

## Original Article

### Review of Indication of Splenectomy in Children Hospital of Tabriz in 10 Years

Azim Rezamand<sup>1</sup>, Saeid Aslanabadi<sup>2</sup>, Laleh Alizadeh<sup>3</sup>, Mohammadamin Rezazadehsaatlou<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology Pediatrics, Children's Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>2</sup>Department of Pediatric Surgery, Children's Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>3</sup>General Physician

<sup>4</sup>Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Eastern Azerbaijan, Iran

Received: 16 Feb, 2014      Accepted: 17 Apr, 2014

#### Abstract

**Background & Objectives:** Spleen largest lymphoid organ in the body and its role is blood filtering, strengthen the immune system, storage and hematopoiesis. Trauma, congenital pathologic is the indications of splenectomy. The aim of this study was evaluation 10 years splenectomy indications in Children's Hospital of Tabriz.

**Material and Methods:** In a retrospective and descriptive study that performed on the children who underwent splenectomy in Tabriz Children's Hospital, the indications of splenectomy in these children evaluated.

**Results:** 34 of studied children were boys and 35 of studied children were girls. Mean age of boy children was  $99.20 \pm 42.77$  months and the mean age of girl children was  $125.42 \pm 35.24$  ( $P=0.007$ ). Major beta-thalassemia in 23 cases was the most common indication for splenectomy in studied children. Spleen size in 22 children was normal and in 47 children spleen size was great. Platelet drop in two cases, port vein thrombosis in 3 cases, heart failure in two cases, sepsis, recurrent meningitis, sepsis and CVA in one of the studied children were postoperative complications in children underwent for splenectomy. Only seven cases of studied children had died after surgery that two cases of mortality causes was heart failure due to talassemia. In our study, trauma in 3 cases (4.34%) of the studied children was the splenectomy indications that one of these children had died.

**Conclusion:** Major beta-thalassemia, hereditary spherocytosis and idiopathic thrombocytopenic purpura were the most common causes of splenectomy in the studied children and in our study, 5 of children with talassemia were died that 2 causes was heart failure due to talassemia, 2 cases due to port vein thrombosis and one case due to CVA. Postoperative complication rate was 23.18% and risk of infection and sepsis in our study was 3.07% and also the mortality rate in our study was 10.1%.

**Keywords:** Splenomegaly, Splenectomy, Indications, Complications, Mortality

**\*Corresponding author:**

**E-mail:** dr\_amin\_re@Yahoo.com

## مقاله پژوهشی

### MYCN gene Amplification در کودکان مبتلا به نوروبلاستوما در مرکز آموزشی درمانی کودکان تبریز

عظیم رضامند<sup>۱</sup>، سعید اصلان آبادی<sup>۲</sup>، سرور حقی<sup>۳</sup>، محمد امین رضازاده ساعتلو<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup>گروه هماتولوژی اطفال، بیمارستان کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۲</sup>گروه جراحی کودکان، بیمارستان کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۳</sup>پزشک عمومی  
<sup>۴</sup>دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۲/۱۱/۲۷ پذیرش: ۹۳/۱/۲۸

## چکیده

**زمینه و اهداف:** نوروبلاستوم شایعترین تومور توپر بدخیم دوران کودکی و شیرخواری بعد از بدخیمی های CNS می باشد. حدود ۷٪ بدخیمی های کودکان را شامل می شود ولی برخلاف سایر بدخیمی ها مرگ و میر بالاتری نسبت به کل بدخیمی ها دارد. از دیرباز MYCN gene Amplification یکی از فاکتورهای مهم در پیش بینی پروگنوز و پاسخ به درمان بوده است. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ۶ ساله MYCN gene Amplification نوروبلاستوم در مرکز آموزشی درمانی کودکان تبریز می باشد.

**مواد و روش ها:** تعداد ۴۰ بیمار با تشخیص نوروبلاستوم که در سالهای ۱۳۸۵ تا ۱۳۹۰ در مرکز آموزشی درمانی کودکان تبریز بستری و درمان شده اند تحت بررسی قرار گرفتند. داده های لازم از اطلاعات موجود در پرونده بیماران شامل سن، جنس، کانون اولیه، mycn gene amplification و stage بیماری در موقع مراجعه که بطور دقیق ثبت شده اند، استخراج شد و فرم جمع آوری اطلاعات تکمیل گردید. تعداد نسخه های mycn به روش PCR اندازه گیری شده بود که تعداد نسخه های بالاتر از ۳، مثبت تلقی شد. داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در این مطالعه مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار تلقی شد.

**یافته ها:** میزان مرگ و میر در بین بیماران با MYCN مثبت بیشتر از موارد MYCN منفی می باشد ( $p < 0/05$ ). میزان MYCN Gene Amplification در بین جمعیت مورد مطالعه برابر با ۷۰٪ بوده که نسبت به جمعیت جهانی (۲۰-۳۰٪)، فراوانی آن بیش تر است. فراوانی نوروبلاستوم ۵۰٪ قبل از دو سالگی و ۵۰٪ بعد از دو سالگی بوده و در بین جنس دختر و پسر برابر است.

**نتیجه گیری:** بیماران با آمپلیفیکیشن در ژن MYCN، در زمان تشخیص در Stage های بالاتری می باشند. همچنین مرگ و میر در این بیماران نسبت به بیماران بدون آمپلیفیکیشن در ژن MYCN به طور معنی داری بالاست.

**کلید واژه ها:** نوروبلاستوم، پروگنوز، MYCN GENE AMPLIFICATION

\* ایمیل نویسنده رابط: dr\_amin\_re@yahoo.com

## مقدمه

بدخیمی های کودکان را شامل می شود ولی برخلاف سایر بدخیمی ها مرگ و میر بالاتری نسبت به کل بدخیمی ها دارد (۱۵٪)

نوروبلاستوم شایعترین تومور توپر بدخیم دوران کودکی و شیرخواری بعد از بدخیمی های CNS می باشد. حدود ۷٪

معیار ورود به مطالعه سن کمتر از ۱۴ سال همراه با ابتلا به نوروبلاستوم و معیار خروج از مطالعه سن بیشتر از ۱۴ سال یا وجود هر بیماری زمینه ای دیگر و نیز عدم تکمیل دوره درمان بود. این مطالعه کلیه بیماران با تشخیص نوروبلاستوم که در سالهای ۱۳۸۵ لغایت ۱۳۹۰ در مرکز آموزشی درمانی کودکان تبریز بستری و تحت درمان قرار گرفته‌اند را شامل می‌شود. داده‌های لازم براساس اطلاعات موجود در پرونده بیماران براساس سن، جنس، کانون اولیه، stage بیماری موقع مراجعه و آزمایش مربوط به MYCN gene Amplification می‌باشد که بطور دقیق ثبت شده-اند، استخراج شد و فرم جمع آوری اطلاعات تکمیل گردید. تعداد نسخه‌های MYCN با استفاده از روش PCR و شناسایی شیمیایی SYBR Green I و TaqMan اندازه گیری شد و نسخه-های بالاتر از ۳ مثبت تلقی شد.

در این مطالعه اقدامی روی بیماران انجام نپذیرفت و تمامی موارد اخلاقی مربوط به استفاده از اسناد و مدارک پزشکی رعایت شده و اطلاعات بیماران محرمانه می‌باشد. داده‌های بدست آمده از مطالعه بوسیله روشهای آماری توصیفی (فراوانی - درصد و میانگین  $\pm$  انحراف معیار) و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در این مطالعه جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون تفاوت میانگین برای گروههای مستقل و جهت بررسی ارتباط بین متغیرهای کیفی از آزمون رابطه مجذور کای یا آزمون دقیق فیشر Fishers Exact Test استفاده شد. در این مطالعه مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار تلقی شد.

### یافته‌ها

در ۴۰ بیمار بررسی شده، ۵۰٪ بیماران در سنین قبل از ۲ سالگی و ۵۰٪ در سنین بعد از ۲ سالگی تشخیص داده شده بودند. فراوانی بیماری در پسران و دخترها برابر بود (هر کدام ۵۰٪). در زمان تشخیص بیماری، ۷/۵٪ بیماران در Stage I، ۲۲/۵٪ در Stage II، ۱۲/۵٪ در Stage III و ۵۷/۵٪ در Stage IV قرار داشتند. درگیری CNS در ۲۰٪ بیماران وجود داشت که در این بین همگی فوت نموده‌اند. از نظر MYCN Amplification در ۲۸ بیمار (۷۰٪ بیماران) مثبت بود که ۱۵ بیمار پسر و ۱۳ دختر بودند. کانون اولیهی نوروبلاستوم ۷۵٪ از آدرنال، ۱۰٪ از مדיاستن خلفی، ۷/۵٪ از پاراورتبرال کمری، ۵٪ از کلیه و ۲/۵٪ از ساکروم منشا گرفته بود.

از نظر پاتولوژی برای ۷۰٪ بیماران نوروبلاستوم و برای ۳۰٪ از آن‌ها گانگلیونوروبلاستوم گزارش شده بود. به طور کلی ۵۵٪ (۲۲ مورد) از بیماران قطع درمان شده و ۴۵٪ فوت کرده‌اند (تا سال ۱۳۹۲).

۶۰٪ از بیماران در زمان تشخیص متاستاز به دوردست داشته‌اند. از بین بیماران با MYCN Amplification مثبت، ۱۴ بیمار از مجموع ۲۸ بیمار، فوت کرده بودند (۵۰٪). این در حالی است که

مرگ و میر بدخیمی‌ها). شایعترین بدخیمی دوره نوزادی که شیوع ۱ مورد در هر ۷۰۰۰ تولد زنده را شامل می‌شود. این بدخیمی در اتوپسی شیرخواران در مقایسه با شیوع آن در کودکان بیشتر مشاهده می‌شود که دلالت بر پسرقت خودبخودی بیماری و یا تمایز و تبدیل به سلول بالغ عصبی دارد که بعد از تولد به وجود می‌آید (۱). بیماری از سلولهای اولیه ستیغ عصبی که باعث تمایز فوق کلیه و شبکه عصبی سمپاتیک می‌شود (۲)، منشاء گرفته و گسترش می‌یابد. علت ایجاد بیماری مشخص نمی‌باشد و تا کنون علل محیطی گزارش نشده است (۳). بررسی ژنتیکی و مولکولی بیماری کمک زیادی در پیش آگهی بیماری داشته و پیش آگهی بد MYCN Amplification ژن Mycn در روی کروموزوم ۲ به اثبات رسیده است (۴). جامعه International neuroblastoma staging system نیاز مبرم دارد تا با یک تشخیص پاتولوژیک و الگویی قطعی، از نظر پیش آگهی انواع تومورهای نوروبلاستوم را طبقه بندی کند. مهمترین فاکتور پیش آگهی کننده تعداد کپی ژن MYCN محسوب می‌شود. MYCN gene Amplification از ۳ تا ۳۰۰ برابر به ازای ژنوم هاپلوئید (با انواع روش‌های محاسبه ی بیان ژن نظیر FISH و واکنش زنجیره ای پلی مراز کمی در سلول‌های بدخیم، مشخص شده است (۲-۵). این شاخص صرف نظر از مرحله بیماری و سن بیمار، ارتباط کاملاً مستقیمی با پیشرفت سریع بیماری و پیش آگهی ضعیف آن دارد (۳). به طوری که میتواند مهمترین شاخص تصمیم گیری در بالین بیمار و طبقه بندی درمانی محسوب شود (۴).

مقالات متعددی در مورد پیش آگهی و شیوع MYCN gene Amplification در نقاط مختلف دنیا وجود دارد. در گزارش Rochelle و همکاران بقای بیماران در Stage 1,2 با MYCN gene Amplification مثبت کمتر از مورد منفی می‌باشد (۵).

PF Ambros و همکاران در بررسی بیماران در آمریکا، مهمترین فاکتور پیش آگهی را MYCN gene Amplification معرفی می‌کنند (۶). همچنین Adela Conte در ژورنال کلینیکال انکولوژی پیش آگهی بد برای شیرخواران با تکثیر مثبت ژنی را گزارش نموده است (۷).

از آنجائیکه مرکز آموزشی و درمانی کودکان تبریز مهم ترین مرکز درمانی کودکان در شمال غرب کشور بوده و مرکز ارجاع بیماران از شهرهای اطراف و حتی استانهای مجاور می‌باشد و اکثر این بیماران پس از تشخیص در این مرکز بستری و تحت درمان قرار می‌گیرند و مرگ و میر این بیماری افزایش داشته، لذا ما در این طرح به صورت جامع فراوانی و مراحل این بیماری را مورد بررسی و تحلیل قرار می‌دهیم و امید است بتوانیم از نتایج این بررسی اطلاعات کاملی از این بیماری را در این منطقه داشته باشیم.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی ۴۰ بیمار زیر ۱۴ سال که در فاصله سالهای ۱۳۸۵ تا ۱۳۹۰ (به مدت ۵ سال) در مرکز آموزشی درمانی کودکان تبریز با تشخیص نوروبلاستوم بستری و تحت درمان قرار گرفته‌اند به عنوان جامعه مورد مطالعه انتخاب شدند.

۴ بیمار از مجموع ۱۲ بیمار با MYCN Amplification منفی فوت کرده بودند (۳۳٪).

همچنین از بین بیماران فوت شده، ۱۴ بیمار از مجموع ۱۸ بیمار، MYCN Amplification مثبت داشته اند.

فراوانی نسبی بیماران با mycn amplification مثبت در Stage I ۳۳٪، در Stage II ۵۵/۵٪، در Stage III ۸۰٪ و در Stage IV ۷۸٪ می باشد.

فراوانی نسبی mycn Amplification در بیماران زیر ۶ ماه ۳۳٪، در بیماران یک ساله ۵۰٪، در بیماران ۱۸ ماهه ۷۵٪، در بیماران ۲ ساله ۸۰٪ و در بیماران بالای ۲ ساله ۷۵٪ می باشد.

## بحث

نوروبلاستوم شایعترین تومور توپر بدخیم دوران کودکی و شیرخواری بعد از بدخیمی های CNS می باشد که حدود ۷٪ بدخیمی های کودکان را شامل می شود ولی برخلاف سایر بدخیمی ها مرگ و میر بالاتری نسبت به کل بدخیمی ها دارد (۱۵٪ مرگ و میر بدخیمی ها).

پروگنوز نوروبلاستوم به میزان زیادی به وسیله stage بیماری و سن بیمار هنگام تشخیص بیماری قابل پیش بینی می باشد. با این وجود یک سری تغییرات مولکولی در نوروبلاستوم مسئول تفاوت در نتیجه و پاسخ به درمان است که در دهه های گذشته شناسایی شده اند که در بین آنها MYCN Amplification معتبرترین فاکتور تعیین کننده پروگنوز و اولین مارکر ژنتیکی شناخته شده در اونکولوژی اطفال می باشد که در اتخاذ تصمیمات درمانی از آن بهره گرفته می شود (۱۰-۸).

مقالات متعددی در مورد پیش آگهی و شیوع MYCN gene Amplification در نقاط مختلف دنیا وجود دارد.

در مطالعه Matthay در سال ۱۹۹۷ که جهت بررسی ویژگیهای مولکولی و بیولوژیک نوروبلاستوم صورت گرفت ۶۰ درصد موارد بیماران در سنین کمتر از دو سال تشخیص داده می شدند و در ۹۷ درصد موارد در سن قبل از ده سالگی تشخیص داده شده بودند (۱۱). در مطالعه حاضر ۵۰ درصد بیماران قبل از دو سالگی و ۵۰ درصد مابقی بعد از دو تا ده سالگی تشخیص داده می شدند. در مورد علت اختلاف جزئی موجود می توان به عدم مراجعه سریع بیماران به پزشک اشاره کرد.

در مطالعه Valentijn و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی بیماران نوروبلاستومی مشخص شد که در ۲۰ درصد موارد نوروبلاستوم MYCN ژن amplication مثبت بوده و این موارد با پروگنوز پایینی همراه بودند (۱۲). در مطالعه حاضر، ۷۰٪ از بیماران مورد بررسی amplication در ژن مذکور را داشتند. در مورد علت آن، بیش تر مسائل ژنتیکی و نژادی می تواند مطرح باشد.

در مطالعه Brodeur و همکاران در سال ۱۹۸۴ انجام داده بودند، مشخص شده بود که آمپلیفیکیشن ژن mycn در بیماران نوروبلاستومی با stage های بالای بیماری همراه است. به طوری که هیچ کدام از ۱۵ بیمار با stage یک و دو آمپلیفیکیشن در این ژن را نداشتند. همچنین در بین stage های سه و چهار، از بین ۴۸ بیمار

در ۲۴ بیمار آمپلیفیکیشن در ژن mycn مثبت بود (۱۳). در بررسی های انجام شده در این مطالعه، از بین بیماران با stage یک و دو از بین مجموع ۱۲ بیمار، در ۶ بیمار (۵۰ درصد) آمپلیفیکیشن در ژن مثبت بود که این مقدار در مورد stage های سه و چهار ۲۲ مورد مثبت در بین ۲۸ بیمار می باشد (۷۸ درصد). ملاحظه می شود که با بالا رفتن Stage بیماری میزان MYCN gene Amplification نیز افزایش می یابد.

در مطالعه Chan و همکاران در سال ۱۹۹۷ بر روی بیماران با Stage IV نوروبلاستوم عنوان شد که نیمی از این بیماران علی رغم منفی بودن در mycn amplification پروگنوز چندان خوبی ندارند. به طوری که ۳۹٪ این بیماران دچار عود شدند (۱۴). این رقم در مورد مطالعه حاضر، ۳۳٪ می باشد. علت آن این است که MYCN تنها عامل دخیل در پروگنوز و پاسخ به درمان نمی تواند باشد.

در مطالعه ای که Robert و همکاران انجام دادند میزان بهبودی از بیماری برای همه بیمارانی که تحت درمان قرار گرفته بودند ۳۶/۷٪ بود و این میزان برای کودکان کمتر از یک سال ۵۶٪ گزارش شد (۱۵). در مطالعه حاضر میزان بهبودی در کل بیماران برابر با ۵۵٪ بوده و در موارد زیر یکسال ۱۰۰٪ می باشد. در مورد علت اصلی آن می توان به تفاوت های ژنتیکی بین نژادی اشاره کرد. همچنین مهارت پزشک معالج، تاثیر کادر درمان در آموزش و امیدواری والدین به پروگنوز بیماری و توضیح امکان Cure از دیگر عواملی است که باعث درمان به موقع و منظم در بیماران می شود.

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ توسط دکتر Poopak و همکاران بر روی بیماران نوروبلاستومی انجام گرفت، میانگین سنی این بیماران ۴/۱ سال عنوان شد. در این مطالعه ۷۵ بیمار شامل، ۴۳ پسر و ۳۲ دختر با میانگین سنی ۴/۱ سال (۱۲۴-۱/۵ ماه) با تشخیص پاتولوژی نوروبلاستوما از نظر تکثیر ژنومی MYCN بررسی شدند که ۴۷٪ بیماران تکثیر این ژن را داشتند (۱۶). در مطالعه حاضر، میانگین سنی بیماران مورد مطالعه ۲/۸۶ بود که از میان آنها ۷۰٪ بیماران تکثیر ژنومی ژن مذکور را داشتند. همانطور که قبلا توضیح داده شد علت ژنتیکی و نژادی مسئول این اختلاف فاحش می باشد. در مطالعه ای دیگر توسط Chan و Gallie نشان داد، که بیان بیش از حد پروتئین MYCN بدون Amplification در ژن مربوطه با علائم پیشرفت نوروبلاستوم سازگار است (۱۴). در مطالعه حاضر نیز مرگ و میر بیش تر و Stage های بالاتر در بیماران با MYCN gene Amplification مثبت نسبت به موارد منفی را شاهد بودیم.

در مطالعه ای که Hale و همکارانش در بین سال های ۱۹۷۵ تا ۱۹۹۲ بر روی ۱۳۶ کودک مبتلا به نوروبلاستوم انجام دادند، نسبت ابتلا ی پسران به دختران ۱/۳ در مقابل ۱ بود (۱۷). بر خلاف مطالعه مذکور، در مطالعه ی حاضر فراوانی نوروبلاستوم ارتباط معنی داری با جنسیت ندارد و در هر دو جنس یکسان و برابر بوده است. در تحقیقات Spix و همکارانش که بر روی موارد نوروبلاستوم در اروپا صورت گرفته است، Survival ۵ ساله بیماری به طور متوسط ۳۳٪ تخمین زده شده است. البته این میزان در کشورهای مختلف اروپایی اختلاف چشمگیری داشته است به

همچنین مثبت بودن MYCN gene amplification با Stage های بالای بیماری همراه است به طوری که از بین بیماران با Stage IV، ۷۸٪ آن ها از نوع MYCN gene Amplification مثبت می باشند ( $p < 0/05$ ).

تشخیص در سن پایین تر بیماری با Stage های پایین همراه بوده و می تواند با پاسخ به درمان بهتری همراه باشد. به طوری که out come بیماری در آن تعداد از بیماران که قبل از ۲ سالگی تشخیص داده شده بودند در مقایسه با آن تعداد از بیماران که بعد از ۲ سالگی تشخیص داده شده بودند، بهتر است.

کانون اولیه نوروبلاستوم در جمعیت مطالعه شده، مشابه جمعیت جهانی بوده و شایع ترین محل، آدرنال می باشد.

درگیری سیستم عصبی مرکزی، با پروگنوز بسیار پایین همراه است به گونه ای که همه بیمارانی که درگیری CNS داشتند، فوت نمودند.

اظهار نظر در مورد میزان Cure در مطالعه انجام شده، نیازمند follow up بیماران به مدت ۲ سال دیگر می باشد چون بیمارانی که در سال های ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۰ تشخیص داده شده اند، نمی توان برای آنها Survival ۵ ساله محاسبه کرد.

گونه ای که در کشورهایی چون اسکاتلند، ولز و انگلستان میزان بقای ۵ ساله حدود ۲۸٪ و در کشورهایی چون فرانسه، آلمان و ایتالیا (۴۸ تا ۶۶٪) گزارش شده است (۱۸). اظهار نظر در مورد میزان Cure در مطالعه حاضر، نیازمند follow up بیماران به مدت ۲ سال دیگر می باشد چون بیمارانی که در سال های ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۰ تشخیص داده شده اند، نمی توان برای آنها Survival ۵ ساله محاسبه کرد.

## نتیجه گیری

فراوانی نوروبلاستوم در جمعیت مورد مطالعه ارتباط معنی داری با جنسیت ندارد و در بین دخترها و پسرها مساوی می باشد.

میزان مرگ و میر در بین بیماران با MYCN gene amplification مثبت بیشتر از موارد MYCN gene amplification منفی می باشد ( $p < 0/05$ ).

میزان MYCN Gene Amplification در بین جمعیت مورد مطالعه برابر با ۷۰٪ بوده که نسبت به جمعیت جهانی (۲۰-۳۰٪)، فراوانی آن بیش تر است.

## References

- Philip A, David G. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 15<sup>th</sup> ed. Philadelphia, USA, Williams & Wilkins, 2009; PP: 932-961.
- Philip Ianzkow sky. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. 15<sup>th</sup> ed. New York, USA, Elsevier, 2011, PP: 671-692.
- Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB. *Nelson Textbook pediatrics*, 18<sup>th</sup> ed. New York USA, Saunders, 2008; PP: 2097-2111.
- Oude Luttikhuis M.E, Iyer V.K, Dyer S, Ramani P, McConville C.M. Detection of MYCN Amplification in Neuroblastoma using Competitive PCR Quantitation. *Laboratory Investication* 2008; **80**(2): 271-273.
- Bagatell R, Beck-Popovic M, London W.B, Zhang Y, Pearson A.D, Matthay K.K, et.al. Significance of MYCN Amplification in International Neuroblastoma Staging System Stage 1 and 2 neuroblastoma. *Jurnal of Clinical Oncology* 2009; **27**(3): 365-371.
- Ambros P.F, Ambros I.M, Brodeur G.M, Haber M, Khan J, Nakagawara A, et.al. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics. *British Journal of Cancer* 2009; **100**(9): 1471-1482.
- Canete A, Gerrard M, Rubie H, Castel V, Di Cataldo A, Munzer C, et.al. Poor survival for infants with MYCN amplification metastatic neuroblastoma Despite Intesnsified Treatment. *Journal of Clinical Oncology* 2009; **27**(7): 1014-1019.
- Perel Y, Valteau-Couanet D, Michon J, Lavrand F, Coze C, Bergeron A, et.al. Prognosis of neuroblastoma in childhood. Methods of assessment and clinical use. *Archives De Pediatrie* 2004; **11**(7): 834-842.
- Theissen J, Boensch M, Spitz R, Betts D, Stegmaier S, Christiansen H, et.al. Heterogeneity of the MYCN oncogene in neuroblastoma. *Clinical Cancer Research* 2009; **15**(6): 2085-2090.
- Woods W.G, Gao R.N, Shuster J.J, Robison L.L, Bernstein M, Weitzman S, et.al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *New England Journal of Medicine* 2002; **346**(14): 1041-1046.
- Chan H.S, Gallie B.L, DeBoer G, Haddad G, Ikegaki N, Dimitroulakos K, et.al. MYCN protein expression as a predictor of neuroblastoma prognosis. *Clinical Cancer Research* 1997; **3**(10): 1699-1706.
- Valentijn L.J, Koster J, Haneveld F, Aissa R.A, Van S.P, Broekmans S, et.al. Functional MYCN signature predicts outcome of neuroblastoma irrespective of MYCN amplification. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2012; **109**(47): 19190-19195.
- Brodeur G.M, Seeger R.C, Schwab M, Varmus H.E, Bishop J.M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; **224**(4653): 1121-1124.
- Matthay K.K. Neuroblastoma: biology and therapy. *Oncology (Williston.Park)* 1997; **11**(12): 1857-1866.
- GROSS R.E, FARBER S, MARTIN L.W. Neuroblastoma sympatheticum; a study and report of 217 cases. *Pediatrics* 1959; **23**(6): 1179-1191.
- Poopak B, Arzanian M, Vosough P, Gharib A. Evaluation of MYCN amplification in Iranian patients with neuroblastoma by conventional and real time PCR. *Iau-Tmu* 2011; **21**(3): 188-195.

17. Hale G, Gula M.J, Blatt J. Impact of gender on the natural history of neuroblastoma. *Pediatr Hematol Oncol* 1994; **11**(1): 91-97.

18. Spix C, Aareleid T, Stiller C, Magnani C, Kaatsch P, Michaelis J. Survival of children with neuroblastoma. time trends and regional differences in Europe, 1978-1992. *Eur J Cancer* 2001; **37**(6): 722-729.