مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۱، شماره ۳، پاییز ۹۰، صفحات ۱۸۸ تا ۱۹۵

Original Article

ارزیابی تکثیر ژنومی انکوژن MYCN در بیماران ایرانی مبتلا به نوروبلاستوما با استفاده از دوروش PCR کیفی و کمی (Real Time)

بهزاد پوپک[۱]، محمدتقی ارزانیان[۲]، پروانه وثوق[۳]، آتوسا قریب[۴]، امیر علی حمیدیه[۵]، محمد احسانی[۵]، مسعود پارسانیا[۶]، ابوالفضل یوسفیان[۷]، محمدعلی جهانگیرپور[۸]، کبری فراهانی[۸]

[۱] استادیار، دکترای هماتولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۲] استاد، فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۳] استاد، فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۴] استادیار، پاتولوژیست، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۵] استادیار، فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۶] استادیار، دکترای ویروس شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۷] کارشناس ارشد هماتولوژی، آزمایشگاه تخصصی پیوند
[۸] کارشناس آزمایشگاه، آزمایشگاه تخصصی پیوند

چکیده

سابقه و هدف: *امروزه در سراسر دنیا اولین اقدام پس از تشخیص هیستوپاتولوژیک نوروبلاستوما، بررسی تکثیر ژنومی MYCN بر روی نمونه تومور و بررسی وضعیت امپلیفیکیشن MYCN نقش اصلی را در تعین پیش‌آگهی و استراتژی درمان بیماران مبتلا به نوروبلاستوما دارد.*

روش بررسی: *۷۵ بیمار شامل، ۴۳ پسر و ۳۲ دختر با میانگین سنی ۴/۱ سال (۱۲۴-۱/۵ ماه) با تشخیص پاتولوژی نوروبلاستوما با استفاده از دو روش کیفی و کمی PCR از نظر تکثیر ژنومی MYCN بررسی شدند.*

یافته‌ها: *۴۳ درصد بیماران با روش کیفی و ۴۷ درصد با روش کمی، تکثیر ژنومی MYCN را نشان دادند. در گروه با تکثیر ژنومی MYCN، ۲۸ درصد کمتر از یک سال و ۴۳ درصد بیش از ۱ سال سن داشتند. تکثیر ژنومیMYCN در ۵۰ درصد بیماران با تشخیص پاتولوژی SRCT مشاهده شد.*

نتیجه‌گیری: *روش PCR روشی سریع ، مقرون به صرفه و قابل اعتماد در بررسی تکثیر ژنومی MYCNمی باشد. این روش به مقدار کمی نمونه نیاز دارد. روش کمی به دلیل سریعتر بودن و توانایی بیشتر در آشکارسازی تکثیر ژنومی و کاهش موارد مشکوک، بر روش کیفی ارجحیت دارد.*

واژگان کلیدی: *نوروبلاستوما، MYCN، آمپلیفیکاسیون، PCR.*

مقدمه

نوروبلاستوما شایع‌ترین تومور جامد خارج جمجمه‌ای در کودکان بوده و ۱۵ درصد موارد مرگ و میر ناشی از سرطان در این دوره از زندگی محسوب می‌شود (۱). ۹۶ درصد موارد نوروبلاستوما قبل از سن ۱۰ سالگی بروز می‌یابد (۲). ویژگی بالینی بارز نوروبلاستوما ناهمگونی گسترده آن است، به طوری که نحوه گسترش و پیشرفت بیماری با توجه به سن کودک در زمان تشخیص، اندام‌های درگیر و فاکتورهای بیولوژیک مولکولی بسیار متفاوت و مبهم (enigmatic) است (۱).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی، دکتر بهزاد پوپک
(**email**: bpoopak@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۹/۳۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۲/۲۰

به طورکلی کودکان کمتر از ۱ سال، اکثراً بیماری موضعی داشته که توسط جراحی به تنهایی و یا جراحی و شیمی درمانی قابل درمان هستند. این در حالی است که کودکان بالای ۱ سال معمولاً در زمان تشخیص بیماری منتشر و شدیدی داشته و اکثر آنها با وجود رژیم‌های درمانی شدید در نهایت تسلیم بیماری می‌شوند (۵-۳). این ناهمگونی بالینی با فاکتورهای بیولوژیک مولکولی بسیاری در ارتباط است. از میان این عوامل، مهم‌ترین آنها که در طی ۲۰ سال گذشته مورد مطالعه گسترده محققین قرار گرفته، انکوژنی با نام MYCN است (۱). ژن MYCN روی بازوی کوتاه کروموزم ۲ قرار دارد (2p24). محصول ژن MYCN یک فسفوپروتئین هسته‌ای است که با اتصال به پروتئین‌های دیگر نظیر MAX باعث فعال شدن نسخه برداری می‌گردد (۶). عرضه بیش از حد MYCN و اتصال آن به MAX رونویسی از گروهی از ژن‌های تحریک کننده تکثیر سلولی که هنوز ناشناخته‌اند را افزایش می‌دهد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند افزایش عرضه MYCN در سلول‌های طبیعی موجب تبدیل شدن آنها به سلول‌های بدخیم می‌گردد (۷، ۸). همچنین القای عرضه بیش از حد MYCN در نورواکتودرم موش‌های ترانس ژنیک، این موش‌ها را به نورو بلاستوما مبتلا می‌کند (۹). مکانیسمی که موجب عرضه بیش از حد MYCN می گردد، تکثیر ژنی یا Amplification است. طی این روند قسمت خاصی از کروموزوم به دفعات متوالی درون ژنوم سلول تکثیر می‌گردد (۱،۴).

تکثیر ژنومی MYCN در بیش از ۲۵ درصد موارد نوروبلاستوما وجود دارد (۱). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که تکثیر ژنومی MYCN با مراحل پیشرفته نوروبلاستوما در کودکان در ارتباط است و در بیمارانی که مبتلا به تومور با MYCN تکثیر یافته می‌باشند، گسترش بیماری سریع‌تر بوده و پیش‌آگهی بدتر است (۱۲-۱۰). همچنین بر اساس سایر تحقیقات، در صورتی‌که بیماران دارای MYCN تکثیر یافته، تحت رژیم درمانی شدید قرار گیرند میزان بقای آنها افزایش چشمگیری می‌یابد (۳).

علاوه بر این بدیهی است که مانند سایر بدخیمی‌ها، انتخاب رژیم درمانی مناسب برای بیماران مبتلا به نوروبلاستوما نیز بدون انجام درجه بندی صحیح و دقیق امکان پذیر نمی‌باشد و از آنجایی که امروزه برای تعیین درجه و پیش آگهی بیمار دچار نوروبلاستوما آگاهی از وضعیت تکثیر MYCN ضروری است، بررسی وضعیت تکثیر MYCN در تمام بیماران در زمان تشخیص امری بسیار حیاتی محسوب می گردد (۴، ۱۳، ۱۴).

با توجه به عدم بررسی تکثیر MYCN در نوروبلاستوما در ایران و اهمیت این بررسی در تعیین پیش آگهی، روند درمان و نیز به منظور پرهیز از عوارض درمان شدید در کودکان فاقد MYCN تکثیر یافته تصمیم به پیشنهاد و انجام بررسی فوق گرفته شد.

مواد و روشها

در مطالعه حاضر، ۷۵ کودک با تشخیص اولیه نوروبلاستوما یا مشکوک به نوروبلاستوما با استفاده از دوروش PCR کیفی و کمی (Real Time PCR) ارزیابی شدند. ۴۳ بیمار پسر و ۳۲ نفر دختر بوده و میانگین سنی آنها ۴/۱ سال (حداقل ۱/۵ ماه و حداکثر ۱۲۴ ماه) بود. نمونه مورد ارزیابی شامل بلوک یا بلوک‌های پارافینه، آسپیره‌های مغز استخوان و در یک مورد بافت در فرمالین بود. استخراج DNA از بلوک پارافینه پس از تهیه برش‌هایی از بلوک و دپارافینه کردن آن با گزیلول انجام شد (High Pure PCR Template, Roche). در مورد نمونه-های مغزاستخوان ابتدا سلول‌های تک هسته‌ای با گرادیان غلظتی (Ficoll: 1.077-1.080 g/cm^2) جدا شده و سپس DNA استخراج شد. برای اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده، اندازه‌گیری غلظت، درجه خلوص (OD260/OD280) DNA استخراج شده (Eppendorf biophotometer)، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد به منظور ارزیابی فراگمانتاسیون و انجام آزمایش PCR با پرایمرهای ژن β-گلوبین انجام شد. به منظور بررسی تکثیر MYCN در روش کیفی PCR، از دو جفت پرایمر برای ژن MYCN و دو جفت پرایمر برای ژن بتاگلوبین و ژن GADPH به عنوان ژن مرجع و کنترل داخلی استفاده گردید. برای واکنش PCR از dNTP به غلظت ۲۰۰ میکرومتر، کلررومنیزیم ۱/۵ میلی‌مول، Taq DNA polymerase به میزان یک واحد، پرایمرها به غلظت pmol ۱۰ در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر استفاده شد. میزان DNA بیمار برای هر واکنش ۱۰۰ نانوگرم بود. تعداد سیکل PCR بر اساس کیفیت DNA استخراج شده و نیز با در نظر گرفتن مرحله لگاریتمی PCR بین ۲۵ تا ۳۵ سیکل تعیین شد. در هر آزمایش، کنترل مثبت از DNA استخراج شده از رده سلولی نوروبلاستوم IMR32 با تعداد کپی ۵۰ عدد از ژن MYCN و نیز نمونه‌های بیماران با تکثیر ژنومی تایید شده استفاده شد. برای کنترل منفی نیز از نمونه استخراج شده از سلول‌های تک هسته‌ای طبیعی و نیز از نمونه خود بیماران که عدم تکثیر ژنومی در آنها تایید شده بود به همراه کنترل بدون

(Master mix control) DNA به کار رفت. سپس محصولات PCR برروی ژل پلی‌آکریلامید ۵ درصد (۲۰۰ ولت/ ۶۰ دقیقه) الکتروفورز شده و از رنگ‌آمیزی نقره برای مشاهده باندها استفاده شد. باندهای مربوط به ژن تکثیر شده MYCN به ترتیب با دو پرایمر اختصاصی در محدوده ۱۷۸ و ۱۵۱ جفت باز و باندهای مربوط به ژن‌های مرجع بتاگلوبین و GADPH به ترتیب در ۱۲۰ و ۱۰۴ جفت باز مشاهده شد. ارزیابی تکثیر ژنومی با مقایسه نسبت MYCN به ژن مرجع تعیین شد.

جدول ۱- توالی پرایمرها و پروب‌های مورد استفاده

پرایمر و پروب	توالی
MYCN forward	5-GTGCTCTCCAATTCTCGCCT-3
MYCN reverse	5 -GATGGCCTAGAGGAGGGCT-3
MYCN probe	5-FAM-CACTAAAGTTCCTTCCACCCTCTCCT-TAMRA-3
NAGK forward	5-TGGGCAGACACATCGTAGCA-3
NAGK reverse	5-CACCTTCACTCCCACCTCAAC-3
NAGK probe	5-VIC-TGTTGCCCGAGATTGACCCGGTTAMRA-3

جدول ۲- برنامه PCR کمی

Cycles	Time
Initiation 1 cycle	95°C for 5 minutes
50 cycle	95°C for 15 seconds
50 cycle	60°C for 1 minute

برای آزمایش کمی PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شرایط به شرح ذیل بود: بافر ۱۰X ۲/۵ میکرولیتر mgcl2 به میزان ۱/۵ میکرومولار، پروب ۱۰ نانومول، هر پرایمر ۲۰ نانومول، taq DNA یک واحد، میزان DNA هر بیمار ۱۰۰ نانوگرم. PCR کمی با دستگاه Corbett مدل Rotorgene 6000 انجام گردید. توالی پرایمر و پروب‌های استفاده شده در روش کمی در جدول ۱ و برنامه مورد استفاده برای PCR کمی در جدول ۲ ذکر شده‌اند. تعداد کپی مربوط به MYCN با استفاده از نسبت دوز ژن MYCN به NAKG برای هر بیمار محاسبه گردید.

یافته‌ها

در ارزیابی انجام شده از بیماران، ۴۳ درصد با روش کیفی و ۴۷ درصد با روش کمی تکثیر ژنومی MYCN را نشان دادند. در گروه‌بندی سنی انجام شده برای گروه با تکثیر ژنومی MYCN، ۲۸ درصد بیماران سن کمتر از یک سال و ۴۳ درصد سن بیش از ۱ سال داشتند. نتایج حاصل از روش مورد مطالعه با نتایج ارسالی از طرف دکتر هیاما (دانشگاه هیروشیما) در تمامی موارد مطابقت داشت. همچنین از ۱۰ بیمار با تشخیص پاتولوژی Small Round Cell Tumor (SRCT) که مشکوک به نوروبلاستوما بودند، ۵۰ درصد موارد دارای تکثیر ژنومی MYCN بودند (جدول ۳). در ارزیابی تکثیر ژنومی MYCN، از دو روش کیفی و کمی استفاده شد که نتایج آن در جدول ۴ نمایش داده شده است.

جدول ۴- نتایج بررسی بیماران مطالعه حاضر با هردو روش کمی و کیفی PCR

	تعداد بیماران	درصد موارد دارای تکثیر MYCN	درصد موارد فاقد تکثیرMYCN	درصد موارد مبهم
PCR کیفی	۷۵	۴۳	۴۳	۱۴
PCR کمی	۷۵	۴۷	۴۹	۴

بحث

در میان فاکتورهای پیش آگهی مختلف، بررسی وضعیت تکثیر ژنومی MYCN نقش اصلی را در تعین پیش آگهی و نحوه درمان بیماران مبتلا به نوروبلاستوما دارد. در واقع مطالعات متعدد نشان داده‌اند تکثیر ژنومی MYCN با مراحل پیشرفته بیماری و نیز سرعت گسترش تومور ارتباط مستقیم دارد. بنابراین تشخیص سریع، کم هزینه و صحیح وضعیت انکوژن MYCN اهمیت فراوانی در انکولوژی یافته است. تاکنون روش‌های متعددی مانند ساترن بلات، FISH، PCR کمی و کیفی در دنیا برای بررسی این تکثیر ژنومی مورد استفاده قرار

جدول۳- مشخصات و نتیجه بررسی تکثیر ژنومی بیمارانی که با تشخیص SRCT مراجعه کردند.

شماره	جنس/سن بر حسب ماه	گزارش پاتولوژی	یافته های بالینی	وضعیت MYCN
1	31/M	Small cell malignant tumor	Mediastinal mass	negative
2	3 /M	Small round cell tumor suggestive of Neuroblastoma	Liver mass	positive
3	22/ F	Malignant small round cell tumor ,Neuroblastoma	Abdominal	positive
4	60/F	Malignant small round cell tumor	Abdominal	negative
5	60/F	Metastatic malignant small round cell tumor	Supraclavicular lymph node	positive
6	24/M	Malignant small round cell tumor	Pelvic mass	negative
7	48/F	Small blue round cell tumor with sever necrotic change	Abdominal	positive
8	24/F	Small round cell tumor	Retroperitoneal	negative
9	38/M	Small round cell tumor	Spinal cord mass	negative
10	9/M	Small round cell tumor	Posterior Mediastinal Mas	positive

گرفته‌اند. در میان این روش‌ها، PCR به دلیل ساده‌تر بودن مراحل انجام، کمتر بودن هزینه و در عین حال ایجاد نتایج رضایت‌بخش، بیشتر از سایرین مورد توجه قرار گرفته است. ساترن بلات به مقدار زیادی DNA نیاز دارد که در بسیاری از موارد به دلیل ناچیز بودن نمونه، فراهم کردن آن دشوار یا غیرممکن است. FISH نیز در مقایسه با سایر روش‌ها علاوه بر هزینه بالاتر از صحت کمتری برخوردار است (۱۷-۱۵). روش کمی بررسی MYCN در مقایسه با روش کیفی دارای مزیت‌هایی است. در روش کمی، محصولات PCR وارد محیط آزمایشگاه نمی‌شوند، بنابراین احتمال بروز آلودگی و ایجاد نتایج مثبت کاذب به حداقل می‌رسد. روش کمی، مشکلات مراحل پس از PCR روش کیفی از جمله وقت گیر و دشوار بودن مراحل تهیه و رنگ آمیزی ژل را ندارد. روش کمی برخلاف روش کیفی، تعیین دقیق تعداد کپی MYCN را امکان‌پذیر می‌سازد که از نظر بالینی اهمیت فراوانی دارد. روش کمی بسیار سریع‌تر از روش کیفی است و نتایج آن حداکثر طی ۳ ساعت آماده می‌شوند، بنابر این حتی در صورت نیاز می‌توان آزمایش را در یک روز کاری تکرار کرد (۲۱-۱۸). با توجه به اینکه PCR کمی و کیفی MYCN فقط در یک مطالعه بین المللی و به طور محدود مقایسه شده‌اند، در بررسی حاضر ۷۵ بیمار با تشخیص پاتولوژی و بالینی نوروبلاستوما با استفاده از هردو روش PCR کمی و کیفی مورد ارزیابی قرار گرفتند تا توانایی این دو روش در بررسی وضعیت انکوژن MYCN در ایران نیز مورد ارزیابی و مقایسه قرار گیرد.

۴۳ (۳۲ نفر) و ۴۷ (۳۵ نفر) درصد بیماران به ترتیب با استفاده از PCR کیفی و کمی تکثیر ژنومی MYCN را نشان دادند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ در برزیل انجام شد، ۲۱ درصد بیماران با هر دو روش کمی و کیفیPCR، تکثیر ژنومی MYCN را نشان دادند. بنابراین همخوانی این دو روش ۱۰۰ درصد بود (۲۱). هرچند در مطالعه حاضر شیوع موارد دارای تکثیر ژنومی MYCN با بررسی که در برزیل انجام شد متفاوت است (۴۳ و ۴۷ درصد در مقابل ۲۱ درصد)، اما از نظر همخوانی PCR کمی و کیفی، نتایج ما با بررسی ذکر شده نزدیک بوده و قابل مقایسه است.

بالاتر بودن شیوع تکثیر ژنومی MYCN در بیماران مطالعه حاضر ممکن است به دلیل مراجعه بیماران در مراحل پیشرفته‌تر بیماری یا تشخیص دیرتر بیماری باشد. ذکر این نکته ضروری است که اکثر بیماران مطالعه ما از مراکز پیوند مغز استخوان معرفی شده و وارد مطالعه حاضر شدند. مسئله اخیر می‌تواند بالاتر بودن میانگین سنی بیماران مطالعه حاضر

(۴۸ ماه) نسبت به میانگین سنی ۲۲ ماه که در اکثر مطالعات ذکر شده است را نیز توجیه کند (۲۳،۲۲).

در روش کمی در ۴ درصد موارد و در روش کیفی در ۱۴ درصد موارد نتیجه آزمایش مبهم بود، بنابراین کاهش همخوانی بین دو روش را می‌توان به محدودیت‌های روش کیفی از جمله دشوار بودن تفسیر نتایج در برخی از موارد نسبت داد. مقایسه چشمی شدت باند MYCN و ژن مرجع برای تفسیر نتایج در روش کیفی از جمله مسائلی است که ممکن است دقت و صحت این روش را کاهش دهد.

با استفاده از روش PCR کیفی ۲۸ درصد بیماران کمتر از یک سال و ۴۳ درصد بیماران دارای یک سال یا بیشتر تکثیر ژنومی MYCN را نشان دادند. سن بیش از یک سال فاکتور پیش آگهی نامطلوب مستقل برای بیماران مبتلا به نوروبلاستوما محسوب می‌شود و شیوع تکثیر ژنومی MYCN در بیماران با بیش از یک سال سن بیشتر است. دریک مطالعه ۹/۴ درصد بیماران کمتر از یک سال و ۶۴ درصد بیماران دارای بیش از یک سال سن تکثیر ژنومی MYCN را نشان دادند (۱۶). در بررسی دیگر نتایج مشابهی مشاهده گردید، بدین ترتیب که ۶۰ درصد بیماران بیش از یک سال و ۷ درصد بیماران کمتر از یک سال دارای تکثیر ژنومی MYCN بودند (۲۴). هرچند همان طور که انتظار می‌رفت در مطالعه حاضر نیز اختلاف معنی‌داری میان شیوع تکثیر ژنومی MYCN در دو گروه سنی کمتر و بیش از یک سال وجود دارد، اما نتایج ما از نظر میزان شیوع تکثیر ژنومی تفاوت قابل توجهی با دو مطالعه ذکر شده دارند. این تفاوت ممکن است به دلایل مختلف از جمله سایر فاکتورهای بیولوژیک موثر بر تکثیر ژنومیMYCN و نیز تفاوت در روش انجام و تفسیر نتایج آزمایش PCR باشد.

علاوه بر میزان تکثیر ژنومی MYCN، عوامل متعدد دیگری نیز در تعیین پیش آگهی نوروبلاستوما موثر می‌باشند که شامل سن بیمار (کودکان زیر یک سال پیش آگهی بهتری دارند)، محل تومور (تومورهای خارج آدرنال پیش آگهی بهتری دارند)، مرحله‌بندی جراحی، درجه‌بندی میکروسکوپی، میزان تکثیر (Ki 67)، رگ‌زایی تومور (رگ‌زایی بیشتر با پیش‌آگهی بد همراه است)، فعالیت تلومراز (با پیش‌آگهی بدتر همراه است)، انفیلتراسیون لنفوسیتی داخل تومور (پیش‌آگهی بهتر)، میزان وانیل مندلیک و هومو وانیلیک پائین ادرار (پیش آگهی بدتر) و بسیاری موارد دیگر هستند (۲۵).

بررسی بافت شناسی در نوروبلاستوما نه تنها از لحاظ تشخیص که از جهت درجه‌بندی تومور حائز اهمیت است. سیستم‌های درجه‌بندی متعددی در طول زمان به کار رفته‌اند، ولی طبقه بندی شیمادا که به طور رایج استفاده می‌شود تکرار پذیر بوده و از لحاظ تعیین پیش آگهی نیز معنی‌دار است. دراین سیستم علاوه بر میزان تمایز سلولی، از سن بیمار و میزان تکثیر و آپوپتوز سلول‌های توموری جهت تقسیم‌بندی بیماران در گروه‌های پیش آگهی مختلف استفاده می‌شود (۲۶).

مرحله‌بندی نوروبلاستوما مرحله‌بندی جراحی بوده و عمدتا بر اساس سیستم INSS انجام می‌گیرد و در آن از گزارش پاتولوژی جهت تعیین مواردی چون وجود یا فقدان عقده‌های لنفاوی درگیر استفاده می‌شود. در این سیستم بیماری به پنج مرحله اصلی (1, 2A, 2B,3,4, 4S) تقسیم می‌شود که بدترین پیش آگهی مربوط به مرحله ۴ است. بیشترین میزان تکثیر ژنومی در مرحله ۳ و ۴ گزارش شده است.

در مطالعه حاضر، مطلوب یا نامطلوب بودن هیستولوژی بر اساس طبقه‌بندی شیمادا در بسیاری از گزارش‌ها پاتولوژی ذکر نگردیده بود که بررسی ارتباط تکثیر ژنومی MYCN و نمای بافت شناسی را دشوار می‌کرد. توصیه می‌شود جهت استانداردسازی گزارش‌های پاتولوژی از سیستم شیمادا در کلیه موارد نوروبلاستوما استفاده شده و در صورت عدم امکان (به عنوان مثال ناچیز بودن حجم بافت، تشخیص تومور در مغز استخوان و..) دلایل آن در گزارش آورده شود.

بررسی‌های متعدد بیولوژی مولکولی نوروبلاستوما نشان داده‌اند که تکثیر ژنومی MYCN منجر به مهار تمایز سلولی، افزایش تکثیر سلولی و نیز افزایش میتوزیس و کاریورکسی می‌گردد. بنابراین تکثیر ژنومی MYCN در موارد فاقد تمایز (undifferentiated) یا با تمایز ناچیز (poorly differentiated) نوروبلاستوما شایع‌تر است و با اندکس میتوزی/ کاریورکسی (MKI) بالا همخوانی دارد (۲۷).

تعیین پیش‌آگهی در بیماری نوروبلاستوما نقش بسیار مهمی در انتخاب استراتژی درمان دارد و امروزه از تمام روش‌های موجود مانند بررسی مولکولی و طبقه‌بندی دقیق هیستوپاتولوژیک برای مشخص نمودن پیش‌آگهی این بدخیمی استفاده می‌شود. به عنوان مثال، نوزادان مبتلا به مرحله ۴ INSS که بیماری متاستاتیک دارند، در صورت عدم وجود تکثیر ژنومی MYCN در اکثر موارد عاقبت بسیار خوبی با شیمی درمانی محدود دارند، در حالی که درصورت وجود تکثیر ژنومی MYCN این بیماران پیش‌آگهی بدی دارند (۲۸). از آنجایی که کودکان و نوزادان تحمل عوارض زودرس و دیررس درمان‌های تهاجمی و شدید را ندارند، تشخیص مواردی از نوروبلاستوما که پیش‌آگهی مطلوب داشته و بیمار

با درمان‌های کم خطرتر بقای مناسبی خواهد داشت، اهمیت فوق العاده‌ای دارد (۲۹). تعیین دقیق مرحله و پیش‌آگهی، بقای کلی بیماران مبتلا را در کشورهای مختلف به طور چشمگیری افزایش داده است. بدیهی است که برای بهبود عاقبت بیماران ایرانی مبتلا به نوروبلاستوما باید مانند سایر مراکز معتبر با ترکیب اطلاعات بدست امده از بررسی مولکولی و هیستوپاتولوژیک، مرحله و پیش‌آگهی بیماری به طور دقیق مشخص گردد.

بررسی تکثیر ژنومی MYCN علاوه بر تعیین پیش‌آگهی بیماری، نقش مهمی در تشخیص افتراقی نوروبلاستوما از سایر بدخیمی‌هایی که در آنها سلول‌های بدخیم به صورت سلول-های کوچک گرد(round cell tumor small) مشاهده می-شوند، ایفا می‌کند. نوروبلاستوما، لنفوما، رابدومیوسارکوما، استئوسارکوما، لوسمی لنفوبلاستیک و تومورهای Ewing's گروه سرطان‌های با سلول‌های کوچک و گرد (SRCT) کودکان را تشکیل می‌دهند (۳۰). تشخیص و طبقه بندی صحیح SRCT از اهمیت بسیاری برخوردار است، زیرا امروزه نه تنها درمان هر کدام از این بیماری‌ها تفاوت‌های آشکار دارد، بلکه تعیین پیش‌آگهی و عوامل خطرساز در هر بیمار نقش بسیار مهمی در انتخاب استراتژی درمان و در نتیجه عاقبت بیماری دارد. استفاده از روش‌های مرسوم مانند ایمونوهیستوشیمی در بسیاری از موارد تشخیص افتراقی این تومورها را میسر می‌سازد، اما این روش نیز مانند سایر بررسی‌های آزمایشگاهی از محدودیت‌های خاص خود برخوردار بوده و در مواردی به ابهامات تشخیصی افزوده و آخرین آزمایش مورد نیاز برای دستیابی به تشخیص نهایی محسوب نمی‌شود. به عبارت دیگر در پاره ای از موارد، تشخیص افتراقی SRCT از یکدیگر با تکیه بر بررسی میکروسکوپی و ایمونوهیستوشیمی ممکن است بسیار دشوار و یا غیر ممکن باشد. در این مواقع، بررسی-های مولکولی در دسترسی به تشخیص قطعی بسیار کمک کننده است. با بررسی تکثیر ژنومی MYCN تشخیص افتراقی نوروبلاستوما از لنفوما، لوسمی لنفوبلاستیک، تومورهای Ewing's و استئوسارکوما امکان پذیر می‌شود، زیرا تاکنون در این بدخیمی‌ها تکثیر ژنومی MYCN گزارش نگردیده است. تکثیر ژنومی MYCN در رابدومیوسارکوما و رتینوبلاستوما گزارش شده است. بنابراین از این بررسی مولکولار در تشخیص افتراقی نوروبلاستوما از رابدومیوسارکوما و رتینوبلاستوما نمی‌توان سود برد (۴۱-۳۱).

در مطالعه حاضر تکثیر ژنومی MYCN در ۱۰ بیمار با تشخیص پاتولوژی small round cell tumor که باتوجه به ویژگی‌های بالینی و مورفولوژیک مشکوک به نوروبلاستوما بودند، مورد ارزیابی قرار گرفت. در تشخیص افتراقی نوروبلاستوما از سایر موارد SRCT، مثبت شدن نتیجه بررسی MYCN به نفع وجود نوروبلاستوما است، اما با توجه به اینکه شیوع تکثیر ژنومی MYCN حداکثر در ۳۵ درصد موارد نوروبلاستوما گزارش شده است، نتیجه منفی این آزمایش تشخیص نوروبلاستوما را منتفی نمی‌سازد. با توجه به عدم پیگیری وضعیت بیماران مشکوک مطالعه حاضر از نظر پاسخ به درمان و عاقبت بیماری به طور قطع نمی‌توان نتیجه گرفت که بررسی تکثیر ژنومی MYCN در چند درصد موارد به تشخیص قطعی بیماری منجر شده است. علاوه براین برای بررسی میزان سودمندی این آزمایش در تشخیص افتراقی SRCT در بیماران ایرانی، تعداد بیشتری از موارد باید مورد ارزیابی قرار گیرند. در تشخیص افتراقی SRCT، نتیجه بررسی مولکولی باید همواره با توجه به نتایج سایر آزمایش‌ها و نیز ویژگی‌های بالینی بیماران مورد تفسیر قرار گیرد. به طور کلی با توجه به نتایج مطالعه حاضر و نیز بررسی‌های متعددی که در کشورهای مختلف صورت گرفته است، در مورد اهمیت ارزیابی تکثیر ژنومی MYCN و روش‌های بررسی آن به نکات ذیل می توان اشاره کرد:

۱- تکثیر ژنومی MYCN مهم‌ترین فاکتور بیولوژیک در تعیین پیش‌آگهی نوروبلاستوما است و در تعیین میزان خطر بیماری نقش مهمی ایفا می‌کند. درمان بیماران مبتلا به نوروبلاستوما بدون تعیین دقیق مرحله و میزان خطر بیماری ممکن است منجر به از دست دادن عضو طی عمل جراحی، اختلال در عملکرد ارگان‌های مختلف و عوارض ناتوان کننده یا بسیار جدی ناشی از شیمی درمانی با دوز بالا گشته و درنهایت کیفیت زندگی و میزان بقای بیماران با درجه خطر پایین یا متوسط را به شدت کاهش دهد. از طرف دیگر با شناسایی موارد پرخطر بیماری می‌توان با تغییر استراتژی درمانی یا وسیع‌تر کردن آنها عاقبت بسیاری از بیماران را بهبود بخشید.

۲- امروزه روش‌های شناسایی حداقل بیماری باقیمانده در نوروبلاستوما به خوبی بررسی و توصیف شده‌اند که به ویژه برای پیگیری درمان بیماران با درجه خطر بالا بسیار سودمند می‌باشند.

۳- باید توجه داشت که درمان بیش از حد یا دست کم گرفتن یک بدخیمی، علاوه بر کم رنگ کردن شانس بقای بیماران، هزینه‌های زیادی را به بیمار و نیز سیستم بهداشت و درمان یک کشور تحمیل می‌کند.

۴- روش PCR روشی سریع، مقرون به صرفه و قابل اعتماد در بررسی تکثیر ژنومی MYCN می باشد. این روش به مقدار کمی نمونه نیاز داشته و با استفاده از DNA استخراج شده از بلوک‌های پارافینه، بافت تازه و آسپیره مغز استخوان قابل انجام است. روش کمی به دلیل سریع‌تر بودن، توانایی بیشتر در آشکارسازی تکثیر ژنومی و کاهش موارد مشکوک بر روش کیفی ارجحیت دارد.

۵ - تکثیر ژنومی MYCN در بیماران ایرانی دارای بیش از یک سال سن به طور معنی‌داری شایع‌تر است.

۶- بررسی تکثیر ژنومی MYCN تشخیص افتراقی نوروبلاستوما از سایر تومورهای دارای سلول‌های کوچک گرد را امکان‌پذیر می‌سازد. در تفسیر نتیجه این بررسی مولکولی توجه به ویژگی‌های بالینی بیمار و نتایج سایر بررسی‌های آزمایشگاهی مانند ایمونوهیستوشیمی باید مد نظر قرار گیرد.

REFERENCES

1. Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. J Clin Oncol 1999; 17: 2264-79.
2. Grovas A, Fremgen A . The national cancer data base report of childhood cancers in USA Cancer. 1997; 80(12):2321-32.
3. De Bernardi B, Nicolas B, Boni L, Indolfi P, Carli M, Cordero Di Montezemolo L, et al. Disseminated Neuroblastoma in children older than one year at Diagnosis. J Clin Oncol 2003; 21: 1592-601.
4. Lacayo NJ. Neurobbstoma. Emedicine. Available from: www.emedinine.medscape.com
5. Naional Cancer institute. Neuroblastoma. Available from: www.cancer.gov
6. Wenzel A, Cziepluch C, Hamann U, Schürmann J, Schwab M. The N-myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein max in human nuroblastoma cells. EMBO 1997; 10: 3703-12.
7. Yancopoulos GD, Nisen PD, Tesfaye A, Kohl NE, Goldfarb MP, Alt FW. N-myc can cooperate with ras to transform normal cells in culture. Proc Nat Acad Sci 1985; 82: 5455-59.
8. Small MB, Hay N, Schwab M, Bishop JM. Neoplastic transformation by the human gene N-myc. Mol Cell Bio 1987; 7: 1638-45.
9. Weiess WA, Aldape K. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. EMBO J 1997; 16: 2985-95.
10. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al: Association of multiple copy of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastoma. N Engl J Med 1985; 313: 1111-16.
11. Nakagawara A, Ikeda K, Tsuda T, Higashi K, Okabe T. Amplification of N myc oncogene in stage II and IVS neuroblastoma may be a prognostic indicator. J Pediatr Surg. 1987;22(5):415-8.
12. Westerman F, Schwab M. Genetic parameters of neuroblastoma. Cancer lett 2002; 184: 127-47.
13. Mora J, Gerald WL, Qin J, Cheung NK. Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management. Oncologist 2001; 6: 263-68.
14. Brossard J. Neuroblastoma, an enigmatic disease. BMJ 1996; 52: 797-801.
15. Park J, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. Pediatr Clin N Am 2008; 55: 97–120.
16. Tanaka S, Tajiri T, Noguchi S, Shono K, Ihara K, Hara T. Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of MYCN in neuroblastoma. J Pediatr Surg 2004; 39: 63-68.
17. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, VarmusHE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. Science 1984; 224: 1121–24.
18. Squire J, Thorner P, Marrano P. Identification of MYCN copy number heterogeneity by direct FISH analysis of neuroblastoma preparations. Mol Diagn 1996; 1: 281–89.
19. Gallego S, Reventos J, Sanchez de Toledo J. polymerase chain reaction with serial dilutions for quantification of MYCN gene amplification in neuroblastoma. Anticancer Res 1998; 18: 1211–16.
20. Shapiro DN, Valentine MB, Rowe ST. Detection of N-myc gene amplification by fluorescence in situ hybridization. Am J Pathol 1993; 142: 1339-46.
21. Souza AC, Souza DR, Sanabani SS, Giorgi RR, Bendit I. The performance of semi-quantitative differential PCR is similar to that of real-time PCR for the detection of the MYCN gene in neuroblastomas Braz J Med Biol Res 2009; 42: 791-95.

22. Riley RD, Heney D, Jones DR, Sutton AJ, Lambert PC, Abrams KR, et al. Asystematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma. Clin Cancer Res 2004; 10: 4–12.

23. Cotterill SJ, Pearson AD, Pritchard J, Foot AB, Roald B, Kohler JA, et al. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma : results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982–1992. Eur J Cancer 2000; 36: 901–908.

24. Tajiri T, Tanaka S, Higashi M, Kinoshita Y, Takahashi Y, Tatsuta K. Biological diagnosis for neuroblastoma using the combination of highly sensitive analysis of prognostic factors. J Pediatr Surg. 2006;41(3):560-6.

25. Silverberg S, Delellis R, Farble W, Livolsi V, Wick M. Silverbergs principle and practice of surgical pathology and cytopathology. 4th edition. London: Churchill Livingstone. 2006. p.304.

26. Qualman SJ, Bowen J, Fitzgibbons PL, Cohn SL, Shimada H. Protocol for the examination of specimens from patients with neuroblastoma and related neuroblastic tumors. Arch Pathol Lab Med. 2005;129(7):874-83

27. Kushner BH. Neuroblastoma- from genetic profiles to clinical challenge. N Engl J Med 2005; 353; 21.

28. Evans AE, D'Angio GJ. Age at diagnosis and prognosis in children with neuroblastoma. J Clin Oncol 2005; 23: 6443-44.

29. Gilbert J, Haber M, Bordow SB, Marshall GM, Norris MD. Use of tumor-specific gene expression for the differential diagnosis of neuroblastoma from other pediatric small round-cell malignancies. Am J Pathol. 1999;155(1):17-21.

30. Cohn SL. Diagnosis and classification of the small round-cell tumors of childhood. Am J Pathol. 1999;155(1):11-5.

31. Collins VP. Amplified genes in human gliomas. Semin Cancer Biol 1993; 4: 27–30.

32. Hui AB, Lo Kw, Yin XL, Poon ws, Ng HK. Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiform using array-based comparative genomic hybridization. Lab Invest 2001; 81: 717–23.

33. Schwab M, Corvi R, Amler LC. N-MYC oncogene amplification: a consequence of genomic instability in human neuroblastoma. Neuroscientist 1995; 1: 277–85.

34. Bayani J, Zielenska M, Marrano P, Kwan Ng Y, Taylor MD, Jay V, et al. Molecular cytogenetic analysis of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors by using conventional banding, comparative genomic hybridization, and spectral karyotyping. J Neurosurg 2000; 93: 437–48.

35. Schutz BR, Scheurlen W, Krauss J, du Manoir S, Joos S, Bentz M, et al. Mapping of chromosomal gains and losses in primitive neuroectodermaltumors by comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer. 1996;16(3):196-203

36. Khoddami M, Squire J, Zielenska M, Thorner P. Melanotic neuroectodermal tumor of infancy: a molecular genetic study. Pediatr Dev Pathol 1998; 1: 295–99.

37. Miura I, Graziano SL, Cheng JQ, Doyle LA, Testa JR. Chromosome alterations in human small cell lung cancer: frequent involvement of 5q. Cancer Res 1992; 52: 1322–28.

38. Dietzsch E, Lukeis RE, Vrazas V, Hasthorpe S, Garson OM. Characterization of homogeneously staining regions in a small cell lung cancer cell line, using in situ hybridization with an MYCN probe. Genes Chromosomes Cancer. 1994;10(3):213-6.

39. Godbout R, Squire J. Amplification of a DEAD box protein gene in retinoblastoma cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 7578–82.

40. Squire J, Gallie BL, Phillips RA. A detailed analysis of chromosomal changes in heritable and non-heritable retinoblastoma. Hum Genet 1985; 70: 291–301.

41. Garson JA, McIntyre PG, Kemshead JT. N-myc amplification in malignant astrocytoma. Lancet 1985 ; 2 : 718–19.