

KATARZYNA SZEWCZYK, WALENTYNA BALWIERZ

(UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI)

METODY DETEKCJI PRZERZUTÓW KOMÓREK NEUROBLASTOMA DO SZPIKU KOSTNEGO

Neuroblastoma (NB) to jeden z najczęstszych nowotworów wieku dziecięcego (7–10%) i jednocześnie najczęstszy pozaczaszkowy guz lity tego wieku¹. Komórki nowotworowe tworzące tkankę guza wywodzą się z embrionalnych komórek nerwowych. Zmiany patologiczne powstają w tkankach współczulnego układu nerwowego, najczęściej w rdzeniu nadnerczy lub przykręgosłupowych zwojach nerwowych. Obraz kliniczny choroby jest bardzo zróżnicowany, od zlokalizowanej masy guza pierwotnego do postaci choroby z obecnością wielonarządowych przerzutów.

Obecnie stosowane programy terapeutyczne u dzieci z NB są bardzo zróżnicowane. Wybór protokołu leczenia opiera się na uwzględnieniu kilku zasadniczych czynników rokowniczych. Niekorzystne znaczenie prognostyczne mają: wiek pacjenta powyżej 1. roku życia w momencie diagnozy, 4. stopień zaawansowania choroby z obecnością przerzutów, budowa histopatologiczna guza bez cech różnicowania oraz niekorzystne aberracje chromosomowe obecne w komórkach NB². Pacjent posiadający wymienione powyżej cechy kwalifikowany

¹ W. Balwierz, *Nerwiak zarodkowy współczulny*, [w:] *Onkologia i hematologia dziecięca*, red. A. Chybicka, K. Sawicz-Birkowska, PZWL, Warszawa 2008, s. 357–374; G. M. Brodeur, *Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma*, „Nature Reviews Cancer” 2003, nr 3, s. 203–216; E. Johnson, S. M. Dean et al., *Antibody-based immunotherapy in high-risk neuroblastoma*, „Expert Reviews in Molecular Medicine” 2007, nr 9, s. 1–21; J. M. Maris, M. D. Hogarty et al., *Neuroblastoma*, „Lancet” 2007, nr 369, s. 2106–2120.

² N. Bown, *Neuroblastoma tumor genetics: clinical and biological aspects*, „Journal of Clinical Pathology” 2001, nr 54, s. 897–910; T.A. Ishola, D.H. Chung, *Neuroblastoma*, „Surgical Oncology” 2007, nr 16, s. 149–156; J. M. Maris, *Recent advances in neuroblastoma*, „New England Journal of Medicine” 2010, nr 362, s. 2202–2211.

jest do grupy wysokiego ryzyka niepowodzenia leczenia, stanowiącej około 50% wszystkich przypadków³. Wyniki leczenia w tej grupie dzieci z NB pozostają nadal niezadowolające. Pomimo zwiększenia intensywności terapii 5-letnie EFS (ang. *event free survival*) pozostaje na poziomie 40%⁴. Jedną z przyczyn niepowodzenia leczenia może być obecność przetrwałych po chemioterapii, opornych na dostępne cytostatyki, nowotworowych komórek macierzystych, które mogą zagnieżdżać się zwłaszcza w jamach szpikowych⁵. Dlatego istotnym elementem diagnostyki w NB jest badanie szpiku kostnego w celu potwierdzenia lub wykluczenia obecności komórek nowotworowych zarówno w trakcie diagnozy, jak i podczas prowadzonego leczenia. Dzięki istniejącym technikom laboratoryjnym możliwa jest detekcja nawet pojedynczych komórek NB i monitorowanie tzw. minimalnej choroby resztkowej (ang. *minimal residual disease*, MRD).

MIKROSKOPIA ŚWIETLNA

Jest to technika bazująca na ocenie cytomorfologicznej rozmazów szpiku kostnego, barwionych odczynnikiem Wrighta-Giemsy, w poszukiwaniu komórek nowotworowych. Komórki NBL są nieznacznie lub zdecydowanie większe od erytrocytów. Ich charakterystyczną cechą morfologiczną jest okrągły kształt i bardzo duże jądro komórkowe przy znikomej ilości cytoplazmy. Nie są to jednak na tyle specyficzne własności, aby rozpoznać komórki nowotworowe, zwłaszcza pojedyncze, pomiędzy różnymi komórkami hematopoetycznymi. Detekcja komórek NB w szpiku kostnym jest dodatkowo utrudniona przez ich nierównomierny rozkład i tendencję do tworzenia skupisk zwanych pseudorozetkami⁶.

Podsumowując, klasyczna ocena cytomorfologiczna szpiku kostnego stosowana do wykrywania komórek NB, pomimo pełnej akceptacji INSS (ang. *International Neuroblastoma Staging System*), jest metodą o niskiej czułości. Pozwala na postawienie pozytywnego wyniku dopiero wtedy, gdy komórki guza stanowią ponad 0,1%, a w niektórych przypadkach nawet 10% komórek szpiku⁷.

³ W. Balwierz, op. cit., s. 357–374; J. M. Maris, M. D. Hogarty et al., *Neuroblastoma*, op. cit., s. 2106–2120; J. M. Maris, *Recent advances in neuroblastoma*, op. cit., s. 2202–2211.

⁴ J. Hara, *Development of treatment strategies for advanced neuroblastoma*, „International Journal of Clinical Oncology” 2012, nr 17, s. 196–203.

⁵ J. M. Maris, *Recent advances in neuroblastoma*, op. cit., s. 2202–2211; T. Kuroda, *Cellular kinetics of neuroblastoma and the role of surgery*, „Pediatric Surgery International” 2011, nr 27, s. 913–917; S. Ootsuka, S. Asami et al., *Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma*, „Biological and Pharmaceutical Bulletin” 2008, nr 31, s. 1071–1074.

⁶ A. Rajwanshi, R. Srinivas et al., *Malignant small round cell tumors*, „Journal of Cytology” 2009, nr 26, s. 1–10.

⁷ P. F. Ambros, G. Mehes et al., *Disseminated tumor cells in the bone marrow – Chances and consequences of microscopical detection methods*, „Cancer Letters” 2003, nr 197, s. 29–34.

IMMUNOCYTOCHEMIA ENZYMATYCZNA I FLUORESCENCYJNA (ANG. *IMMUNOCYTOCHEMISTRY*)

W metodzie immunocytochemicznej detekcja badanych komórek odbywa się dzięki specyficznemu wiązaniu przeciwciała z antygenem. Do wizualizacji utworzonego kompleksu wykorzystywany jest barwnik fluorescencyjny związany bezpośrednio z przeciwciałem lub enzym i chromogen. Zaletą barwienia fluorescencyjnego jest możliwość jednoczesnego oznaczenia kilku antygenów w komórce, natomiast wadą szybki rozkład fluorochromu pod wpływem światła. Bardziej trwałe obraz uzyskuje się dzięki zastosowaniu chromogenu, jednak wówczas liczba testowanych antygenów ogranicza się do dwóch, które ponadto muszą być zlokalizowane w różnych miejscach w komórce. Dodatkowym atutem enzymatycznego znakowania przeciwciała jest wgląd w morfologię komórki. Jest to ważny aspekt weryfikacji komórek NB, zwłaszcza przy niespecyficznym barwieniu immunocytochemicznym, któremu podlegają najczęściej makrofagi⁸.

Antygenem wykorzystywanym do diagnostyki komórek NB w szpiku kostnym jest disialogangliozyd GD2. Jest to antygen prezentowany w komórkach pochodzenia neuroektodermalnego, występujący jedynie na powierzchni błony komórkowej neuronów i obwodowych włókien nerwowych⁹. Rekomendowanym enzymem jest fosfataza alkaliczna, która nie ulega ekspresji w komórkach szpiku kostnego.

Technika immunocytochemiczna jest obecnie jedną z najczulszych metod detekcji komórek NB (10^{-5} do 10^{-6})¹⁰. Wymaga jednak dużego doświadczenia osoby dokonującej oznaczenia, ponieważ ocena preparatu pod mikroskopem jest subiektywna.

CYTOMETRIA PRZEPLYWOWA (ANG. *FLOW CYTOMETRY*)

Cytometria przepływowa jest szybką i w pełni zautomatyzowaną metodą diagnostyczną. Wykorzystując wiązkę światła lasera, można dokonać oceny wielkości i ziarnistości komórek, a także obecności antygeny, prezentowanego zarówno na powierzchni komórki, jak i w cytoplazmie oraz jądrze komórkowym.

⁸ Ibidem; K. Beiske, S. A. Burchill et al., *Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by immunocytology and QRT-PCR: Recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force*, „British Journal of Cancer” 2009, nr 100, s. 1627–1637.

⁹ N. Bown, op. cit., s. 897–910; D. Czaplicki, I. Horwacik et al., *New method for quantitative analysis of GD2 ganglioside in plasma of neuroblastoma patients*, „Acta Biochimica Polonica” 2009, nr 56, s. 423–431.

¹⁰ K. Beiske, S. A. Burchill et al., *Consensus criteria for sensitive detection...*, op. cit., s. 1627–1637.

Każdej analizie jakościowej, odbywającej się na podstawie wymienionych wyżej kryteriów, towarzyszy analiza ilościowa utworzonych subpopulacji komórek. Najnowsze cytometry (8-, 12-, a nawet 17-kolorowe) umożliwiają jednoczasową detekcję kilku antygenów znakowanych różnymi fluorochromami¹¹.

Komórki NB charakteryzują się intensywną produkcją białka N-CAM (ang. *neural cell adhesion molecule*), tj. glikoproteiny odpowiedzialnej za adhezję komórek nerwowych i rozpoznawanej przez przeciwciała CD56. Dodatkowo brak im jakiegokolwiek antygeny specyficznego dla leukocytów, dla których komplementarne przeciwciała to CD45. Stąd też ujawnienie mikroprzerzutów tych komórek nowotworowych do szpiku kostnego odbywa się najczęściej w oparciu o immunofenotyp CD45-/CD56+ oraz dodatkowo GD2+/CD9+/CD57+/CD81+¹². CD9 i CD81 są to białka transbłonowe należące do rodziny tetraspanin, biorące udział w adhezji oraz migracji komórek¹³. CD57 to fragment białka rozpoznawany bezpośrednio przez przeciwciała, zwany epitopem. Jest on produkowany w wielu komórkach nerwowych, a jego tkankowo-specyficzna ekspresja zmienia się w trakcie rozwoju układu nerwowego¹⁴.

Warto zauważyć, że profil CD45-/CD56+ nie jest specyficzny tylko dla komórek NB. Używa się go również podczas oznaczania komórek mięsaka Ewinga, rhabdomyosarcoma (mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego), innych nowotworów drobnokomórkowych, czy guzów neuroendokrynnych oraz nieprawidłowych leukocytów¹⁵. Czulość metody szacuje się na 10^{-4} do 10^{-5} ¹⁶.

¹¹ P. Autissier, C. Soulas et al., *Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans*, „Cytometry Part A” 2010, nr 77, s. 410–419; B. Davidson, H. P. Dong et al., *The diagnostic and research applications of flow cytometry in cytopathology*, „Diagnostic Cytopathology” 2012, nr 40, s. 525–535; R. M. De Tute, *Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies*, „Histopathology” 2011, nr 58, s. 90–105.

¹² D. Batinić, K. Dubravčić, *Flow cytometry in the diagnosis of childhood tumors*, „Paediatrica Croatica, Supplement” 2003, nr 47, s. 45–49; M. F. Okcu, R.-Y. Wang et al., *Flow cytometry and fluorescence in situ hybridization to detect residual neuroblastoma cells in bone marrow*, „Pediatric Blood and Cancer” 2005, nr 45, s. 787–795; K. S. Tsang, C. K. Li et al., *Detection of micrometastasis of neuroblastoma to bone marrow and tumor dissemination to hematopoietic autografts using flow cytometry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, „Cancer” 2003, nr 97, s. 2887–2897.

¹³ A. B. Van Spriel, C. G. Figdor, *The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases*, „Microbes and Infection” 2010, nr 12, s. 106–112; F. Leccia, A. Nardone et al., *Cytometric and biochemical characterization of human breast cancer cells reveals heterogeneous myoepithelial phenotypes*, „Cytometry Part A” 2012, Article in Press; D. Powner, P. M. Kopp et al., *Tetraspanin CD9 in cell migration*, „Biochemical Society Transactions” 2011, nr 39, s. 563–567.

¹⁴ D. Focosi, M. Bestagno et al., *CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency*, „Journal of Leukocyte Biology” 2010, nr 87, s. 107–116.

¹⁵ F. Bozzi, F. Gambirasio et al., *Detecting CD56+/NB84+/CD45- immunophenotype in the bone marrow of patients with metastatic neuroblastoma using flow cytometry*, „Anticancer Research” 2006, nr 26, s. 3281–3287.

RT-PCR (ANG. *REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION*) I QRT-PCR (ANG. *REAL-TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION*)

Wspólnym elementem wymienionych technik molekularnych jest sprawdzenie poziomu ekspresji wybranego markera molekularnego, który ulega transkrypcji jedynie w komórkach NB. Im silniejsza ekspresja genu markerowego w badanej próbie, tym więcej komórek nowotworowych w szpiku kostnym pacjenta. Istotnym etapem oznaczenia jest synteza cDNA na matrycy mRNA. Może ona odbywać się z wykorzystaniem starterów specyficznych dla danego fragmentu transkryptu genu, tak jak w przypadku RT-PCR. Otrzymujemy wówczas ściśle zdefiniowany produkt amplifikacji, który następnie podlega analizie jakościowej poprzez rozdział elektroforetyczny. Analiza ilościowa w RT-PCR jest utrudniona, ponieważ jest bardzo subiektywna. Badacz, korzystając z własnego doświadczenia, porównuje intensywność luminescencji prążka z badanej próby do obrazu prążków z krzywej wzorcowej. Krzywa ta powstaje na podstawie serii rozcieńczeń wybranej linii komórkowej NB w krwi obwodowej zdrowej osoby.

Inny schemat działania prezentuje QRT-PCR, gdzie w celu przepisania całego genomowego mRNA na cDNA najpierw używane są startery losowe. Dzięki temu powstały kwas nukleinowy jest bardziej stabilny w kolejnym etapie analizy, w którym staje się matrycą reakcji PCR. Pozostałe substraty QRT-PCR to specyficzne startery oraz komplementarne do analizowanej sekwencji cDNA sondy molekularne znakowane fluorochromem. Umożliwia to monitorowanie przyrostu produktu amplifikacji po każdym cyklu trwającej reakcji PCR. Dzięki temu analiza jest szybka i pozwala wyeliminować etap szacowania ilości produktu dopiero po zakończeniu reakcji. Dodatkowo jest ona w pełni zautomatyzowana.

Markerem molekularnym rekomendowanym do detekcji komórek NB jest mRNA hydroksylazy tyrozynowej (*TH*). Białko to jest pierwszym enzymem na szlaku syntezy katecholamin, których nadmierne wydzielanie jest typowe dla komórek NB¹⁷. Obecnie testowane są również inne potencjalne markery, między innymi należący do rodziny genów homeobox *PHOX2β* (ang. *paired-like homeo-*

¹⁶ K. Beiske, S. A. Burchill et al., *Consensus criteria...*, op. cit., s. 1627–1637.

¹⁷ V. F. Viprey, M. V. Corrias et al., *Standardisation of operating procedures for the detection of minimal disease by QRT-PCR in children with neuroblastoma: Quality assurance on behalf of SIOPEN-R-NET*, „European Journal of Cancer” 2007, nr 43, s. 341–350; V. F. Viprey, M. A. Lastowska et al., *Minimal disease monitoring by QRT-PCR: Guidelines for identification and systematic validation of molecular markers prior to evaluation in prospective clinical trials*, „Journal of Pathology” 2008, nr 216, s. 245–252; V. F. Viprey, S. A. Burchill, *Gene expression profiling for discovery of novel markers of minimal disease*, „Clinical Cancer Research” 2009, nr 15, s. 6742; L. H. J. Lambooy, C. E. M. Gidding et al., *Real-time analysis of tyrosine hydroxylase gene expression: A sensitive and semiquantitative marker for minimal residual disease detection of neuroblastoma*, „Clinical Cancer Research” 2003, nr 9, s. 812–819.

box 2β)¹⁸, L-dopa dekarboksylaza *DDC* (ang. *dopa decarboxylase; aromatic L-amino acid decarboxylase*)¹⁹ i doublekortyna *DCX* (ang. *doublecortin*)²⁰. Natomiast wyniki badań wykluczają syntazę disialogangliozydu *GD2S* jako znacznik o zbyt niskiej specyficzności dla komórek NB²¹.

Omawiane techniki PCR podobnie jak oznaczenie immunocytochemiczne charakteryzują się bardzo wysoką czułością, sięgającą 10^{-6} ²².

PODSUMOWANIE

U każdego pacjenta na etapie diagnozy, przed włączeniem leczenia, należy obligatoryjnie wykonać badanie szpiku kostnego w poszukiwaniu komórek nowotworowych. Zalecenia te dotyczą również monitorowania MRD w trakcie terapii. Zgodnie z najnowszymi programami badawczymi koordynowanymi przez grupę SIOPEN (ang. International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma) ocena szpiku kostnego powinna być wykonana metodą tradycyjnej analizy cytomorfologicznej oraz równocześnie metodą immunocytochemiczną z przeciwciałami anti-GD2 lub techniką molekularną QRT-PCR z zastosowaniem *TH* jako markera²³. Celem trwających badań jest ustalenie klinicznie istotnej liczby komórek NB w szpiku kostnym. Ponadto prowadzone testy wielu markerów molekularnych być może pozwolą wyłonić najbardziej specyficzny marker dla NB, dzięki któremu uzyskiwane będą bardziej wiarygodne wyniki badań zarówno na etapie diagnozy, jak i monitorowania MRD.

¹⁸ C. Gaultier, H. Trang, et al., *Pediatric disorders with autonomic dysfunction: What role for PHOX2B?*, „Pediatric Research” 2005, nr 58, s. 1–6; J. Stutterheim, A. Gerritsen et al., *Phox2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma*, „Journal of Clinical Oncology” 2008, nr 26, s. 5443–5449.

¹⁹ C. Träger, Å. Vernby et al., *mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis*, „International Journal of Cancer” 2008, nr 123, s. 2849–2855; F. Bozzi, R. Luksch et al., *Molecular detection of dopamine decarboxylase expression by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction in bone marrow and peripheral blood: Utility as a tumor marker for neuroblastoma*, „Diagnostic Molecular Pathology” 2004, nr 13, s. 135–143.

²⁰ S. Oltra, F. Martinez et al., *The doublecortin gene, a new molecular marker to detect minimal residual disease in neuroblastoma*, „Diagnostic Molecular Pathology” 2005, nr 14, s. 53–57.

²¹ S. Ootsuka, S. Asami et al., op. cit., s. 1071–1074; C. Träger, Å. Vernby et al., op. cit., s. 2849–2855; S. Modak, N.-K. V. Cheung, *Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastom*, „Cancer Investigation” 2007, nr 25, s. 67–77; B. Kågedal, *Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: Still a ways to go*, „Clinical Chemistry” 2009, nr 55, s. 1268–1270.

²² K. Beiske, S.A. Burchill et al., *Consensus criteria for sensitive detection...*, op. cit., s. 1627–1637.

²³ Ibidem.

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB), which is derived from the embryonic neural cells, is one of the most common childhood cancers (7–10%). Despite an increase in treatment intensity, the curability of patients, especially those in the high risk group, is still unsatisfactory. One of the causes of therapy failure may be the presence of cancer stem cells that survive chemotherapy and are capable of colonizing the bone marrow cavities. A very important element in diagnosis of NB is the examination of bone marrow conducted either to confirm or exclude the presence of metastases. The currently used laboratory methods enable the detection of even a single NB cell and allow the monitoring of the minimal residual disease (MRD).

WYKAZ SKRÓTÓW

EFS	przeżycie wolne od niekorzystnych zdarzeń (ang. <i>event free survival</i>)
GD2	glikolipid disialogangliozyd (ang. <i>disialoganglioside GD2</i>)
GD2S	gen syntaza disialogangliozydu (ang. <i>synthase disialoganglioside GD2</i>)
INSS	Międzynarodowy System Klasyfikacji Stopnia Zaawansowania Neuroblastoma (ang. <i>International Neuroblastoma Staging System</i>)
MRD	minimalna choroba resztkowa (ang. <i>minimal residual disease</i>)
NB	neuroblastoma, zwojak zarodkowy współczulny
QRT-PCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SIOPEN	Międzynarodowe Towarzystwo Onkologii Dziecięcej Grupa Europejska ds. Neuroblastoma (ang. <i>International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma</i>)
TH	hydroksylaza tyrozynowa (ang. <i>tyrosine hydroxylase</i>)

BIBLIOGRAFIA

1. Balwierz W., *Nerwiak zarodkowy współczulny*, [w:] *Onkologia i hematologia dziecięca*, red. A. Chybicka, K. Sawicz-Birkowska, PZWL, Warszawa 2008, s. 357–374.
2. Brodeur G. M., *Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma*, „Nature Reviews Cancer” 2003, nr 3, s. 203–216.
3. Johnson E., Dean S. M. et al., *Antibody-based immunotherapy in high-risk neuroblastoma*, „Expert Reviews in Molecular Medicine” 2007, nr 9, s. 1–21.
4. Maris J. M., Hogarty M. D. et al., *Neuroblastoma*, „Lancet” 2007, nr 369, s. 2106–2120.
5. Bown N., *Neuroblastoma tumor genetics: clinical and biological aspects*, „Journal of Clinical Pathology” 2001, nr 54, s. 897–910.
6. Ishola T. A., Chung D. H., *Neuroblastoma*, „Surgical Oncology” 2007, nr 16, s. 149–156.
7. Maris J. M., *Recent advances in neuroblastoma*, „New England Journal of Medicine” 2010, nr 362, s. 2202–2211.
8. Hara J., *Development of treatment strategies for advanced neuroblastoma*, „International Journal of Clinical Oncology” 2012, nr 17, s. 196–203.
9. Kuroda T., *Cellular kinetics of neuroblastoma and the role of surgery*, „Pediatric Surgery International” 2011, nr 27, s. 913–917.

10. Ootsuka S., Asami S. et al., *Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma*, „Biological and Pharmaceutical Bulletin” 2008, nr 31, s. 1071–1074.
11. Rajwanshi A., Srinivas R. et al., *Malignant small round cell tumors*, „Journal of Cytology” 2009, nr 26, s. 1–10.
12. Ambros P. F., Mehes G. et al., *Disseminated tumor cells in the bone marrow – Chances and consequences of microscopical detection methods*, „Cancer Letters” 2003, nr 197, s. 29–34.
13. Beiske K., Burchill S. A. et al., *Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by immunocytology and QRT-PCR: Recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force*, „British Journal of Cancer” 2009, nr 100, s. 1627–1637.
14. Czaplicki D., Horwacik I. et al., *New method for quantitative analysis of GD2 ganglioside in plasma of neuroblastoma patients*, „Acta Biochimica Polonica” 2009, nr 56, s. 423–431.
15. Autissier P., Soulas C. et al., *Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans*, „Cytometry Part A” 2010, nr 77, s. 410–419.
16. Davidson B., Dong H. P. et al., *The diagnostic and research applications of flow cytometry in cytopathology*, „Diagnostic Cytopathology” 2012, nr 40, s. 525–535.
17. De Tute R. M., *Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies*, „Histopathology” 2011, nr 58, s. 90–105.
18. Batinić D., Dubravčić K., *Flow cytometry in the diagnosis of childhood tumors*, „Paediatrica Croatica, Supplement” 2003, nr 47, s. 45–49.
19. Okcu M. F., Wang R.-Y. et al., *Flow cytometry and fluorescence in situ hybridization to detect residual neuroblastoma cells in bone marrow*, „Pediatric Blood and Cancer” 2005, nr 45, s. 787–795.
20. Tsang K. S., Li C. K. et al., *Detection of micrometastasis of neuroblastoma to bone marrow and tumor dissemination to hematopoietic autografts using flow cytometry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, „Cancer” 2003, nr 97, s. 2887–2897.
21. Van Spriel A. B., Figdor C. G., *The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases*, „Microbes and Infection” 2010, nr 12, s. 106–112.
22. Leccia F., Nardone A. et al., *Cytometric and biochemical characterization of human breast cancer cells reveals heterogeneous myoepithelial phenotypes*, „Cytometry Part A” 2012, Article in Press.
23. Powner D., Kopp P. M. et al., *Tetraspanin CD9 in cell migration*, „Biochemical Society Transactions” 2011, nr 39, s. 563–567.
24. Focosi D., Bestagno M. et al., *CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency*, „Journal of Leukocyte Biology” 2010, nr 87, s. 107–116.
25. Bozzi F., Gambirasio F. et al., *Detecting CD56+/NB84+/CD45- immunophenotype in the bone marrow of patients with metastatic neuroblastoma using flow cytometry*, „Anticancer Research” 2006, nr 26, s. 3281–3287.
26. Viprey V. F., Corrias M. V. et al., *Standardisation of operating procedures for the detection of minimal disease by QRT-PCR in children with neuroblastoma: Quality assurance on behalf of SIOPEX-R-NET*, „European Journal of Cancer” 2007, nr 43, s. 341–350.
27. Viprey V. F., Lastowska M. A. et al., *Minimal disease monitoring by QRT-PCR: Guidelines for identification and systematic validation of molecular markers prior to evaluation in prospective clinical trials*, „Journal of Pathology” 2008, nr 216, s. 245–252.
28. Viprey V. F., Burchill S. A., *Gene expression profiling for discovery of novel markers of minimal disease*, „Clinical Cancer Research” 2009, nr 15, s. 6742.

29. Lambooy L. H. J., Gidding C. E. M. et al., *Real-time analysis of tyrosine hydroxylase gene expression: A sensitive and semiquantitative marker for minimal residual disease detection of neuroblastoma*, „Clinical Cancer Research” 2003, nr 9, s. 812–819.
30. Gaultier C., Trang H., et al., *Pediatric disorders with autonomic dysfunction: What role for PHOX2B?*, „Pediatric Research” 2005, nr 58, s. 1–6.
31. Stutterheim J., Gerritsen A. et al., *Phox2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma*, „Journal of Clinical Oncology” 2008, nr 26, s. 5443–5449.
32. Träger C., Vernby Å. et al., *mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis*, „International Journal of Cancer” 2008, nr 123, s. 2849–2855.
33. Bozzi F., Luksch R. et al., *Molecular detection of dopamine decarboxylase expression by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction in bone marrow and peripheral blood: Utility as a tumor marker for neuroblastoma*, „Diagnostic Molecular Pathology” 2004, nr 13, s. 135–143.
34. Oltra S., Martinez F. et al., *The doublecortin gene, a new molecular marker to detect minimal residual disease in neuroblastoma*, „Diagnostic Molecular Pathology” 2005, nr 14, s. 53–57.
35. Modak S., Cheung N.-K. V., *Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastom*, „Cancer Investigation” 2007, nr 25, s. 67–77.
36. Kågedal B., *Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: Still a ways to go*, „Clinical Chemistry” 2009, nr 55, s. 1268–1270.