

На правах рукописи

Андреева Наталья Александровна

**Молекулярно-генетические основы клинической гетерогенности  
нейробластомы**

3.1.6 – Онкология, лучевая терапия

3.1.21 – Педиатрия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Москва - 2023

Работа выполнена в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Друй Александр Евгеньевич – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Качанов Денис Юрьевич – доктор медицинских наук, заведующий отделением клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Официальные оппоненты:

**Белогурова Маргарита Борисовна** – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой онкологии, детской онкологии и лучевой терапии Санкт-Петербургского государственного педиатрического университета, заведующая отделением химиотерапии (противоопухолевой лекарственной терапии) и комбинированного лечения опухолей у детей ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) имени Н.П. Напалкова» Минздрава России.

**Шароев Тимур Ахмедович** – доктор медицинских наук, профессор, руководитель научного отдела ГБУЗ города Москвы «Научно-практический центр специализированной медицинской помощи детям имени В.Ф. Войно-Ясенецкого Департамента здравоохранения города Москвы».

**Ведущая организация** – НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ

Защита состоится « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023г в « \_\_\_ » часов на заседании диссертационного совета 21.1.025.01 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (117997, Москва, ул. Саморы Машела, д.1) и на сайте <http://www.fnkc.ru>

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук.

Жуков Н.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Опухоли симпатической нервной системы (СНС) – эмбриональные опухоли, происходящие из незрелых клеток-предшественников симпатических ганглиев и хромаффинной ткани надпочечников (R.P. Bolande, 1974). Спектр злокачественных опухолей СНС представлен главным образом нейробластомой (НБ), реже встречается ганглионейробластома (ГНБ). К доброкачественным опухолям СНС относят ганглионейрому (ГН).

Большинство периферических нейрогенных опухолей развивается спорадически, однако в 1-2% случаев имеются указания на развитие заболевания в контексте синдромов предрасположенности к опухоли (СПО) (E.K. Barr et al., 2018). Высокая частота встречаемости герминальных вариантов в генах *ALK* (70%) и *PHOX2B* (20%) при семейных случаях НБ стала предпосылкой определения их онкогенной роли в патогенезе спорадических случаев, а также мультифокальных форм заболевания (F. Bourdeaut et al., 2005) (F. Bourdeaut et al., 2012). При этом мультифокальные и наследственные случаи НБ в общей когорте пациентов встречаются крайне редко и составляют не более 5% (M.D. Cohn et al., 1993). Кроме того, молекулярно-генетические изменения, часто выявляемые в указанной когорте пациентов, не экстраполируются в полном объеме на спорадические случаи НБ.

Спорадические случаи НБ по своему биологическому поведению значительно различаются между собой, характеризуясь абсолютно полярным прогнозом в различных клинических группах. Так, метастатическая форма НБ в зависимости от возраста пациента, локализации метастазов и статуса гена *MYCN* может характеризоваться как благоприятным прогнозом, так и крайне агрессивным течением. Благоприятный прогноз при стадии НБ 4S объясняется феноменом спонтанной или индуцированной (применением низкоинтенсивной химиотерапии) регрессии. Так как активация механизмов регрессии или созревания НБ является привлекательным инструментом для терапии пациентов, проводятся исследования молекулярно-генетических основ, лежащих в основе данного процесса. Обсуждаются возможные механизмы индукции регрессии опухоли, такие как потеря активности теломеразы, снижение уровня нейротрофинов, изменения эпигенетической регуляции экспрессии генов, участие факторов гуморального и клеточного иммунитета (G.M. Brodeur et al., 2018). Однако однозначного понимания механизмов инициации регрессии НБ нет, что подчеркивает сложную (эпи)генетическую регуляцию процессов пролиферации и дифференцировки нейробластов.

Одним из генетических маркеров крайне неблагоприятного прогноза при НБ является амплификация гена *MYCN*, идентифицированная в 1983 г. (G.M. Brodeur et al., 1984). В большинстве случаев опухоли с амплификацией *MYCN* имеют метастатическое распространение на момент первичной диагностики, однако данную aberrацию можно встретить и при локализованных формах опухоли (R. Vagatell et al., 2009). Однако, только в половине случаев неблагоприятной НБ агрессивное клиническое течение опухоли может быть объяснено наличием амплификации *MYCN*. Также неблагоприятное прогностическое значение имеют делеция хромосомного локуса 1p36 и некоторые другие хромосомные aberrации (E.F. Attiyeh et al., 2005; R.J. Komotar et al., 2008).

Указанная клиническая гетерогенность является основой риск-адаптированной стратегии лечения, сформированной на выделении ряда прогностических факторов, таких

как возраст, локализация опухоли, распространенность заболевания, цитогенетические маркеры (амплификация *MYCN*, делеция 1p), позволяя выделить группы пациентов, характеризующихся различным прогнозом. Несмотря на риск-адаптированный подход к терапии, трехлетняя общая выживаемость пациентов группы высокого риска не превышает 50% (F. Berthold et al., 2020) (M. Irwin et al., 2021), тогда как у пациентов группы низкого риска достигает 100% без применения цитотоксической терапии или с ее минимальным использованием (H.J. Meany, 2019). Тем не менее, среди пациентов группы высокого риска можно выделить тех, которые имеют НБ, чувствительную к проводимой терапии, и, в результате, достигают полного выздоровления, и больных с персистирующей НБ, склонной к прогрессии заболевания или рецидивирующему течению, а также с инициально рефрактерной опухолью. Для понимания различий в клиническом течении опухоли внутри конвенциональных групп риска, было проведено множество генетических исследований, но ни в одном из них не удалось выделить значимые прогностические факторы, не уступающие значимости амплификации *MYCN* и механизмам поддержания длины теломер. В ряде работ было показано негативное прогностическое влияние генетических факторов, таких, как различные сегментарные хромосомные аномалии: увеличение числа копий 1q, 12q и 17q, делеции 3p, 4p, 14q, 16p, 19q; генетические aberrации различных генов: *ALK*, *PHOX2B*, *PTPN11*, *ATRX*, *LIN28b*, *ARID1*, *ARID2*, *TP53*, *MDM2*, *TERT*, *BARD1*, *CHEK2*, *LMO1*, *LINC00340*, *PINK1*, эпигенетические факторы, включающие aberrантное метилирование генов *CASP8*, *DCR2*, *HIN1*, *HIST1H3C*, *PRPH*, *ACSS3*, нарушение экспрессии микроРНК и других некодирующих РНК, а также микроокружение опухоли (A.A. Ahmed et al., 2017) (L. Borriello et al., 2016).

Следует отметить, что в клетках НБ количество соматических мутаций, относительно высокое по сравнению с другими эмбриональными опухолями, однако крайне разнообразен спектр генов, в которых выявляются клинически-значимые генетические варианты (T.J. Pugh et al., 2013). В то же время, не все выявляемые aberrации являются патогенетически значимыми. Встречающиеся в большинстве случаев семейной формы НБ мутации в «горячих точках» гена *ALK* в спорадических случаях выявляются намного реже (7–10%) (V.P. Tolbert et al., 2017). Однако было показано, что частота выявления мутаций в гене *ALK* выше у пациентов группы высокого риска, а также у пациентов с рефрактерным течением и рецидивом или прогрессией заболевания (14–20%) (T.F. Eleveld, et al. 2015). Прогноз у пациентов с НБ с мутациями в гене *ALK* хуже, однако потенциально может быть улучшен при проведении молекулярно-направленной терапии (S.C. Bresler et al., 2014) и является одним из способов интенсификации терапии таких пациентов.

Результаты высокопроизводительного секвенирования первичных образцов НБ позволили обнаружить негативное влияние активации теломеразной активности в сочетании с aberrациями в компонентах сигнальных путей RAS-RAF-МЕК и p53 на прогноз НБ (S. Askermann et al. 2018). Если в дебюте заболевания активация сигнального пути RAS-RAF-МЕК встречалась лишь в 28%, то при развитии рецидива или прогрессии НБ она обнаруживалась у 78% пациентов (T.F. Eleveld, et al. 2015). Также показано, что в рецидиве могут появляться новые генетические aberrации, которые не обнаруживались в дебюте заболевания, в том числе, в генах, кодирующих компоненты сигнального каскада RAS-RAF-МЕК (M. Chicard et al., 2018). В рецидиве заболевания показана редукция опухолевой субклональности с параллельным повышением мутационной нагрузки. Такого рода гетерогенность можно объяснить инициальной поликлональностью опухоли и

существованием временной и пространственной гетерогенности, что затрудняет определение драйверных молекулярно-генетических событий при спорадической НБ.

Одной из актуальных задач изучения НБ является не только выделение прогностически значимых маркеров для более точной стратификации на группы риска, но и поиск возможностей для интенсификации терапии, в первую очередь, за счет выявления мишеней для молекулярно-направленной терапии. Основываясь на клинических данных и ретроспективной оценке прогноза и выживаемости пациентов группы высокого риска, можно выделить подгруппу, в которой прогноз оказывается наихудшим с 5-летней бессобытийной выживаемостью менее 10% и развитием прогрессии заболевания на фоне терапии первой линии, либо сразу же после окончания интенсивной фазы лечения (S.V. Whittle et al., 2017). Наличие данного факта требует выработки критериев и поиска маркеров для стратификации пациентов в группу очень высокого риска и разработки новых подходов к терапии.

Таким образом, изучение молекулярно-генетических особенностей НБ является крайне актуальной задачей, как для понимания биологии опухоли, так и для проведения персонализированной терапии в целях улучшения выживаемости и качества жизни пациентов. В отечественной литературе генетические характеристики нейроblastомы ограничены изучением наиболее распространенных сегментарных нарушений на небольшой когорте пациентов. В мировой литературе, в связи с гетерогенностью анализируемых групп пациентов, а также с использованием различных методов анализа, полученные результаты не позволяют выделить однозначные маркеры прецизионного прогнозирования течения заболевания, а также выбрать эффективную терапевтическую тактику для различных групп НБ.

### **Степень разработанности темы диссертации**

В настоящее время общепринятым является разделение пациентов с НБ на три группы риска на основании стадии заболевания, наличия неблагоприятных цитогенетических маркеров (амплификация гена *MYCN* и/или делеция 1p, делеция 11q) и возраста пациента. Несмотря на проведение риск-адаптированной терапии, у значительной части пациентов группы высокого риска и отдельных больных групп наблюдения и промежуточного риска отмечается развитие неблагоприятных событий в виде прогрессии и рецидива опухоли. Существующие на данный момент модели стратификации не позволяют однозначно спрогнозировать развитие неблагоприятного события у пациента, отнесенного в ту или иную группу риска.

Пациенты группы высокого риска характеризуются неблагоприятным прогнозом, несмотря на применение мультимодальной терапии. Неудачи лечения связаны как с первичной резистентностью опухоли, определяемой в 20% случаев, так и с возможностью развития рецидива/прогрессии заболевания у пациентов, достигших объективного, в том числе и полного ответа на терапию. Патогенетические механизмы, лежащие в основе развития резистентности опухолевых клеток до конца не известны. Описана роль недифференцированных мезенхимальных клеток в развитии химиорезистентной опухоли (M. Gautier et al., 2021) (E.M. Westerhout et al., 2022), вероятно, связанной с эпигенетическими механизмами регуляции экспрессии генов. Наиболее изученными молекулярно-генетическими факторами, оказывающими влияние на прогноз у пациентов с НБ, являются абберрации в компонентах путей RAS-RAF-МЕК и p53, и/или репликативная

иммортализация клеток опухоли за счет теломеразной активности или альтернативного механизма удлинения теломер (S. Ackermann et al., 2018) (X.-F. Duan et al., 2018).

Интенсификация терапии на основании выявления молекулярных мишеней как в первичной опухоли, так и в ткани опухоли в момент констатации рецидива/прогрессии заболевания, представляется чрезвычайно актуальной. Выявленные патогенетические драйверы, лежащие в основе различного клинического поведения НБ, в будущем могут стать идеальными терапевтическими мишенями, позволяющими индуцировать дифференцировку опухолевых клеток и подавить пролиферативный и метастатический потенциал. Единственной валидированной мишенью для молекулярно-направленной терапии НБ на данный момент являются активирующие аберрации в гене киназы анапластической лимфомы – *ALK*, определяющие возможность терапевтического воздействия соответствующими ингибиторами (S.C. Bresler et al., 2014). В настоящее время ведутся клинические испытания применения таргетной терапии, как одной из стратегий интенсификации противоопухолевого лечения у больных с неблагоприятным прогнозом.

### **Цель исследования**

Идентифицировать молекулярно-генетические факторы, лежащие в основе клинической гетерогенности НБ, и изучить возможность клинического применения для оптимизации терапии и определения прогноза.

### **Задачи исследования**

1. Определить характер генетических изменений при семейных и наследственных формах НБ.
2. Изучить клинические и молекулярно-генетические характеристики мультифокальной НБ.
3. Провести сравнение молекулярно-генетического профиля опухоли в дебюте и в рецидиве заболевания у пациентов, относящихся к различным группам риска.
4. Определить молекулярно-генетические факторы, влияющие на прогноз у пациентов с неблагоприятным течением НБ.
5. Изучить частоту выявления мишеней для молекулярно-направленной терапии у пациентов с НБ различных групп риска.
6. Изучить молекулярно-генетический профиль опухоли у пациентов с первично-рефрактерным течением НБ.

### **Научная новизна**

В настоящей диссертационной работе впервые в рамках одного исследования представлены результаты анализа молекулярно-генетических характеристик клинических групп НБ, представляющих наибольший практический интерес, а именно, случаи НБ с отягощенным семейным анамнезом, мультифокальные опухоли, НБ группы высокого риска, рецидивы НБ. Проведен анализ генетических факторов, предрасполагающих к развитию семейных и наследственных форм НБ. Изучен характер изменений генетического профиля при развитии рецидива или прогрессии заболевания, что позволило установить значительную временную генетическую вариативность и обосновать значимость исследования материала в рецидиве опухоли для принятия терапевтических решений. Проведенный анализ молекулярно-генетических факторов в группе высокого риска позволил выделить молекулярные факторы, которые могут рассматриваться как мишень

для назначения молекулярно-направленной терапии. Показано, что одним из механизмов резистентности к проводимой терапии могут являться герминальные и соматические патогенные варианты в гене *NFI*.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты исследования продемонстрировали важность выявления и молекулярно-генетической верификации СПО среди пациентов с НБ. В том числе была показана возможность выявления герминальных генетических вариантов (и последующая диагностика СПО), впервые обнаруживаемых при секвенировании ДНК, выделенной из ткани опухоли. Выделены неблагоприятные молекулярно-генетические маркеры для пациентов с НБ групп наблюдения и промежуточного риска. Продемонстрирована клиническая важность временных изменений молекулярного портрета опухоли и необходимость проведения молекулярно-генетических исследований на ткани опухоли, полученной в различные фазы течения заболевания. Определены потенциальные мишени для молекулярно-направленной терапии пациентов с НБ группы высокого риска, рецидивом/прогрессией и рефрактерным течением заболевания и продемонстрирована выполнимость данной терапии в том числе в сочетании со стандартными цитостатическими препаратами.

### **Методология и методы исследования**

Диссертационная работа выполнена на базе лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (генеральный директор – д.м.н., профессор Новичкова Г.А.). Исследование носит проспективно-ретроспективный характер. В соответствии с клиническими особенностями пациенты были разделены на четыре группы: пациенты с семейной или наследственной формой НБ, пациенты с мультифокальной формой заболевания, пациенты с потенциально неблагоприятным прогнозом и пациенты, у которых был доступен материал в дебюте заболевания и при развитии рецидива/прогрессии. Молекулярно-генетические исследования проведены методами: мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA), количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), высокопроизводительного секвенирования ДНК (NGS) и секвенирования по Сэнгеру.

Исследование разделено на три основные части: описание клинических особенностей течения заболевания, описание молекулярно-генетических характеристик опухоли и поиск взаимосвязи клинических и молекулярно-генетических факторов. Кроме того, проведено сравнение молекулярно-генетических маркеров, выявляемых в парных образцах, полученных от одного и того же пациента в дебюте заболевания и при развитии рецидива/прогрессии.

При выполнении исследования использованы общеклинические, инструментальные, морфологические и молекулярно-генетические методы исследования. Обработка результатов проведена при помощи методов математической статистики. Полученные результаты систематизированы и обсуждены в сравнении с литературными данными. Исходя из результатов исследования сформулированы выводы и практические рекомендации.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. НБ может развиваться в контексте значительного числа общих синдромов, предрасполагающих к опухолевым заболеваниям, в частности, таких как нейрофиброматоз I типа и синдромы с дефектами в генах репарации ДНК. Большая часть наследственных, семейных НБ имеют сложную генетическую основу, не укладывающуюся в классическую клиническую и молекулярно-генетическую картину СПО.

2. Мультифокальная НБ характеризуется преимущественно билатеральным поражением надпочечников и ассоциирована с ранним возрастом, благоприятным клиническим течением и рядом молекулярно-генетических особенностей.

3. Генетический профиль НБ на различных этапах течения заболевания подвергается значительным эволюционным изменениям с сохранением или приобретением неблагоприятных прогностических факторов.

4. Более 90% случаев агрессивной НБ, вне зависимости от конвенциональной группы риска, объясняются активацией канонического TERT-зависимого пути поддержания длины теломер за счет амплификации гена *MYCN* или гиперэкспрессии гена *TERT*, а также наличием aberrаций в генах, кодирующих компоненты сигнальных путей RAS/p53.

5. Высокопроизводительное секвенирование опухолевой ДНК позволяет выявлять маркеры чувствительности НБ к препаратам молекулярно-направленной терапии.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность полученных результатов обусловлена большой выборкой, включающей 202 пациента с верифицированным диагнозом НБ, использованием современных методик молекулярно-генетического анализа ткани опухоли, репрезентативностью полученных данных и корректным выбором методов статистического анализа данных в соответствии с решаемыми задачами.

Результаты работы апробированы на совместном заседании сотрудников отделений клинической онкологии, детской онкологии/гематологии, онкогематологии, гематологии/онкологии старшего возраста и нейроонкологии, лабораторий молекулярной онкологии и молекулярной биологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Результаты работы и ее основные положения доложены на следующих научно-практических конференциях: I, II, III объединенных конгрессах НОДГО и РОДО (Москва, 2020, 2021, 2022 гг.); XVI и XVII конференции с международным участием «Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Минск, 2021, 2022 гг.); 52 и 53 Международных конгрессах общества детских онкологов (SIOP, онлайн, 2020, 2021 гг.) и Международном конгрессе «Advances in Neuroblastoma Research meeting 2023» (ANR, Амстердам 2023 г.).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК по специальностям 3.1.6 – Онкология, лучевая терапия и 3.1.21 – Педиатрия.

### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 171 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов

работы, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка использованных сокращений и библиографического указателя, который включает 7 отечественных и 180 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 42 таблицами.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Набор пациентов и тактика ведения**

Данное исследование утверждено решением Ученого Совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России и одобрено Независимым этическим комитетом 15.09.2020. В исследование включены пациенты с установленным диагнозом НБ, ГНБ и ГН, получавшие терапию или консультативную помощь в «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» за период с января 2012 года по декабрь 2021 год. Всего за данный период зарегистрировано 1110 пациентов. Из них с диагнозом ганглионейрома – 86 (7,7%). В соответствии с поставленными задачами были отобраны пациенты с 2012 года в количестве 202 человек (18,2%), удовлетворяющие следующим критериям:

- пациенты с известным семейным анамнезом наличия нескольких случаев НБ в семье;
- пациенты с известными генетическими герминальными событиями / фенотипом, соответствующим синдромам предрасположенности к опухолевым заболеваниям;
- пациенты с доступными опухолевыми образцами в дебюте заболевания и при развитии рецидива или прогрессии;
- все пациенты группы высокого риска, рецидивом/прогрессией заболевания, рефрактерным течением (с 2019 года), получавшие терапию или консультативную помощь в условиях «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева», зарегистрированные в базе данных центра;
- обязательным критерием включения в исследование являлось наличие исчерпывающей клинической информации о пациенте, включая данные катамнестического наблюдения, и доступность гистологического материала для проведения молекулярно-генетических исследований.

Диагноз устанавливался на основании гистологического исследования (85%) ткани опухоли или метастатического очага или клинических данных при выявлении объемного образования в проекции надпочечника или параспинальных ганглиев на фоне повышения уровня нейрон-специфической энолазы и/или накопления опухолью  $^{123}\text{I}$ -метайодбензилгуанидина ( $^{123}\text{I}$ -МЙБГ) и/или поражения костного мозга (КМ) опухолевыми клетками.

Оценка распространенности опухолевого процесса проводилась в рамках международной системы стадирования НБ INSS (G.M. Brodeur et al., 1993), стратификация на группы риска и терапия осуществлялась в рамках протокола группы по изучению НБ GPOH NB-2004. Начиная с 2020 года в схему терапии пациентов группы высокого риска включалась иммунотерапия анти-GD2-специфическими антителами (динутуксимаб бета, накситамаб), а также таргетная терапия при выявлении молекулярно-генетического маркера чувствительности (предиктивного биомаркера).

К предиктивным генетическим вариантам относились аберрации, при которых таргетная терапия одобрена FDA (Food and Drug Administration of the US – Федеральная служба по надзору за продуктами питания и лекарственными препаратами США) для

онкологических заболеваний с соответствующими генетическими изменениями. К таковым относились все абберрации гена *ALK*, при которых применялись ALK-ингибиторы различных поколений с учетом данных о чувствительности клеток опухоли с определенной мутацией к препаратам. Также потенциально таргетируемыми мишенями были активирующие мутации в онкогенах сигнального пути RAS-RAF-МЕК (*BRAF*, *EGFR*, *MAPK*).

Противорецидивная терапия для пациентов группы наблюдения проводилась индивидуально с учетом полученной ранее терапии: с использованием курсов N4 (винкристин, доксорубицин, циклофосфамид) в отсутствие химиотерапии в 1 линии и применении терапии по протоколу NB-2004 по схеме для пациентов группы промежуточного или высокого риска (при проведении химиотерапии в 1 линии).

Для пациентов группы промежуточного и высокого риска противорецидивная терапия основывалась на литературных данных с применением следующих схем: иринотекан/темозоломид; топотекан/циклофосфамид; метрономная терапия (целекоксиб/циклофосфамид/винбластин/этопозид).

Пациентам, включенным в исследование, рекомендовалось проведение хирургического этапа либо во время констатации рецидива/прогрессии заболевания в объеме биопсии/циторедуктивной/радикальной операции, либо в более поздние сроки после сокращения размеров опухоли на фоне полихимиотерапии (ПХТ) в объеме циторедуктивной/радикальной операции. При достижении объективного ответа на противорецидивную терапию применялась иммунотерапия, лучевая и хирургическая терапия, повторная аутотрансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

### Общая характеристика пациентов

В исследование включено 202 пациента. Характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в Таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика пациентов, включенных в исследование

Фактор		N	%
Всего пациентов		202	100
Гистологический диагноз	НБ	179	88,5
	ГНБ	7	3,5
	ГН	1	0,5
	не установлен	15	7,5
Соотношение мальчики : девочки		1,35:1	
Возраст на момент постановки диагноза, Ме, мес. (разброс)		20 (0-402)	
Стадия по INSS	1	12	6,0
	2	19	9,4
	3	19	9,4
	4	116	<b>57,4</b>
	4S	35	17,3
	не установлена (для ГН)	1	0,5
Группа риска	наблюдения	75	37,1
	промежуточного	19	9,4
	высокого	107	<b>53,0</b>
	не установлена (для ГН)	1	0,5

Продолжение таблицы 1

Фактор		N	%
Амплификация MYCN	выявлена	44	21,8
	не выявлена	154	<b>76,2</b>
	не определена	4	2,0
Делеция 1p36	выявлена	41	20,3
	не выявлена	147	<b>72,8</b>
	не определена	14	6,9
Делеция 11q23	выявлена	25	12,4
	не выявлена	143	<b>70,8</b>
	не определена	34	16,8
Неблагоприятное событие	да	121	<b>59,9</b>
	нет	81	40,1
Развитие двух и более неблагоприятных событий	да	46	22,8
	нет	156	77,2
Летальный исход	да	34	16,8
	нет	168	83,2
Время наблюдения, Ме, мес. (разброс)		20 (0-186)	

Исследуемая когорта была селектирована, что объясняется задачами исследования. В когорте преобладали пациенты с 4 стадией заболевания по INSS (57,4%, n=116), а также пациенты группы высокого риска (53,0%, n=107). У большей части пациентов отмечалось развитие неблагоприятного события (59,9%, n=121), у 38% из них (46/121) – 2 и более неблагоприятных события. Медиана времени наблюдения составила 20 (разброс 0-186) месяцев.

Для достижения цели исследования и решения поставленных задач пациенты были разделены на несколько групп:

- 1) пациенты с семейными и наследственными формами заболевания;
- 2) пациенты с мультифокальным заболеванием;
- 3) пациенты с доступными парными образцами опухоли (ткань опухоли в дебюте заболевания и в рецидиве/прогрессии);
- 4) пациенты с потенциально неблагоприятным прогнозом.

### **Семейные и наследственные формы нейробластомы**

В данной работе критерием для определения семейной формы НБ было наличие в одной семье двух и более случаев доброкачественной или злокачественной опухоли СНС, лимитированные третьей степенью родства.

Под наследственной формой НБ понимали все случаи, когда были обнаружены герминальные патогенные варианты в генах, ассоциированных с СПО, а также пациенты с убедительными фенотипическими проявлениями генетического синдрома без выявления каузативного генетического варианта. До 2020 года пациенты направлялись на генетическое тестирование только при наличии фенотипических особенностей, характерных для известного генетического синдрома. С 2020 года всем пациентам с мультифокальным заболеванием, пороками развития и отягощенным онкологическим анамнезом проводилась консультация врача-генетика с определением показаний для проведения высокопроизводительного секвенирования герминального материала (лейкоциты периферической крови). Также при выявлении в ходе высокопроизводительного секвенирования ткани опухоли потенциально герминальных вариантов, проводился молекулярно-генетический анализ конституционального материала

(методом секвенирования по Сэнгеру) для подтверждения соматического или герминального статуса варианта. Потенциально герминальными признавались варианты, удовлетворяющих следующим критериям:

- 1) фракция альтернативного аллеля (ФАА) более 30%;
- 2) вариант в генах, в которых, согласно базе данных ClinVar описаны герминальные мутации: *ALK, ATM, BRCA1, BRCA2, DICER1, FBXW7, HRAS, KRAS, MSH6, MSH2, MLH1, NF1, NRAS, PIK3CA, POLD, POLE, PTCH1, PTEN, PTPN11, ROS1, SMARCA4, SMARCB1, TSC1, TP53, TSC2, WT1*;
- 3) наличие фенотипических особенностей, соответствующих подразумеваемому генетическому синдрому.

### **Мультифокальные формы нейробластомы (МФНБ)**

Под МФНБ подразумевалась опухоль с несколькими первичными очагами: поражение обоих надпочечников, поражение параспинальных ганглиев и одного или обоих надпочечников, поражение параспинальных ганглиев различных анатомических областей.

Все пациенты с МФНБ, получавшие терапию в «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» с января 2012 года по декабрь 2021 год, были включены в анализ клинических данных. Всем пациентам был выполнен референс данных инициальных радиологических методов обследования с целью уточнения распространенности заболевания и исключения пациентов с одним первичным опухолевым очагом, распространяющимся на несколько анатомических сегментов. В соответствии с международными рекомендациями INSS, в сомнительных случаях проводилась гиподиагностика МФНБ (G.M. Brodeur et al., 1993).

### **Пациенты с нейробластомой с потенциально неблагоприятным прогнозом**

Критериями отнесения пациентов в группу с потенциально неблагоприятным прогнозом были:

- 1) стратификация в группу высокого риска;
- 2) наличие одного и более события (прогрессия/рецидив) независимо от группы риска;
- 3) статус рефрактерного течения заболевания.

Верификация рецидива, прогрессии или рефрактерного течения опухоли проводилась в соответствии с общепринятыми рекомендациями.

С 2020 года материал ткани опухоли всех пациентов с НБ и ГНБ, получавших этап терапии в «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» и удовлетворяющих вышеуказанным критериям неблагоприятного прогноза, был направлен на молекулярно-генетическое исследование методом NGS в рамках проекта «Молекулярно-генетическая диагностика эмбриональных опухолей и сарком у детей» при поддержке фонда «Наука-детям». Также проводилось секвенирование опухолевой ДНК ретроспективным пациентам с наличием парных (ткань опухоли в дебюте и в рецидиве/прогрессии заболевания) образцов. При этом для принятия терапевтических решений использовались результаты молекулярной диагностики, полученные при исследовании опухоли в рецидиве/прогрессии, отражающие актуальный генетический статус.

Причиной направления пациентов на исследование методом NGS стало развитие неблагоприятного события в 32 (25,8%) случаях пациентов групп наблюдения и промежуточного риска и стратификация в группу высокого риска – 92 (74,2%). Среди пациентов группы высокого риска на момент завершения исследования (01.04.22) у 27/92

(29,4%) пациентов не отмечено неблагоприятных событий, у 65/92 (70,6%) констатировано развитие неблагоприятного события.

Развитие одного неблагоприятного события наблюдалось у 97 (78,2%) пациентов: 31/97 (32,0%) – локальная прогрессия/рецидив, 48/97 (49,5%) – метастатическая прогрессия/рецидив, 18/97 (18,5%) – комбинированная прогрессия/рецидив. Рефрактерное течение заболевания было зафиксировано у 65/124 (52,4%) пациентов, из них первичная рефрактерность у 22/65 (33,8%).

### **Пациенты с наличием парных образцов опухоли в дебюте заболевания и при развитии рецидива или прогрессии**

Сравнение молекулярно-генетического профиля парных опухолевых образцов методами флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), NGS, MLPA и ОТ-ПЦР проводилось всем пациентам с рецидивом/прогрессией заболевания при условии доступности для исследования качественного материала ткани опухоли, залитой в парафиновый блок (FFPE), в архиве патологоанатомического отделения «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» как минимум в двух временных точках: в дебюте заболевания и во время рецидива/прогрессии. Были включены все пациенты с 2012 года, удовлетворяющие критериям отбора в количестве 46 случаев.

### **Оценка аномалий числа копий генов и хромосомных регионов**

Исследование амплификации гена *MYCN*, делеций короткого плеча хромосомы 1 и длинного плеча хромосомы 11 осуществлялось методом FISH с последующей интерпретацией результатов, согласно протоколу NB-2004 и системы стратификации INRG.

Для выявления сегментарных и хромосомных aberrаций с помощью технологии MLPA использовались наборы SALSA P251, P252, P253 Neuroblastoma Kits (MRC-Holland, Нидерланды), содержащие олигонуклеотидные зонды, специфичные к различным регионам хромосом 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 12, 14, 17. Для детекции результатов применялся капиллярный электрофорез с помощью генетического анализатора SeqStudio (Thermo Fischer Scientific, США). Обработка полученных результатов проводилась в программе Coffalyser-NET (MRC-Holland, Нидерланды). Анализ результатов MLPA основывался на расчете соотношения нормализованного количества амплифицированного зонда в исследуемом образце ДНК к количеству аналогичного зонда в образцах референсной ДНК. Интерпретация результатов проводилась в соответствии с критериями Европейской группы по исследованию НБ SIOPEN (I.M. Ambros et al., 2011).

### **Оценка уровня экспрессии гена *TERT***

Уровень экспрессии гена *TERT* (референсный транскрипт NM\_198253.3) оценивался при помощи количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для получения комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК проводилась реакция обратной транскрипции с помощью ревертазы MINT (Евроген, Россия) со случайным гексануклеотидным праймером. В качестве референсного гена использовали *ACTB* (референсный транскрипт NM\_001101.5), нормализованный уровень экспрессии гена *TERT* рассчитывали по формуле:  $CqTERT - CqACTB$ , где  $Cq$  – это значение порогового цикла ПЦР реакции. Результат представлен как значение нормализованного  $nCqTERT$  (границы межквартильных 25 и 75 интервалов).

## **Анализ генетических вариантов в ткани опухоли**

С целью обнаружения нуклеотидных замен, а также небольших инсерций и делеций был применен метод целевого NGS с использованием кастомизированной панели QiaSeq (Qiagen, Германия), включающей 56 генов, генетические варианты в которых значимы в этиопатогенезе детских опухолей. Из представленной панели компонентами пути RAS-RAF-МЕК являлись: *ALK, BRAF, EGFR, FGFR1, HRAS, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, NF1, NRAS, PTPN11*, пути p53: *ATM, CREBBP, CDKN2A, CDKN2B, TP53*. Секвенирование проводилось путем парно-концевого прочтения на приборе MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq sequencing kit v.2 300× (Illumina, США) со средней глубиной прочтения > 500×. Интерпретация клинической значимости выявленных соматических генетических вариантов осуществлялась на основании рекомендаций AMP/ASCO/CAP (М.А. Спектор et al., 2021) (М.М. Li et al., 2017). Аннотация выявленных генетических вариантов проводилась с использованием канонического транскрипта MANEselect. Потенциально герминальные генетические варианты, выявленные при соматическом секвенировании, не интерпретировались до окончательного установления их характера.

Для определения герминальных вариантов анализ конституциональной ДНК пациента проводился на приборе NextSeq 500 (Illumina, США) с использованием кастомизированной панели (Roche, США), содержащей 197 генов, мутации в которых относятся к СПО. Интерпретация герминальных вариантов осуществлялась на основании рекомендаций ACMG и адаптированных российских рекомендаций «Суздаль-2» (О.П. Рыжкова et al., 2019) (S. Richards et al., 2015).

Как в случае соматического, так и герминального секвенирования в регион интереса входили кодирующие последовательности указанных генов (названия генов даны по HUGO Gene Nomenclature Committee), сайты сплайсинга (как минимум 10 bp интронной последовательности), а также 5' и 3' нетранслируемые области генов (как минимум 50 bp от старт и стоп кодона).

## **Статистический анализ**

Для хранения данных и проведения первичной обработки использовали базу данных в программе Excel Microsoft Office 2020. Статистический анализ проводили при помощи программы jamovi v1.6.13.0. Для описания количественных данных использовались абсолютные значения признака (n) и проценты (%), для описания количественных непрерывных данных – медиана (Me) и среднее арифметическое (M). Для анализа непараметрических данных применяли метод  $\chi^2$ . Для оценки различий между независимыми выборками по количественным и качественным признакам использовались критерии Манна-Уитни и  $\chi^2$ , соответственно. При сравнении количественных факторов в трех и более группах между собой использовался однофакторный дисперсный анализ One-Way ANOVA, критерий Краскала-Уоллиса.

Оценка выживаемости пациентов осуществлялась с использованием метода Каплана-Майера, достоверность различий в уровнях выживаемости пациентов между группами анализировалась с использованием критерия log-rank. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$  (двусторонний тест). Кроме общей выживаемости (ОВ) и бессобытийной выживаемости (БСВ), для групп пациентов, в которых во всех случаях наблюдалось развитие как минимум одного неблагоприятного события, рассчитывалась вторичная бессобытийная выживаемость (вБСВ), которая определялась как время от первого события до развития второго события (прогрессия/рецидив/смерть) или до даты

последнего наблюдения. Также для исследования прогностической значимости молекулярно-генетических факторов использовался расчет отношения рисков (ОР) наступления неблагоприятного события или летального исхода.

Оценка выживаемости проводилась по состоянию на 01.04.2022.

Для оценки диагностической значимости уровня экспрессии гена *TERT* для прогнозирования развития неблагоприятного события и определения порогового значения экспрессии гена, применялся ROC-анализ. Пороговое значение определялось по принципу наивысших значений чувствительности и специфичности.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Семейные случаи нейробластомы**

За период с января 2012 года по декабрь 2021 года в условиях «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» зафиксировано 11 случаев семейной формы НБ, что составляет 1% от всех зарегистрированных за это период пациентов. Данные пациенты принадлежали 7 неродственным семьям. В трех семьях полная клиническая информация об одном из заболевших не была доступна.

Медиана возраста на момент постановки диагноза составила 16 мес. (разброс 4-50 мес). Распределение по полу м:д=1,75:1. Медиана наблюдения – 31 мес. (разброс 1-174 мес).

Примечательно, что внутри одной семьи течение заболевания могло быть гетерогенно: от благоприятного течения у одного из членов семьи, до фатального – у другого. Исчерпывающая клиническая информация, относящаяся к каждому случаю заболевания внутри семьи, была доступна в четырех семьях. В трех семьях у обоих заболевших диагностирована НБ группы высокого риска (4 стадии у пяти пациентов, 3 стадии – у одного), в одной семье случаи нейrogenной опухоли принадлежали к группе промежуточного риска и наблюдения. Несмотря на отсутствие различий в клинических данных, прогноз для пациентов значительно различался: в одной семье наблюдалось фатальное течение заболевания у обоих заболевших, в двух других семьях один из пациентов остается жив, без прогрессии заболевания в течение длительного периода времени (31 и 72 мес). Пациенты из одной семьи, стратифицированные в группы наблюдения и промежуточного риска живы без признаков прогрессии/рецидива заболевания. В целом в нашей когорте семейных форм НБ зарегистрировано 36% летальных исходов. Трехлетняя ОВ составляет 80,8% (95% ДИ 60,0–100), 3-летняя БСВ 71,6% (95% ДИ 48,8–100).

Для проведения молекулярно-генетического анализа был использован конституциональный материал (периферическая кровь) 6 пациентов, а также ткань опухоли 5 больных. Ткань опухоли была использована для поиска потенциально герминальных вариантов в условиях недоступности конституционального материала для тестирования. Исследование ткани опухоли было проведено с использованием расширенной панели NGS, включающей гены, значимые для диагностики синдромов предрасположенности к опухолевым заболеваниям. Примечательно, что только в одном случае был выявлен потенциально патогенный вариант в гене *ALK* p.R1275Q.

### **Наследственные случаи нейробластомы**

За период с января 2012 года по декабрь 2021 года в условиях «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» зафиксировано 22 (2%) случая НБ, ассоциированной с генетической

предрасположенностью к опухолевым заболеваниям (наследственная НБ). В настоящем исследовании в группу наследственных НБ не включались семейные формы заболевания, описанные ранее.

Медиана возраста на момент постановки диагноза для пациентов с выявленными герминальными мутациями составила 22 мес (разброс 0-186 мес). Соотношение м:д=1,2:1. Медиана наблюдения была равна 41 мес (разброс 1-108 мес).

Направление пациентов на герминальное тестирование с целью подтверждения генетического синдрома осуществлялось по следующим причинам:

- 1) наличия фенотипических особенностей и пороков развития – 54,5% (12/22),
- 2) наличия отягощенного онкологического семейного анамнеза – 22,75% (5/22),
- 3) выявлении потенциально герминального варианта при секвенировании ДНК из ткани опухоли – 22,75% (5/22).

У двух пациентов с очевидными клиническими проявлениями наследственных опухолевых синдромов (центральной гиповентиляции, Беквита-Видемана) при адекватном уровне герминального тестирования не было выявлено aberrаций в гене *PHOX2B* и потери гетерозиготности/импринтинга в локусе 11p15.5. Также у одного пациента с многочисленными врожденными пятнами цвета «кофе с молоком» исследование конституциональной ДНК не проводилось. У вышеперечисленных пациентов диагноз наследственного опухолевого синдрома был установлен на основании клинических признаков. В остальных случаях были выявлены aberrации в генах, как ассоциированных с развитием НБ, так и не связанных с развитием детских опухолей. Так, у 22,7% (5/22) пациентов выявлен нейрофиброматоз I типа, у 22,7% (5/22) выявлены дефекты в генах репарации ДНК (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHEK2*), у 9,1% (2/22) – синдром Ли-Фраумени, у 9,1% (2/22) – синдром Линча, по 4,5% (1/22) – синдромы Сотоса, Горлина, параганглиомы/феохромоцитомы, Нунан 1, Шершевского-Тернера, делеции 1q.

### **Особенности мультифокальной нейробластомы**

За период с января 2012 по декабрь 2021 год в «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» зарегистрировано 78 пациентов с опухолевым поражением, затрагивающих несколько анатомических областей, расцененных как МФНБ. Из них после пересмотра визуализации двумя независимыми рентгенологами, специализирующимися на детской онкологической патологии, 73% (n=57) пациентов интерпретированы как истинно мультифокальные опухоли, что составило 5,1% (57/1110) от общего количества зарегистрированных пациентов.

Распределение по полу м:д=1,1:1. Медиана возраста на момент постановки диагноза составила 2 мес (разброс 0-75 мес), медиана времени наблюдения за пациентами – 54 мес (разброс 1-119 мес).

Наибольшую часть группы МФНБ составляли пациенты с билатеральным поражением надпочечников 86% (n=49), из них двое были с одновременным поражением надпочечников и ганглиев брюшинного пространства, трое – с поражением надпочечников и ганглиев заднего средостения, один – с поражением обоих надпочечников, ганглиев заднего средостения и брюшинного пространства.

У 45/57 (78,9%) пациентов установлена метастатическая форма заболевания: 17 – 4 стадия по INSS (M стадия по INRGSS), 28 – 4S (MS стадия по INRGSS). У 21,1% пациентов метастатического поражения не выявлено. Наиболее часто наблюдалось метастатическое поражение печени (66,7%) и КМ (43,8%). Цитогенетические aberrации выявлялись не

часто. Амплификация гена *MYCN* выявлена у 5 пациентов (8,8%), делеция 1p – у 5 (8,8%), делеция 11q – у 3 (5,3%).

Преобладающее число пациентов было стратифицировано в группу наблюдения (36/57, 63,2%). К группе промежуточного риска отнесено 14/57 (24,5%) пациентов, к группе высокого риска – 7/57 (12,3%).

Развитие неблагоприятного события наблюдалось независимо от группы риска, в которую был отнесен пациент ( $p=0,730$ ). При этом трехлетняя ОВ для пациентов группы наблюдения и промежуточного риска составила 97,2% (95% ДИ 92,0–100) и 100%, соответственно, оказываясь наилучшей у пациентов группы высокого риска 60,0% (95% ДИ 29,3–100) ( $p=0,007$ ). Статистически значимые различия в показателях ОВ сохранялись при сравнении группы высокого риска с группами наблюдения и промежуточного риска ( $p=0,011$  и  $0,016$ , соответственно). При этом между группой наблюдения и промежуточного риска различия в ОВ не являлись статистически значимыми ( $p=0,530$ ).

При анализе распределения клинических и генетических прогностических факторов между группами риска зафиксирована более низкая медиана возраста на момент постановки диагноза для пациентов группы наблюдения (1,5 мес) по сравнению с группой промежуточного (5 мес) и высокого (8 мес) риска ( $p=0,003$  и  $0,007$ , соответственно). При этом медиана возраста между группами пациентов промежуточного и высокого риска значимо не отличалась ( $p=0,452$ ).

Определение сегментарных и количественных aberrаций в хромосомах 1, 2, 3, 11 и 17 методом MLPA проведено 22 пациентам. У 8/22 (36%) пациентов сегментарные нарушения в вышеописанных локусах не выявлены. У остальных пациентов выявлено от 1 до 3 различных aberrаций. Медиана количества aberrаций составила 2.

Проведен анализ каждого генетического маркера на ОВ и БСВ по отдельности. Амплификация гена *MYCN* и увеличение числа копий 17q статистически значимо ухудшали ОВ ( $p=0,017$ ), при этом не оказывая влияния на БСВ ( $p=0,68$  и  $0,95$ , соответственно). Остальные выявляемые aberrации не показали статистически значимого влияния на ОВ и БСВ, в том числе и делеция 11q, таблица 2.

Таблица 2 – Влияние сегментарных и количественных нарушений на выживаемость у пациентов с МФНБ

Фактор	n	3-летняя БСВ		3-летняя ОВ	
		БСВ (95%-й ДИ)	p-value, log-rank	ОВ (95%-й ДИ)	p-value, log-rank
Нет aberrаций	8	62,5 (36,5–100)	0,93	100	0,51
Делеция 1p	6	100	0,15	100	0,62
Амплификация <i>MYCN</i>	3	66,7 (30–100)	0,68	66,7 (30–100)	<b>0,017</b>
Делеция 3p	1	100	0,7	95 (85,9–100)	1
Делеция 11q	5	53,3 (21,4–100)	0,25	100	0,62
УЧК 17q	4	75 (42,6–100)	0,95	66,7 (30–100)	<b>0,017</b>
Моносомия 3	1	100	0,6	100	0,82
Моносомия 11	1	100	0,6	100	0,82
Трисомия 17	2	100	0,44	100	0,74

Шести пациентам с МФНБ проведено NGS ДНК, выделенной из ткани опухоли. В 3/6 (50%) случаях были выявлены мутации в гене *ALK* p. I1170T с ФАА 72% и p. R1275Q с ФАА 19% и 88%. Статус варианта гена *ALK* p. I1170T и одного из вариантов p. R1275Q не

был установлен по причине отсутствия конституционального материала пациента. У одного пациента (20%) была обнаружена соматическая нонсенс-мутация *CREBBP* p.R1319\* с ФАА 6%. Также у одного больного (20%) пациента выявлено 3 соматических генетических варианта в опухоли: *ATM* p.Q1098\* (ФАА 19%), *BRC1* p.W372\* (ФАА 6%) и *APC* p.Q654\* (ФАА 19%).

У 5 пациентов с билатеральным поражением надпочечников были проанализированы парные образцы контрлатеральных опухолей методом MLPA, а также трем пациентам выполнено NGS опухолей обоих надпочечников (Таблица 3). Профиль хромосомных aberrаций и нуклеотидных вариантов в парных образцах в значительной мере отличался. При этом идентичные с точки зрения несбалансированных хромосомных aberrаций опухоли (у пациента №3), имели различный мутационный профиль, что подчеркивает независимое развитие первичных очагов различной локализации при МФНБ.

Таблица 3 – Генетические aberrации, выявленные в парных образцах опухолей контрлатеральных надпочечников

Пациент	Хромосомные aberrации		Нуклеотидные aberrации	
	Опухоль правого надпочечника	Опухоль левого надпочечника	Опухоль правого надпочечника	Опухоль левого надпочечника
1	нет	нет	-	-
2	УЧК 2p; Трисомия 17	Делеция 11q13.2-22.3	-	-
3	Делеция 1q42-44; УЧК 17q12-25	Делеция 1q42-44 УЧК 17q12-25	<i>ALK</i> p.R1275Q (ФАА 19%)	нет
4	Делеция 11q 22.1-23.3 УЧК 17q12-25	УЧК 17q12-25	нет	нет
5	нет	Делеция 1q21-44 Делеция 3p22-25 Делеция 11q22-23	нет	<i>CREBBP</i> p.R1319* (ФАА 6%)

Экспрессия гена *TERT* у пациентов с МФНБ определена 26 пациентам. Медиана нормализованного уровня экспрессии гена *TERT* при мультифокальном поражении составила -4,0 (-6,0...-2,0). При измерении уровня экспрессии гена *TERT* в отдельных клинических группах статистически значимых различий не получено.

#### Молекулярно-генетические изменения в опухоли у пациентов с потенциально неблагоприятным прогнозом

В данную группу отнесено 124 пациента. Соотношение м:д составило 1,5:1, медиана возраста на момент постановки диагноза – 36 мес. (разброс 0-173 мес.). Медиана времени наблюдения составила 35,5 мес. (разброс 3-174 мес.).

Среди проанализированных преобладали пациенты с 4 стадией заболевания по INSS, на которых приходилось 92 (74,2%) случая, далее следовали стадия 4S – 5 (4,0%), 3 – 12 (9,7%), 2 – 10 (8,1%), 1 – 5 (4,0%). Большую часть составили пациенты группы высокого риска – 92 (74,2%), пациентов группы промежуточного риска было 4 (3,2%), наблюдения – 28 (22,6%).

Амплификация гена *MYCN* выявлена у 34 пациентов (27,4%), не обнаружена – 89 (71,8%), статус не известен – 1 (0,8%). Делеция/дисбаланс 1p36 выявлена у 31 (25,0%), не

выявлена – 89 (71,8%), не известна – 4 (3,2%). Делеция/дисбаланс 11q23 выявлена у 20 (16,1%), не выявлена – 82 (66,1%), не известна – 22 (17,7%).

NGS с целью поиска соматических мутаций в 84/124 (67,7%) случаях проведено на материале опухоли, полученной в дебюте заболевания, в 40/124 (32,3%) – во время рецидива/прогрессии. Для исследования в 94/124 (75,8%) случаев послужила ткань первичного опухолевого очага, в 30/124 (24,2%) – ткань метастаза. Для пациентов с неблагоприятным событием было проведено исследование ткани опухоли, наиболее приближенной к неблагоприятному событию (40/97, 41,2%), однако, в большинстве случаев это условие не могло быть выполнено ввиду отсутствия материала в момент прогрессии/рецидива (наличие костномозгового рецидива/прогрессии, решение воздержаться от проведения биопсии при быстрой прогрессии опухоли). В таком случае была использована ткань опухоли, полученная во время первичной диагностики у 57/97 (58,8%) пациентов.

В ходе NGS у 66/124 (53,2%) пациентов выявлено 86 онкогенных генетических вариантов в 29 генах (Рисунок 1). У 13/66 (19,7%) пациентов выявлено по 2 онкогенных варианта, у 2/66 (3,0%) – по 3, у 1 – 4 (1,5%). ФАА выявленных вариантов варьировала от 1 до 91%.

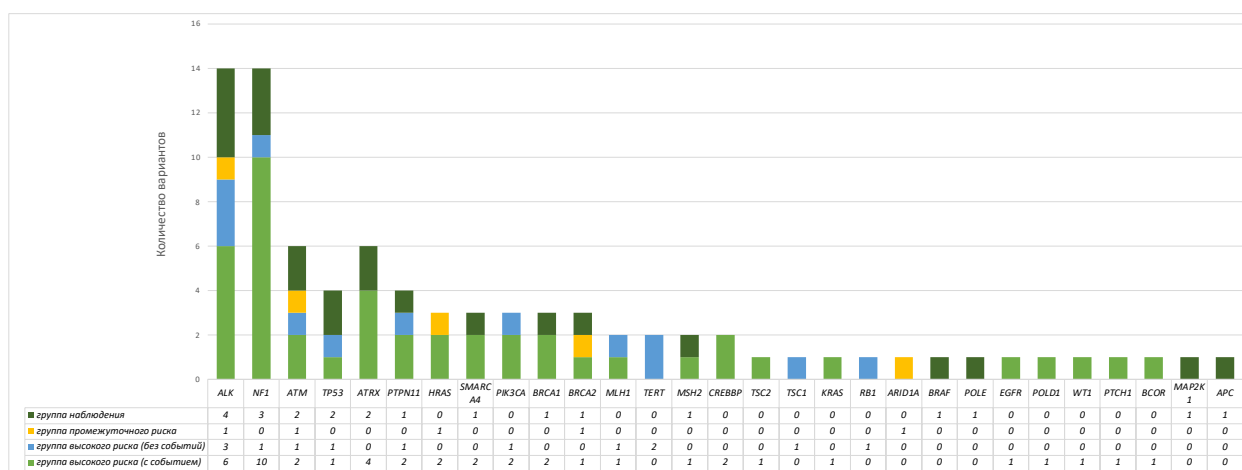


Рисунок 1 – Количество соматических онкогенных нуклеотидных вариантов среди пациентов с неблагоприятным течением НБ

Группа промежуточного риска была представлена всего 4 пациентами, ввиду чего была объединена с группой наблюдения для проведения анализа частоты обнаружения онкогенных вариантов в группах высокого и «невысокого» риска. Чаще онкогенные нуклеотидные варианты выявлялись в группе «невысокого» риска (62,5% против 48,9%), однако, разница не была статистически значимой ( $p=0,406$ ). Варианты в компонентах путей RAS-RAF-МЕК и p53 также чаще выявлялись у пациентов группы «невысокого» риска (50% против 33,7%,  $p=0,071$ ).

Во всей группе пациентов, характеризующихся потенциально неблагоприятным прогнозом, наиболее часто онкогенные варианты встречались в генах *ALK* ( $n=14$ ) и *NF1* ( $n=14$ ) и были выявлены у 11,3% (14/124) и 10,5% (13/124) пациентов, соответственно. У 6/124 (4,8%) пациентов были выявлены варианты в гене *ATRX*, свидетельствующие о реализации альтернативного пути поддержания длины теломер, что также характеризует неблагоприятный прогноз у пациентов, в соответствии с литературными данными.

Для оценки влияния молекулярно-генетических событий на прогноз при НБ, характеризующейся развитием неблагоприятных событий, проведен статистический анализ, в который включены пациенты только с развитием одного и более неблагоприятного события (n=97). При подсчете трехлетней ВБСВ, показана статистически значимая разница между группами высокого и «невысокого» риска – 42,4% (95% ДИ 29,7–59,5) против 71,8% (95% ДИ 55,2–93,5), p=0,004 (Рисунок 2). Трехлетняя ОВ также статистически значимо различалась между группами: 67,9% (95% ДИ 57,2–80,6) в группе высокого риска и 100% в группе «невысокого» риска, p < 0,001, что указывает на важность инициальной стратификации пациента для определения прогноза.

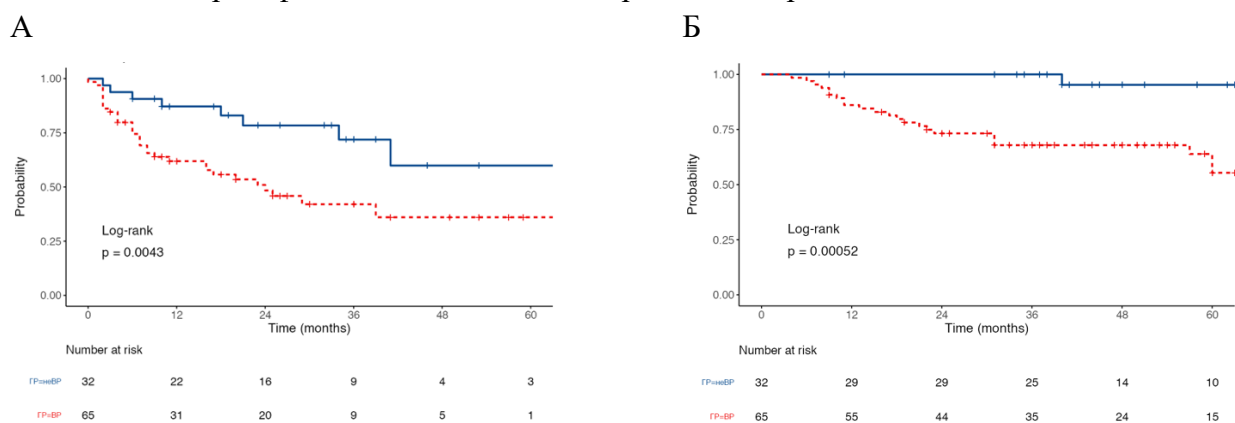


Рисунок 2 – Вторичная бессобытийная (А) и общая (Б) выживаемость пациентов группы высокого и невысокого риска с развитием неблагоприятных событий. ГР=ВР – группа высокого риска, ГР=неВР – группа «невысокого» риска.

Таблица 4 – Влияние различных факторов на ОВ и ВБСВ у пациентов группы высокого риска

Фактор	Наличие	Количество пациентов, n (%)	3-ОВ, % (95%-й ДИ)	p-value, log-rank	3-ВБСВ, % (95%-й ДИ)	p-value, log-rank
Амплификация гена <i>MYCN</i>	есть	34 (36,9)	47,4 (31,3–71,8)	<b>0,001</b>	26,4 (13,1–53,3)	<b>0,009</b>
	нет	57 (62,0)	86,3 (76,4–97,4)		54,3 (37,6–78,4)	
	не оц.	1 (1,1)	100			
Делеция 1p	есть	29 (31,5)	48,7 (30,8–76,8)	<b>0,015</b>	23,7 (10,2–55,2)	<b>0,034</b>
	нет	59 (64,1)	81,6 (71,3–93,5)		48,0 (32,1–72,0)	
	не оц.	4 (4,4)	100			
Нуклеотидные варианты	есть	45 (48,9)	75,5 (62,5–91,2)	0,370	47,8 (29,2–78,30)	0,190
	нет	47 (51,1)	69,7 (55,8–87,0)		36,0 (21,5–60,4)	
• В <i>RAS/p53</i>	есть	31 (33,7)	75,8 (60,3–95,4)	0,460	47,8 (24,3–94,0)	0,200
	нет	61 (66,3)	70,4 (58,2–85,0)		38,1 (24,8–58,4)	
• В <i>ALK</i>	есть	9 (9,8)	72,9 (46,8–100)	0,900	66,7 (37,9–100)*	0,740
	нет	83 (90,2)	72,7 (62,5–84,7)		49,9 (34,3–64,0)	
• В <i>NF1</i>	есть	10 (10,9)	70,0 (46,7–100)	0,520	65,6 (40,2–100)	0,660
	нет	82 (89,1)	73,1 (62,7–85,2)		39,7 (26,9–58,6)	
RAS/p53+ амплификация <i>MYCN</i>	есть	15 (16,3)	52,1 (29,9–90,6)	<b>0,021</b>	51,9 (29,8–90,2)*	0,180
	нет	77 (83,7)	76,6 (66,4–88,4)		45,0 (31,6–64,1)	
RAS/p53+ делеция 1p	есть	9 (9,8)	58,3 (30,0–100)	0,140	60,0 (33,1–100)**	0,290
	нет	83 (90,2)	74,0 (63,9–85,7)		44,6 (31,7–62,9)	

не оц. – не оценивалась

Проведен анализ факторов, оказывающих влияние на ВБСВ и ОВ у пациентов группы высокого риска. Результаты, приведенные в таблице 4, подтверждают прогностическую роль амплификации гена *MYCN* и делеции 1p в группе пациентов высокого риска, тогда как наличие онкогенных генетических вариантов, включая мутации в компонентах путей RAS-RAF-МЕК и p53 не влияли на прогноз. При комбинации цитогенетических факторов прогноза и данных NGS сохраняется прогностическое значение сочетанного выявления aberrаций в компонентах путей RAS/p53 и амплификации гена *MYCN* ( $p=0,021$ ), однако в прогнозировании многократного развития рецидива (рецидивирования) заболевания значимость теряется ( $p=0,180$ ).

В связи с установленным неоспоримым влиянием амплификации гена *MYCN* и делеции 1p на прогноз в группе пациентов высокого риска, далее проведен поиск молекулярно-генетических маркеров возможного прогнозирования неблагоприятного течения заболевания в группе с исключением пациентов с наличием стандартных цитогенетических факторов риска ( $n=47$ ). Однако, выявление нуклеотидных вариантов в проанализированных генах не оказывало прогностического значения, тем не менее, наличие онкогенных вариантов было ассоциировано с повышенным риском вероятности летального исхода ( $p=0,056$ ).

В группе пациентов, отнесенных в группу «невысокого» риска ( $n=32$ ) не получено достоверного прогностического влияния как стандартных маркеров (делеция 1p), так и других генетических событий. В прогнозировании риска многократного рецидивирования пациентов группы промежуточного риска и наблюдения получено статистически значимое влияние мутаций в гене *NFI* ( $p=0,016$ ), однако количество пациентов с данной aberrацией было крайне незначительно, что ограничивает интерпретацию результатов.

### **Рефрактерное течение заболевания**

Группа пациентов с рефрактерным течением заболевания ( $n=65$ ) включала 22 пациента с первично-рефрактерным заболеванием, отличалась существенным преобладанием пациентов с 4 стадией (21/22, 95,5%), амплификацией гена *MYCN* (6/22, 27,3%), и, соответственно, превалированием пациентов группы высокого риска (20/22, 90,9%). Как следствие, в данной когорте пациентов были распространены неблагоприятные события в виде фатальной прогрессии опухоли (7/22, 31,8%).

У пациентов с рефрактерным течением заболевания количество выявляемых онкогенных мутаций в целом, а также в путях RAS/p53 значимо не отличались от пациентов с химиочувствительной НБ ( $p=0,482$ ). Однако, при анализе наиболее часто встречающихся мутаций в генах *ALK* и *NFI* было показано, что наличие мутаций в гене *NFI* имеет тенденцию сопровождать рефрактерное течение заболевания (10/65, 15,4% против 3/59, 5,1%,  $p=0,062$ ).

С целью понимания вклада различных факторов в рефрактерное течение заболевания проведено сравнение пациентов с первично-рефрактерным заболеванием ( $n=22$ ) с пациентами без рефрактерного течения ( $n=59$ ). Пациенты, которым рефрактерность установлена за счет развития нескольких рецидивов/прогрессии заболевания были исключены.

Среди пациентов с первично-рефрактерным течением заболевания превалировали пациенты с 4 стадией заболевания (21/22, 95,5% против 36/59, 61%,  $p=0,003$ ) и группы высокого риска (20/22, 90,9% против 36/59, 61%,  $p=0,002$ ). Примечательно, что частота выявления стандартных цитогенетических изменений (амплификации гена *MYCN*, делеция

1p и 11q) в данных когортах достоверно не различалась. Вероятность развития неблагоприятных событий (рецидив/прогрессия) также статистически значимо не различалась между группами (p=0,101). Однако, летальные исходы были зафиксированы только у пациентов с первично-рефрактерным течением заболевания, при этом время наблюдения за выжившими пациентами не отличалось (p=0,439). Из выявленных молекулярно-генетических особенностей стоит отметить, что среди пациентов с первично-рефрактерным заболеванием частота выявления онкогенных мутаций в гене *NF1* была значимо выше (5/22, 22,7% против 3/59, 5,1%, p=0,018).

### Определение мишеней для молекулярно-направленной терапии прогностически неблагоприятной нейробластомы

Наиболее известной мишенью для таргетной терапии при НБ являются активирующие мутации в тирозинкиназном домене гена *ALK*, которые были выявлены в 11,3% (14/124) случаев: у пациентов группы высокого риска в 9,8% (9/92) случаев, у пациентов групп наблюдения и промежуточного риска – в 15,6% (5/32). Кроме того, методом FISH была выявлена амплификация гена *ALK* у двух пациентов. Другие потенциально таргетируемые aberrации включали активирующие мутации в генах *EGFR*, *BRAF*, *MAP2K1*, выявленные у 2,4% (3/124) пациентов.

Несмотря на превалирование пациентов с выявленными мишенями для таргетной терапии в группе «невысокого» риска (21,9% против 10,9%), данная разница не была статистически значимой (p=0,119). В целом, у пациентов с потенциально неблагоприятной НБ мишени для таргетной терапии выявляются в 13,7% (17/124) случаев.

Среди описанной когорты 10/14 пациентам с aberrациями в гене *ALK* была назначена таргетная терапия различными ALK-ингибиторами как в 1 линии терапии в 20% (2/10) случаев, так и при рецидиве/прогрессии заболевания – 80% (8/10) (Рисунок 3).

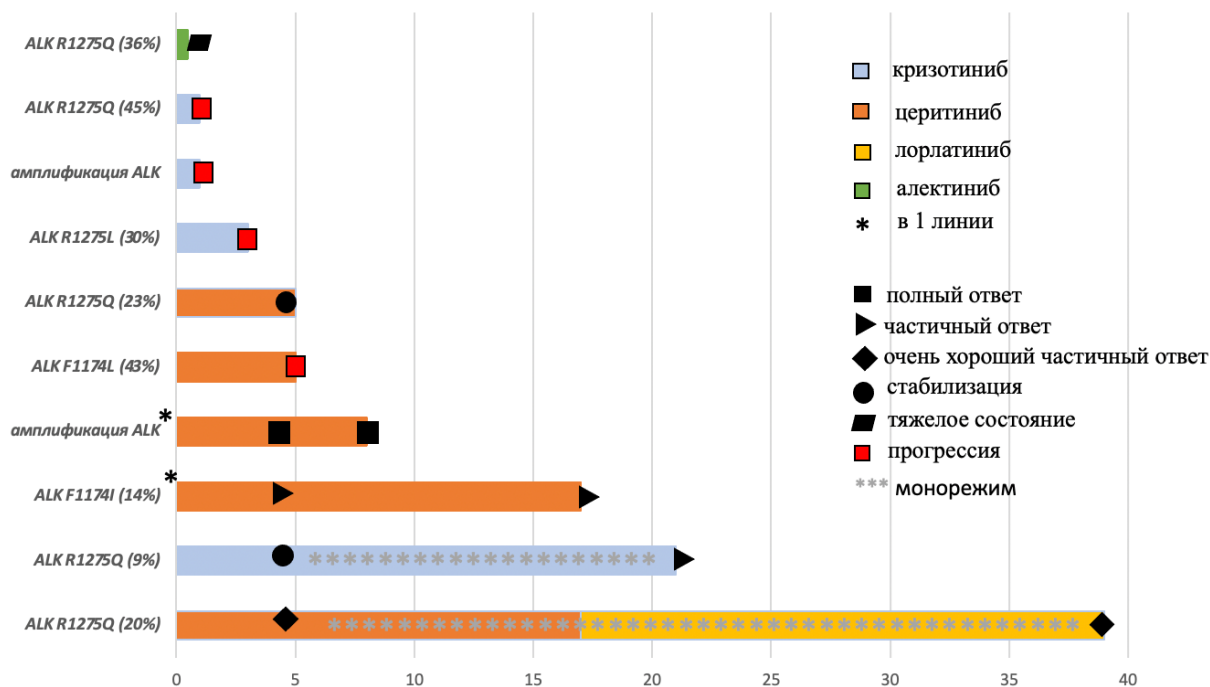


Рисунок 3 – Длительность и эффективность терапии ингибиторами ALK

В 80% (8/10) таргетная терапия проводилась пациентам группы высокого риска: 25% (2/8) – в первой линии терапии параллельно с индукционными курсами по протоколу NB-2004, дифференцировочной и иммунотерапией; 75% (6/8) – в рецидиве/прогрессии заболевания параллельно с курсами иринотекан/темозолomid (n=4), топотекан/циклофосфамид (n=1), метрономной терапией (n=1). В одном случае терапия ингибитором ALK была назначена пациенту группы промежуточного риска, развившему прогрессию заболевания. Оценка статуса заболевания на фоне проведения молекулярно-направленной терапии проведена по состоянию на 01.09.2022 г.

Пациенты получали терапию ALK-ингибиторами в течение различного периода времени. Медиана длительности терапии составила 4,5 мес. (разброс 0,3-39 мес).

Несмотря на комбинированное применение ALK-ингибиторов параллельно с цитостатической терапией, токсичность 3-4 степени не наблюдалась ни у одного пациента. У одного больного при длительном применении церитиниба в монорежиме в течение 17 месяцев наблюдалось развитие печеночной токсичности 3 степени, потребовавшей смены ALK-ингибитора на лорлатиниб с полным нивелированием токсических проявлений. Также у одного пациента при комбинации церитиниба с динутуксимабом-бета выявлена печеночная токсичность 3 степени, нивелировавшаяся после паузы в таргетной терапии и не возобновляющаяся при последовательном введении препаратов.

#### **Анализ парных образцов опухоли, полученных в дебюте заболевания и при рецидиве/прогрессии**

Проведение повторной биопсии опухоли при развитии рецидива или прогрессии НБ не является стандартной процедурой. В настоящем исследовании у 46 пациентов были доступны для изучения парные образцы, полученные как в дебюте заболевания, так и при развитии рецидива/прогрессии.

Оценка сегментарных и количественных хромосомных аномалий методом MLPA в ткани первичной опухоли проведена 44 пациентам, в ткани опухоли, полученной в рецидиве/прогрессии заболевания – 45. Результаты MLPA дополнялись результатами исследования FISH при анализе статуса гена *MYCN* и короткого плеча хромосомы 1.

Наиболее часто выявлялись:

- делеция 1p различной протяженности (1p13.3 – 1p36.33) в 14 (31,8%) случаях в первичной опухоли и 17 (37,8%) случаях в рецидиве /прогрессии заболевания,
- делеция 11q (11q13.2 – 11q23.3) в 26 (59,1%) и 23 (51,1%),
- делеция 3p (3p12.3 – 3p25.3) в 10 (22,7%) и 6 (13,3%),
- делеция 9p (9p21.3 – 9p24.1) в 6 (13,6%) и 6 (13,3%),
- увеличение числа копий 17q (17q11 – 17q25.3) в 26 (59,1%) и в 24 (53,3%),
- амплификация гена *MYCN* и/или коамплификация гена *MYCN* с генами регионов 2p23-2p24 в 14 (31,8%) и в 18 (40%).

Проведен анализ влияния на показатели ОВ и ВБСВ различных видов молекулярно-генетических событий в дебюте и в рецидиве заболевания. Статистически значимое влияние выявленных несбалансированных геномных aberrаций на риск развития летального исхода или второго неблагоприятного события было продемонстрировано только для амплификации и коампликации гена *MYCN* (n=14, p<0,001). Влияние делеции 1p (n=14) было статистически значимо только при выявлении в опухоли в дебюте заболевания (p=0,010) и утратило значимость влияния на ОВ и ВБСВ при выявлении в ткани

опухоли в рецидиве/прогрессии. Остальные сегментарные и хромосомные aberrации значительно не влияли на вероятность развития неблагоприятного события.

Сравнение профиля несбалансированных геномных aberrаций проводилось по результатам анализа опухолевого материала, полученного в дебюте заболевания и при развитии рецидива/прогрессии НБ у того же пациента. Парный материал, пригодный для проведения анализа был доступен у 43 из 46 пациентов. Идентичная картина наблюдалась в парных образцах только у 2/43 пациентов (4,7%), у которых не было выявлено сегментарных и количественных нарушений в ткани опухоли методом MLPA. У остальных пациентов профиль несбалансированных хромосомных aberrаций в первичной опухоли не воспроизводился при развитии рецидива.

На рисунке 4 представлена динамика изменения профиля несбалансированных хромосомных aberrаций в парных образцах НБ. Выявлено, что сегментарные хромосомные aberrации, впервые возникшие в рецидивной опухоли, затрагивают все проанализированные локусы. Чаще всего изменения затрагивают короткие плечи хромосомы 1 и 2, в том числе и участок гена *MYCN*.

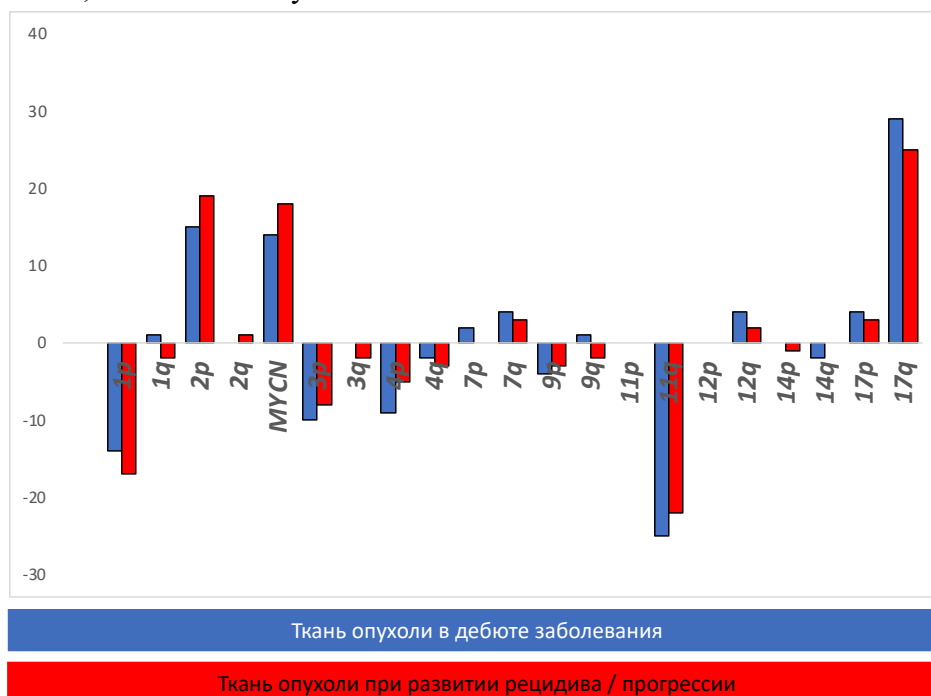


Рисунок 4 – Изменение профиля аномалий числа копий хромосомных регионов в первичной опухоли и при рецидиве/прогрессии заболевания

В проанализированной когорте пациентов амплификация гена *MYCN* сохранялась и в рецидиве/прогрессии заболевания, при обнаружении ее в ткани опухоли на момент постановки диагноза. У четырех пациентов наблюдалось появление амплификации гена *MYCN* в опухоли только в рецидиве/прогрессии заболевания. У 9 пациентов в рецидиве заболевания отмечалось изменение длины амплифицированного участка за счет появления (n=5) или утраты (n=4) коамплификации генов, картированных в локусах 2p23-2p24 (*NBAS*, *MYCN*, *DDX*, *ALK*).

У 9 пациентов наблюдалось приобретение делеции 1p в рецидиве/прогрессии заболевания, в 6 случаях утрачивалась делеция 1p, выявленная в дебюте заболевания. Опухоль в рецидиве заболевания у двух пациентов характеризовалась одновременным появлением делеции 1p и амплификации гена *MYCN*.

На риск развития второго неблагоприятного события и/или летального исхода достоверно влияло исключительно приобретение или утрата коампликации генов регионов 2p23-2p24 совместно с геном *MYCN* (n=5), причем у 3 пациентов амплификация генов указанных регионов, включая *MYCN* выявлялась изолированно в рецидиве заболевания. Таким образом, несмотря на то что приобретение амплификации гена *MYCN*, не показало статистически значимого влияния на показатели ОБ и ВБСВ, вероятнее всего, приобретение изолированной амплификации гена *MYCN*, обладает таким же неблагоприятным прогнозом, как и приобретение коампликации. Приобретение делеции 1p и других не используемых для стратификации сегментарных нарушений, несмотря на их количество, не значимо в прогнозе НБ.

Уровень экспрессии гена *TERT* в ткани первичной опухоли был измерен методом количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени 43 пациентам. Медиана экспрессии нормализованного уровня *TERT* составила -6,0 (-8,0...-3,5).

Полученные результаты свидетельствуют о значительных различиях в уровне экспрессии гена *TERT* в первичной опухоли между различными группами риска: наблюдения [-7,0 (-9,0...-4,0)], промежуточного (-3,0), высокого [-5,0 (-6,0...-2,25)] (p=0,026). Уровень экспрессии *TERT* был связан с характером первого неблагоприятного события и наличием последующих неблагоприятных событий: при низком уровне мРНК *TERT* прогрессирование носило локальный характер, тогда как при высоком – системный и повторяющийся (p=0,030 и 0,020, соответственно).

Уровень экспрессии гена *TERT* был выше у пациентов с наличием амплификации гена *MYCN* (p=0,079), что является патогенетически объяснимым фактом, учитывая данные о прямой активации экспрессии *TERT* при наличии амплификации гена *MYCN*.

С помощью ROC-анализа был определен пороговый уровень нормализованной экспрессии *TERT*, превышение которого ассоциировано с повышенным риском развития второго неблагоприятного события. Пороговый уровень составил -7,0 при площади под ROC-кривой 0,707, чувствительности 61,9%, специфичности – 77,3%. Пациенты с экспрессией гена *TERT* ниже порогового уровня имели тенденцию к лучшей трехлетней ОБ 84,6% (95% ДИ 67,1–100) против 63,3% (95% ДИ 48,2–83,2), p=0,076; и трехлетней ВБСВ 66,6% (95% ДИ 44,4–100) против 43,1% (95% ДИ 28,5–65,1), p=0,070.

Уровень экспрессии гена *TERT* в ткани опухоли, полученной при рецидиве/прогрессии заболевания, определен 40 пациентам, медиана составила -6,0 (-8,0...-4,0). Был выполнен анализ зависимости уровня мРНК *TERT* в опухоли во время рецидива/прогрессии заболевания от различных клинических характеристик.

Полученные результаты свидетельствуют о сохранении разницы уровня экспрессии гена *TERT* в рецидивной опухоли между пациентами, относящимися к различным группам риска (p=0,052), выражаясь в наименьшем значении среди пациентов группы наблюдения.

Между пациентами с наличием и отсутствием амплификации гена *MYCN* значимая разница в уровне экспрессии гена *TERT* не была обнаружена (p=0,579), что может говорить об утрате прогностической роли экспрессии гена *TERT* в рецидивной опухоли.

Для сравнения уровня экспрессии гена *TERT* в ткани опухоли во время дебюта заболевания, и ткани опухоли, полученной во время рецидива/прогрессии заболевания, было доступно 38 парных образцов.

При сравнении уровня экспрессии гена *TERT* в первичной опухоли (*TERT1*) и в рецидиве заболевания (*TERT2*) статистически значимой разницы выявлено не было (p=0,138). Медиана *TERT1* составила -5,50 (-8,0...-3,25), медиана *TERT2*: -6,0 (-8,0...-4,0). В

группах пациентов, разделенных по клиническим характеристикам, различия в изменении уровня экспрессии гена *TERT* во времени, не были статистически значимыми. Полученные результаты свидетельствуют о прогностической значимости уровня мРНК *TERT* в первичной опухоли, тогда как уровень экспрессии гена *TERT* в рецидиве/прогрессии заболевания, а также его изменение прогностической значимостью не обладают.

Исследование нуклеотидных вариантов методом NGS произведено 29 пациентам на материале опухоли в дебюте заболевания и 31 пациенту на материале, полученном при развитии рецидива/прогрессии заболевания.

Онкогенных соматических вариантов по результатам NGS выявлено в опухоли в дебюте заболевания у 13/29 (44,8%), в рецидиве/прогрессии – 18/31 (58%). Варианты, приводящие к активации сигнального пути RAS-RAF-MEK выявлены у 9/29 (31%) пациентов, и у 9/31 (29%), соответственно. Варианты, приводящие к блокированию пути p53 обнаружены у 6/29 пациентов (20,7%) и 2/31 (6,5%), соответственно. В целом, абберрации в компонентах сигнальных путей RAS/p53 встречались у 15/29 (51,7%) и у 10/31 (32,3%) пациентов, соответственно.

Сравнительный анализ мутационного профиля ткани опухоли в дебюте заболевания и при развитии первого рецидива или прогрессии заболевания был выполнен 26 пациентам, у которых парные образцы были доступны для проведения высокопроизводительного секвенирования ДНК. Было показано, что мутационный профиль опухоли подвержен значительным вариациям и крайне нестабилен во времени.

Были проанализированы парные образцы 14 пациентов, изначально стратифицированных в группы наблюдения и промежуточного риска, из которых 2 больных развили системную прогрессию, как первое неблагоприятное событие, 12 – локальный рецидив или прогрессию. У одного пациента, развившего системную прогрессию заболевания, отмечено появление онкогенных вариантов в генах *SMARCA4* p.Q356\* и *NF1* p.G312\*. У второго пациента с системной прогрессией заболевания не определялось клинически значимых вариантов в ткани опухоли, как в дебюте заболевания, так и при прогрессировании, однако при цитогенетическом исследовании выявлено появление амплификации гена *MYCN*.

Развитие второго неблагоприятного события наблюдалось у 5/14 пациентов, которое в трех случаях носило системный характер, в двух – локальный. При этом, пациенты, у которых первое событие носило системный характер в последующем развивали метастатическую прогрессию. Один из пациентов после первой локальной прогрессии приобрел дополнительную мутацию в гене *TP53* p.V158G, блокируя тем самым путь p53 при сохранении активности каскада RAS-RAF-MEK за счет миссенс-мутации в гене *ALK*, и в последующем развил системную прогрессию заболевания, что может быть объяснено увеличением биологической агрессивности опухоли.

Развитие второго события локального характера наблюдалось у двух пациентов, в опухоли которых либо сохранялась, либо вновь приобреталась патологическая активация пути RAS-RAF-MEK за счет миссенс-мутаций в генах *HRAS* p.Q61R и *ALK* p.R1275Q.

Опухоль пациентов групп наблюдения и промежуточного риска, не развивших второе неблагоприятное событие (n=9), характеризовалась в 5 случаях потерей исходно выявленных нуклеотидных вариантов, которые в четырех случаях находились в генах, кодирующих белки, задействованные в онкогенном пути RAS-RAF-MEK, также в четырех случаях нуклеотидные варианты не были выявлены методом таргетного NGS ни в первичной опухоли, ни в рецидиве заболевания.

Таким образом, развитие системного характера события у пациентов группы «невысокого» риска во всех случаях ассоциировано с активацией пути RAS-RAF-MEK или активацией гена *TERT*. Благоприятное течение опухоли после локального прогрессирования в 45% (4/9) случаев было связано с потерей мутаций, активирующих путь RAS-RAF-MEK.

Из 12 пациентов группы высокого риска, парные образцы которых были доступны для высокопроизводительного секвенирования, трое развили локальную прогрессию/рецидив, как первое неблагоприятное событие, 9 – системную прогрессию или рецидив. Из трех пациентов, первое неблагоприятное событие у которых носило локальный характер, у 2 пациентов была отмечена утрата вариантов в генах *ALK* p.F1174L и *TP53* p.S241F, соответственно. Однако, несмотря на это, заболевание имело рефрактерное течение с летальным исходом в последующем. В одном случае ткань опухоли в дебюте заболевания и при развитии прогрессии отличалась отсутствием нуклеотидных вариантов.

Среди пациентов с системным неблагоприятным событием, у четырех отмечено появление новых онкогенных вариантов в генах *NF1*, *HRAS*, *POLD1*, а также формирование гипермутабельного фенотипа с появлением большого количества нуклеотидных вариантов с относительно малой ФАА. У одного пациента отмечено нарастание ФАА варианта гена *CREBBP* p.Q2235K в прогрессии заболевания с 24% до 55%. У другого пациента отмечена утрата инсерции без сдвига рамки считывания гена *PDGFRA* p.L839\_A840insM с появлением нового онкогенного варианта в гене *HRAS* p.D33N, которая поддерживала активность пути RAS-RAF-MEK.

Таким образом, в 66,7% случаев системная прогрессия заболевания у пациентов группы высокого риска ассоциируется с появлением новых aberrаций в компонентах пути RAS-RAF-MEK (33,3%), сохранением анергии пути p53 (11,1%) или нуклеотидных вариантов в генах, задействованных в репарации ДНК и поддержании стабильности генома (22,2%). В 33,3% случаев рецидивов НБ группы высокого риска не обнаруживается aberrаций при таргетном секвенировании. Локальная прогрессия заболевания характеризуется утратой вариантов в компонентах путей RAS/p53 в 66,7% случаев, однако, несмотря на это, в приведенных случаях в последующем развивалась фатальная системная прогрессия заболевания.

## ВЫВОДЫ

1. Семейные и наследственные формы НБ являются редким состоянием и характеризуются клинической и молекулярно-генетической гетерогенностью, с отсутствием рекуррентных герминальных aberrаций. Основными наследственными опухолевыми синдромами, ассоциированными с развитием НБ, в нашей когорте были нейрофиброматоз I типа (23%) и группа синдромов, связанных с дефектами в генах репарации ДНК (23%).

2. Мультифокальная форма НБ, выявляемая в 5,1% случаев, характеризуется ранним дебютом заболевания с медианой возраста на момент постановки диагноза 2 месяца, превалированием НБ с билатеральным поражением надпочечников (86%), и значительным удельным весом 4S стадии (49,1%). Различные первичные опухолевые очаги при МФНБ отличаются профилем несбалансированных геномных aberrаций и нуклеотидных вариантов, что подтверждает мультифокальность заболевания.

3. Опухоль в дебюте заболевания и при развитии рецидива или прогрессии опухоли характеризуется значительной молекулярно-генетической гетерогенностью: различия в

профиле несбалансированных геномных aberrаций выявляются в 95,3% случаев, в профиле нуклеотидных вариантов – в 45,5%. В 27,3% случаях в ткани опухоли, полученной в рецидиве заболевания, были выявлены генетические варианты в компонентах сигнальных путей RAS/p53, отсутствующие в первичной опухоли.

4. Системная прогрессия заболевания у пациентов групп наблюдения и промежуточного риска связана с активацией пути RAS-RAF-MEK в результате мутаций в соответствующих генах и/или гиперэкспрессией гена *TERT* во всех случаях, а в группе высокого риска – в 93,3%.

5. Потенциальные мишени для молекулярно-направленной терапии выявляются в 13,7% случаев, и в 11,3% представлены активирующими мутациями в тирозинкиназном домене гена *ALK*, определяющими чувствительность опухоли к ингибиторам ALK.

6. Первично-рефрактерное течение заболевания в 22,7% было связано с наличием онкогенных вариантов в гене *NF1*, носящих как соматический, так и герминальный характер.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам с отягощенным семейным анамнезом, фенотипическими особенностями, а также с наличием мультифокального заболевания показана консультация врача-генетика и проведение герминального тестирования методом NGS. При выявлении генетического синдрома может быть подобран индивидуальный план наблюдения за пациентом и членами семьи.

2. Для верификации МФНБ рекомендовано включать в диагностический протокол скинтиграфию с <sup>123</sup>I-МЙБГ с дополнительным протоколом ОФЭКТ/КТ, а также проводить при возможности биопсию с последующим морфологическим и молекулярно-генетическим исследованием всех доступных очагов для корректной стратификации пациента на группы риска и доказательства мультифокальной природы опухоли.

3. При развитии рецидива или прогрессии заболевания рекомендуется проведение повторной биопсии опухоли с последующим проведением цитогенетического и молекулярно-генетического исследования. Полученные данные могут служить основанием для выбора оптимального режима полихимиотерапии и назначения прецизионной терапии.

4. Ткань опухоли пациентов группы высокого риска при проведении первичной диагностики рекомендовано направлять для проведения NGS с целью обнаружения мишеней для таргетной терапии.

5. При выявлении активирующих мутаций в гене *ALK* у пациентов группы высокого риска, а также больных, развивших неблагоприятное событие, рекомендовано рассмотрение вопроса об интенсификации терапии за счет применения ALK-ингибиторов.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. ALK и нейробластома: от молекулярной генетики до клиники /Андреева Н.А., Друй А.Е., Шаманская Т.В., Качанов Д.Ю., Варфоломеева С.Р. //Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2019. Т. 6 № 2. С. 54–60.

2. Билатеральная адrenaльная нейробластома: клиническая картина, подходы к диагностике, терапии и результаты лечения /Андреева Н.А., Качанов Д.Ю., Ильина Е.Ю., Щербаков А.П., Терещенко Г.В., Ликарь Ю.Н., Друй А.Е., Рошин В.Ю., Ядгаров М.Я., Шаманская Т.В. //Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020. Т. 19. № 4. С. 66-81.

3. Герминальные и соматические генетические варианты NF1 при нейробластоме: собственный опыт и обзор литературы /Андреева Н.А., Шаманская Т.В., Качанов Д.Ю., Ясько Л.А., Курникова М.А., Абасов Р.Х., Друй А.Е. //Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2022. Т. 9. № 2. С. 29–38.

4. Сравнительный анализ генетического профиля нейробластомы в дебюте, рецидиве или прогрессии заболевания и определение прогностической роли генетических изменений /Андреева Н.А., Шаманская Т.В., Гегелия Н.В., Абасов Р.Х., Усман Н.Ю., Качанов Д.Ю., Друй А.Е. //Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2022. Т. 21. № 4. С. 18-30.

#### Список использованных сокращений

FDA – Федеральная служба по надзору за продуктами питания и лекарственными препаратами США (англ. Food and Drug Administration of the US)

FFPE – фиксированные в формалине парафиновые образцы (англ. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded)

FISH – флуоресцентная гибридизация in situ (англ. Fluorescence in situ hybridization)

INRGSS – международная система оценки стадии при нейробластоме, основанная на факторах риска при визуализации (англ. International Neuroblastoma Risk Group Staging System)

INSS – международная система стадирования нейробластомы (англ. International Neuroblastoma Staging System)

MLPA – метод мультиплексной амплификации лигированных (англ. Multiplex ligation-dependent probe amplification)

NGS – метод высокопроизводительного секвенирования (англ. Next-generation sequencing)

TERT1 – уровень экспрессии гена *TERT* в первичной опухоли

TERT2 – уровень экспрессии гена *TERT* в опухоли в рецидиве

<sup>123</sup>I-МЙБГ – метайодбензилгуанидин, меченный <sup>123</sup>I

БСВ – бессобытийная выживаемость

вБСВ – вторичная бессобытийная выживаемость

ВР – группа высокого риска

ГН – ганглионейрома

ГНБ – ганглионейробластома

ГР – группа риска

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная ДНК

КМ – костный мозг

МФНБ – мультифокальные формы нейробластомы

НБ – нейробластома

неВР – группа «невысокого» риска

ОВ – общая выживаемость

ОР – отношение рисков

ОТ-ПЦР – метод обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

ПХТ – полихимиотерапия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СНС – симпатическая нервная система

СПО – синдромы предрасположенности к опухоли

УЧК – увеличение числа копий

ФАА – фракция альтернативного аллеля