста с поздними стадиями нейробластомы и наличием метастазов [40]. Не выявлено также различий между безрецидивной и общей выживаемостью у пациентов с амплификацией гена *MYCN* в виде двойных минихромосом и HSR [44].

При исследовании *in vitro* *dmin* отмечен интересный факт: они могут быть элиминированы (удалены) из ядра [40, 45, 46]. Подобное явление наблюдали также *in vivo* в клетках нейробластомы. Удаленные последовательности ДНК выглядят как микроядра (мелкие ядерноподобные структуры). Микроядра возникают во время S-фазы путем почкования или после митоза при перестройке ядерной мембраны (рис. 4а, б). Они могут содержать не только амплифицированные онкогены, но также фрагменты ацентричных хромосом или целые поврежденные хромосомы. Размер микроядер может варьировать в пределах одной опухоли. Одно из возможных объяснений этого – разное количество содержащейся в них ДНК [47]. Возникает вопрос: зачем клетке удалять последовательности, которые она же ранее амплифицировала (накапливала)? Ведь при этом появляется явное противоречие между двумя событиями, так как амплификация генов при-

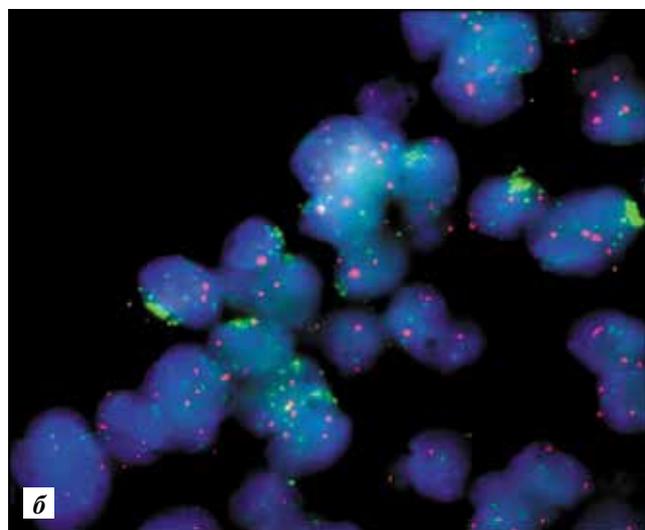
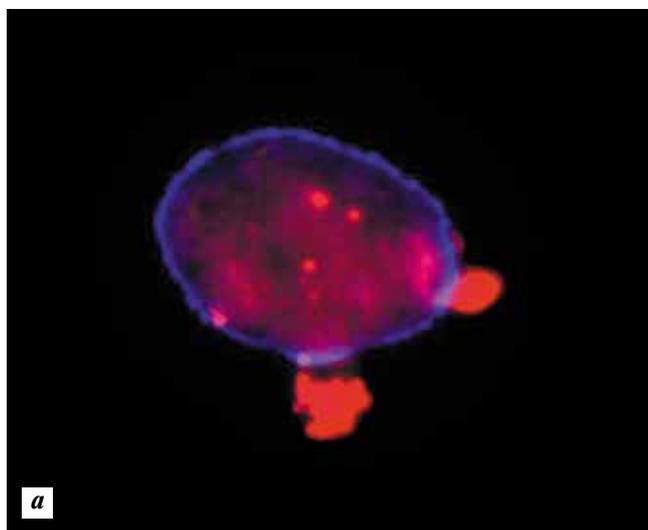


Рис. 4. Механизмы формирования микроядер при элиминации амплифицированных последовательностей из ядра: а – путем почкования ядерной мембраны (FISH-реакция с флуоресцентным зондом *LSI MYCN Spectrum Orange DNA Probe*, AbbottMolecular, $\times 1000$); б – периферическая локализация *dmin* перед элиминацией их из ядра (FISH-реакция с флуоресцентным зондом *LSI MYCN (2p24) Spectrum Green/CEP 2 (2p11.1-q11.1) Spectrum Orange*, $\times 1000$)

дает клетке селективное преимущество, а спонтанная элиминация амплифицированных последовательностей может подавить опухолевый фенотип. Но в этом случае механизм экстрезии рассматривается как самозащита клетки при избыточном количестве содержащихся в ней последовательностей. Существует строгая «архитектура» ядра, и в нем соблюдается определенное распределение последовательностей хромосом, поэтому не исключено, что если амплификация превышает ядерное пространство, то клетка должна удалить избыток генов путем экстрезии. Потеря клеткой амплифицированных последовательностей коррелирует с потерей злокачественных свойств и клеточной дифференцировкой [31].

Хотя амплификация гена *MYCN* – признак неблагоприятного исхода болезни, иногда агрессивное течение заболевания наблюдается в отсутствие амплификации данного гена. Это значит, что существуют другие генетические пути, влияющие на развитие нейробластом с плохим прогнозом [44].

Хромосомные aberrации при нейробластоме

Амплификация онкогена *MYCN* часто сопровождается делецией 1p36 [3] и увеличением плеча 17q, реже – делецией 11q23 [27, 29].

Как было описано выше, делеция в коротком плече хромосомы 1 (1p36) – наиболее частая структурная хромосомная aberrация при нейробластоме (около 30 %) и встречается у пациентов с плохим прогнозом [3]. При изучении большой группы пациентов ($n = 915$) с нейробластомой была выявлена ассоциация между делецией локуса 1p36 (23 %) и наличием неблагоприятных прогностических факторов (возраст пациента старше 1 года, IV стадия заболевания, амплификация гена *MYCN*, неблагоприятная гистологическая категория по Н. Shimada и диплоидность). У пациентов, которые имели делецию локуса 1p36, 3-летняя безрецидивная и общая выживаемость были ниже на 30 и 20 % соответственно по сравнению с пациентами, в опухоли которых не определялась потеря локуса 1p36 [44, 27]. Европейские исследователи придерживаются точки зрения, согласно которой необходимо проводить анализ статуса 1p в клетках нейробластомы для определения группы риска и своевременной более эффективной терапии пациентов.

В спонтанно дифференцирующихся и богатых стромой нейробластомах делецию 1p36 не выявляли. Эти наблюдения позволяют предположить, что гены, ассоциированные с дифференцировкой, находятся в этом регионе. Рядом европейских исследователей

показано, что благоприятные гистологические структуры, такие как наличие ганглиозных клеток и обилие шванновской стромы, коррелируют с благоприятными генетическими результатами. С другой стороны, ни одна из опухолей с делецией 1p не показала спонтанного развития шванновской стромы [3].

Увеличение длинного плеча хромосомы 17 (+17q) – добавление 1–3 лишних копий – впервые описано около 30 лет назад. Изучению этой aberrации уделялось мало внимания, но с появлением новых молекулярных цитогенетических исследований обнаружено, что это нарушение встречается в половине всех первичных опухолей. Клиническое значение этой aberrации противоречиво. С одной стороны, немецкие ученые показали, что увеличение длинного плеча хромосомы 17 не оказывает существенного влияния на прогноз заболевания [48]. С другой стороны, исследователи отметили, что данная aberrация ассоциируется с более агрессивным течением болезни и неблагоприятным прогнозом [44, 49]. В первичных нейробластомах амплификация гена *MYCN* часто ассоциирована с увеличением длинного плеча хромосомы 17, и само по себе это является неблагоприятным прогностическим фактором, так как плечо 17q считается удобным местом для интеграции амплифицированных последовательностей гена *MYCN* [40].

Делеция длинного плеча хромосомы 11 с высокой частотой наблюдается у больных нейробластомой с неамплифицированным геном *MYCN* в возрасте от 2,5 до 7 лет и ассоциирована с плохим прогнозом у пациентов с клиническими стадиями II или IVS [10, 29]. Существует также обратная корреляция между наличием в опухоли делеции 11q и амплификацией гена *MYCN* [16]. Американские исследователи выдвинули предложение считать потерю локуса 11q23 полезным прогностическим маркером в случаях, связанных с низким (I, II или IVS стадии) или средним (благоприятная III стадия или младенцы с IV стадией без амплификации гена *MYCN*) риском течения нейробластомы [27, 29, 50].

Заключение

Совершенствование методологических подходов, дающее возможность точно определять генетические нарушения, ассоциированные с высоким риском опухоли, такой как нейробластома, приведет к правильному и своевременному лечению и четкому пониманию молекулярных событий, результатом которых является злокачественная трансформация и опухолевая прогрессия.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Cushing H., Wolbach S.B. The transformation of a malignant paravertebral sympathicoblastoma into a benign ganglioneuroma. *Am J Pathol* 1927;3(3):203–16.
2. Everson T.C., Cole W.H. Spontaneous regression of neuroblastoma: Spontaneous Regression of Cancer. Philadelphia, Pa: WB Saunders, 1966.
3. Ambros I.M., Zellner A., Roald B. et al. Tyrrole of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med* 1996;334(23):1505–11.
4. Beckwith J.B., Perrin E.V. *In situ* neuroblastomas: a contribution to the natural history of neural crest tumors. *Am J Pathol* 1963;43(6):1089–104.
5. Brodeur G.M., Bagatell R. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11(12):704–13.
6. Matsunaga T., Shirasawa H., Hishiki T. et al. Enhanced expression of *N-myc* messenger RNA in neuroblastomas found by mass screening. *Clin Cancer Res* 2000;6(8):3199–204.
7. Maris J.M. Recent Advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;362(23):2202–11.
8. Mosse Y.P., Laudenslager M., Longo L. et al. Identification of *ALK* as the major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008;455(7215):930–5.
9. Gustafson W.C., Weiss W.A. Myc proteins as therapeutic targets. *Oncogene* 2010;29(9):1249–59.
10. Cohn S.L., Pearson A.D., London W.B. et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG task force report. *J Clin Oncol* 2009;27(2):289–97.
11. Acosta S., Lavarino C., Paris R. et al. Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells. *BMC Dev Biol* 2009;9:12.
12. Papac R.J. Spontaneous regression of cancer. *Cancer Treat Rev* 1996;22(6):395–423.
13. Cole W.H., Everson T.C. Spontaneous regression of cancer: preliminary report. *Ann Surg* 1956;144(3):366–83.
14. Wilson L.M., Draper G.J. Neuroblastoma, its natural history and prognosis: a study of 487 cases. *Br Med J* 1974;3(3):301–7.
15. Georg R.E., London W.B., Cohn S.L. et al. 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(27):6466–73.
16. Jeison M., Ash S., Halevy-Berko G. et al. 2p24 Gain region harboring *MYCN* gene compared with *MYCN* amplified and non amplified neuroblastoma. *Am J Pathol* 2010;176(6):2616–25.
17. Villamón E., Piqueras M., Mackintosh C. et al. Comparison of different techniques for the detection of genetic risk-identifying chromosomal gains and losses in neuroblastoma. *Virchows Arch* 2008;453:47–55.
18. Iehara T., Hiyama E., Tajiri T. et al. Is the prognosis of stage 4s neuroblastoma in patients 12 months of age and older really excellent? *Eur J Cancer* 2012;48(11):1707–12.
19. Monclair T., Brodeur G.M., Ambros P.F. et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: An INRG Task Force Report. *J Clin Oncol* 2009;27(2):298–303.
20. Shimada H., Ambros I.M., Dehner L.P. et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 1999;86(2):364–72.
21. Suganuma R., Wang L.L., Sano H. et al. Peripheral neuroblastic tumors with genotype-phenotype discordance: a report from the Children's Oncology Group and the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(3):363–70.
22. London W.B., Castleberry R.P., Matthay K.K. et al. 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(27):6459–65.
23. El-Sayed M.I., Ali A.M., Sayed H.A. et al. Treatment results and prognostic factors of pediatric neuroblastoma: a retrospective study. *Int Arch Med* 2010;3:37.
24. Teshiba R., Kawano S., Wang L.L. et al. Age-dependent prognostic effect by Mitosis-Karyorrhexis Index in neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Dev Pathol* 2014;17(6):441–9.
25. Look A.T., Hayes F.A., Shuster J.J. et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and *N-myc* gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1991;9(4):581–91.
26. Ladenstein R., Ambros I.M., Pötschger U. et al. Prognostic significance of DNA di-tetraploidy in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001;36(1):83–92.
27. Attiyeh E.F., London W.B., Mosse Y.P. et al. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2005;353(21):2243–53.
28. Nakazawa A., Haga C., Ohira M. et al. Correlation between the International Neuroblastoma Pathology Classification and genomic signature in neuroblastoma. *Cancer Sci* 2015;106(6):766–71.
29. Cetinkaya C., Martinsson T., Sandgren J. et al. Age dependence of tumor genetics in unfavorable neuroblastoma: arrayCGH profiles of 34 consecutive cases, using a Swedish 25-year neuroblastoma cohort for validation. *BMC Cancer* 2013;13:231.
30. Shapiro D.N., Valentine M.B., Rowe S.T. et al. Detection of *N-myc* gene amplification by fluorescence *in situ* hybridization. *Am J Pathol* 1993;142(5):1339–46.
31. Valent A., Benard J., Clausse B. et al. *In vivo* elimination of acentric double minutes containing amplified *MYCN* from neuroblastoma tumor cells through the formation of micronuclei. *Am J Pathol* 2001;158(5):1579–1584.
32. Valent A., Le Roux G., Barrois M. et al. *MYCN* gene overrepresentation detected in primary neuroblastoma tumour cells without amplification. *J Pathol* 2002;198(4):495–501.
33. Fredlund E., Ringner M., Maris J.M., Pählman S. High Myc pathway activity and low stage of neuronal differentiation associate with poor outcome in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(37):14094–9.
34. Aoki T., Ichimura S., Itoh A. et al. Identification of the neuroblastoma-amplified gene product as a component of the syntaxin 18 complex implicated in Golgi-to-endoplasmic reticulum retrograde transport. *Mol Biol Cell* 2009;20:2639–49.
35. Stock C., Bozsaky E., Watzinger F. et al. Genes proximal and distal to *MYCN* are highly expressed in human neuroblastoma as visualized by comparative expressed sequence hybridization. *Am J Pathol* 2008;172(1):203–14.
36. Hiyama E., Hiyama K., Yokoyama T. et al. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995;1(3):249–55.
37. Pezzolo A., Pistorio A., Gambini C. et al. Intratumoral diversity of telomere length in individual neuroblastoma tumors. *Oncotarget* 2014;6(10):7493–503.
38. Ohali A., Avigad S., Ash S. et al. Telomere Length Is a Prognostic Factor in Neuroblastoma. *Cancer* 2006;107(6):1391–9.
39. Theissen J., Boensch M., Spitz R. et al. Heterogeneity of the *MYCN* oncogene in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2009;15(6):2085–90.
40. Moreau L.A., McGrady P., London W.B. Does *MYCN* amplification manifested as homogeneously staining regions at diagnosis predict a worse outcome in children with neuroblastoma? A children's oncology group study. *Clin Cancer Res* 2006;12(19):5693–7.
41. Wahl G.M. The Importance of Circular DNA in Mammalian gene amplification. *Cancer Res* 1989;49:1333–40.
42. Storlazzi C.T., Lonoce A., Guastadisegni M.C. et al. Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors: origin and structure. *Genome Res* 2010;20(9):1198–206.

43. L'Abbate A., Macchia G., D'Addabbo P. et al. Genomic organization and evolution of double minutes/homogeneously staining regions with MYC amplification in human cancer. *Nucleic Acid Res* 2014;42(14):9131–45.
44. Yong M.H., Hwang W.S., Knight L.A. et al. Comparing histopathological classification with MYCN, 1p36 and 17q status detected by fluorescence *in situ* hybridization from 14 untreated primary neuroblastomas in Singapore. *Singapore Med J* 2009;50(11):1090–4.
45. Ambros I.M., Rumpler S., Luegmayr A. et al. Neuroblastoma cells can actively eliminate supernumerary *MYCN* gene copies by micronucleus formation – sign of tumor cell reversion? *Eur J Cancer* 1997;33(12):2043–9.
46. Shimizu N., Shimura T., Tanaka T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat Res* 2000;448(1):81–90.
47. Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol* 1998;140(6):1307–20.
48. Spitz R., Hero B., Ernestus K., Berthold F. Gain of distal chromosome arm 17q is not associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:4835–40.
49. Tajiri T., Tanaka S., Shono K. et al. Quick quantitative analysis of gene dosages associated with prognosis in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2001;166(1):89–94.
50. Spitz R., Hero B., Simon T., Berthold F. Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(11):3368–73.