

На правах рукописи

Друй Александр Евгеньевич

**Идентификация и неинвазивная диагностика молекулярно-генетических
аббераций при периферических эмбриональных нейrogenных опухолях у
детей**

3.1.6. – Онкология, лучевая терапия

3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени доктора медицинских наук

Москва, 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Научные консультанты:

Качанов Денис Юрьевич – доктор медицинских наук, доцент, заведующий отделением клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Новичкова Галина Анатольевна - доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель ФГБУ «НМИЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты:

Поляков Владимир Георгиевич – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, советник директора НИИ детской онкологии и гематологии имени академика РАМН Л.А. Дурнова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Поляков Александр Владимирович – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией, главный научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики, профессор кафедры молекулярной генетики и биоинформатики Федерального государственного бюджетного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

Суспицын Евгений Николаевич – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник научной лаборатории молекулярной онкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доцент кафедры общей и молекулярной медицинской генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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 Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2025 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций 21.1.025.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства Здравоохранения Российской Федерации по адресу 117997, г. Москва, ул. Саморы Машела, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Федеральном Государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства Здравоохранения Российской Федерации по адресу 117997, г. Москва, ул. Саморы Машела, д. 1 и на сайте <http://www.fnkc.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Жуков Николай Владимирович

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Периферические нейрогенные эмбриональные опухоли являются производными клеток нервного гребня – предшественников адренергических нейронов симпатической нервной системы и хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников. Они составляют до 10% в структуре онкологической заболеваемости детей и подростков с частотой выявления 11-13 случаев на 1 миллион детского населения (Качанов Д.Ю., 2017; Yan P., 2020) и, в большинстве случаев, представлены нейробластомой (НБ) различной степени дифференцировки. Реже встречаются частично или полностью дифференцированные опухоли симпатической нервной системы (ганглионейробластома (ГНБ), ганглионейрома (ГН)). НБ вносит непропорционально высокий вклад в онкологическую смертность, что определяет актуальность фундаментальных, прикладных и клинических исследований данной опухоли (Шаманская Т.В., 2023).

НБ представляет собой одну из наиболее загадочных злокачественных опухолей, клинические проявления которой варьируют в широких пределах от форм, способных к спонтанной регрессии до высокоагрессивных, требующих проведения всех модальностей современного противоопухолевого лечения для спасения пациента (Matthay K.K., 2016, Грачев Н.С., 2020, Казанцев И.В., 2021, Кулева С.А., 2022). Среди НБ, характеризующихся благоприятным клиническим течением, распространён феномен созревания – самостоятельной или индуцированной трансформации злокачественной опухоли в доброкачественную, молекулярные механизмы которого продолжают оставаться предметом исследований (Brodeur G., 2018). Напротив, неблагоприятные формы НБ отличаются рецидивирующим течением, случаями первичной химиорезистентности и долгосрочной выживаемостью пациентов, не превышающей 50% (Li Q., 2023). Несмотря на морфологическую схожесть отдельных опухолей внутри установленных нозологических форм, периферические эмбриональные нейрогенные опухоли в значительной степени гетерогенны, что определяется различными молекулярно-генетическими событиями, лежащими в основе их патогенеза. Генетические aberrации определяют канцерогенез опухоли, агрессивность клинического течения и вероятность рецидива заболевания. Прогностические молекулярно-генетические маркёры являются основой проведения риск-адаптированной терапии эмбриональных нейрогенных опухолей.

Высокопроизводительные молекулярно-генетические технологии позволяют выявлять одновременно большое количество биомаркеров и определять прогноз при нейрогенных опухолях наиболее точно. Например, с помощью технологии сравнительной геномной гибридизации были выявлены количественные хромосомные aberrации (моно- и полисомии) в геноме благоприятных околотриплоидных НБ, 5-летняя бессобытийная выживаемость (БСВ) при которых превышает 90%. Напротив, неблагоприятные опухоли

характеризовались наличием сегментарных aberrаций – нарушений числа копий отдельных регионов генома различной протяжённости, затрагивающих отдельные гены, фрагменты или плечи хромосом. Пятилетняя БСВ больных НБ с наличием сегментарных хромосомных aberrаций находилась в диапазоне от 25 до 40% (Janoueix-Lerosey I., 2009). При использовании высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing, NGS) ДНК были выявлены реаранжировки, затрагивающие промоторный регион гена *TERT*, определяющие злокачественный фенотип НБ, а также патогенные варианты в генах, кодирующих компоненты сигнальных путей RAS-RAF-MEK и TP53, которые являются неблагоприятными молекулярно-генетическими маркерами. Таким образом удалось биологически охарактеризовать группу опухолей, клинически относящихся к НБ ультравысокого риска (Ackermann S., 2018, Meeser A., 2022). Кроме того, активирующие мутации в онкогенах, принадлежащих к сигнальному пути RAS-RAF-MEK, в первую очередь, в гене *ALK*, являются перспективными мишенями для молекулярно-направленной терапии (МНТ) опухоли (Foster J.H., 2021, Goldsmith K.C., 2023). Геномные варианты сопровождаются изменениями на уровне транскриптома клетки. Совокупность данных изменений составляет экспрессионный профиль НБ, различающийся для групп прогностически благоприятных и неблагоприятных опухолей. Отдельные исследовательские группы определили различные совокупности генов (от 14 до 330), экспрессия которых отличалась наиболее значимо, и создали на их основе молекулярные классификаторы (Ohira M., 2010, Oberthuer A., 2015, Gupta M., 2023). При этом, универсальный подход к анализу профилей экспрессии генов в клетках НБ, по-прежнему, отсутствует и применение молекулярных классификаторов в клинической практике требует их дальнейшей валидации.

В целом, результаты лечения больных НБ группы высокого риска в первой декаде XXI века продолжали оставаться неудовлетворительными: 5-летняя общая выживаемость (ОВ) не превышала 45% (Pinto N.R., 2015, Tas M.L., 2020). Важнейшим достижением стало применение иммунологических методов лечения, которое привело к значительному увеличению выживаемости пациентов, недостижимому ранее при использовании стандартных методов системной терапии и локального контроля, что ознаменовало собой начало «эры иммунотерапии» в лечении больных НБ высокого риска. Это, в первую очередь, относится к использованию моноклональных антител к дисиаialogанглиозиду GD2 (Ladenstein R., 2018, Yu A.L., 2021, Gorostegui M., 2024, Mora J., 2024). При этом отсутствуют предиктивные биомаркеры, позволяющие однозначно спрогнозировать эффективность иммунотерапии, а её применение не позволяет добиться контроля над заболеванием у всех пациентов. Это диктует необходимость системного изучения биологии опухоли с целью совершенствования прогностических биомаркеров и поиска мишеней для МНТ.

В современной практике в детской онкологии генетическое тестирование является обязательным для принятия решения об оптимальной интенсивности терапии периферических нейрогенных опухолей. Определение как валидированных, так и провизорных прогностических и предиктивных

молекулярно-генетических маркеров предполагает исследование ткани опухоли, полученной при проведении биопсии или резекции новообразования. Однако малый возраст пациентов и наличие жизнеугрожающих состояний может препятствовать проведению хирургического вмешательства и смещает фокус диагностики в сторону мало- или неинвазивных технологий. Современные технологии медицинской визуализации позволяют получать информацию не только о структуре опухоли и её топографии, но также оценивать суррогатные маркёры, свидетельствующие о биологической агрессивности НБ (Wang H., 2024).

Таким образом, исследование, направленное на изучение геномных и экспрессионных биомаркёров периферических нейrogenных эмбриональных опухолей, а также установление генотип-фенотипических корреляций между лабораторными показателями и данными методов лучевой диагностики (в том числе, количественной магнитно-резонансной томографии (МРТ)) является инновационным и актуальным.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время амплификация гена *MYCN* остаётся краеугольным камнем молекулярно-генетической стратификации пациентов с НБ на группы риска, но она не может объяснить все случаи агрессивного течения заболевания. Было продемонстрировано прогностическое значение отдельных aberrаций, сопровождающихся изменением числа копий генов и хромосомных регионов или их совокупности на уровне генома опухолевой клетки (Attiyeh E.F., 2005, Janoueix-Lerosey I., 2009), которые также нашли отражение в различных схемах определения групп риска.

Распространение технологии NGS ДНК позволило в значительной мере расширить представления о молекулярном патогенезе НБ. Было показано, что в геноме НБ, как и других опухолей детского возраста, количество соматических мутаций минимально (Alexandrov L.B., 2013, Gröbner S.N., 2018), но их число возрастает с увеличением опухолевой нагрузки (при метастатическом распространении и в рецидиве заболевания) (Molenaar J.J., 2012). Первоначальные данные о влиянии мутаций в генах, контролирующих нейритогенез (Molenaar J.J., 2012), на развитие НБ не нашли подтверждения в последующих работах, где было однозначно показано, что наиболее часто встречающимися нуклеотидными вариантами при НБ являются активирующие мутации в генах *ALK*, *NRAS*, *PTPN11* и инактивирующие в гене *ATRX* (Pugh T.J., 2013, Valencia-Sama I., 2020). Также был продемонстрирован феномен хромотрипсиса хромосомы 5, который впоследствии был признан механизмом активирующих перестроек промоторного региона гена *TERT*, ассоциированных с неблагоприятным течением опухоли (Valentijn L.J., 2015, Peifer M., 2015). Молекулярные механизмы, обеспечивающие поддержание длины теломер и, как следствие, репликативную иммортализацию клеток НБ, были признаны ведущим механизмом достижения и поддержания злокачественного фенотипа опухоли (Ackermann S., 2018, Burkert M., 2024, Avinent-Pérez M., 2025).

Работы, направленные на определение прогноза течения НБ и выбора терапевтических мишеней на основании экспрессионных характеристик опухоли, продолжаются по настоящее время (De Preter K., 2010, Aravindan N., 2019, Cheng J., 2024, Kendzersky N.M., 2025). Однако, в отличие от медуллобластомы (МБ), интракраниальной нейрогенной эмбриональной опухоли (Taylor M.D., 2012), консенсуса в определении молекулярных групп НБ нет, а создание компактной и надёжной экспрессионной панели остаётся актуальной задачей. Аналогично транскрипционным маркерам, активно изучаются неинвазивные суррогатные маркеры клинического течения НБ и ответа на терапию, основанные на количественных данных, получаемых при проведении визуализационных исследований (Ghosh A., 2023, Wang H., 2024).

Цель исследования

Идентифицировать новые клинически значимые молекулярно-генетические маркеры периферических нейрогенных эмбриональных опухолей у детей и установить их связь с данными количественной МРТ для совершенствования схем стратификации пациентов на группы риска и улучшения результатов лечения.

Задачи исследования

1. Провести анализ экспрессии белок-кодирующих генов в клетках НБ, и разработать классификатор на основании их дифференциальной экспрессии в образцах опухолей с различным клиническим течением;
2. Изучить влияние аномалий экспрессии генов малых некодирующих рибонуклеиновых кислот (РНК) на прогноз у пациентов с нейрогенными опухолями и выявить клинически-значимые микроРНК;
3. Оценить микроокружение и иммунореактивность нейрогенных опухолей на основании экспрессионного профилирования, а также проанализировать их влияние на клиническое течение заболевания;
4. Изучить молекулярные механизмы, лежащие в основе феномена созревания и спонтанной регрессии нейрогенных опухолей;
5. Определить клиническое значение генетических aberrаций (нуклеотидных вариантов и аномалий числа копий генов), выявляемых методом NGS опухолевой ДНК;
6. Оценить эффективность молекулярно-направленной терапии НБ ингибиторами ALK, проводимой на основании результатов NGS;
7. Установить зависимость между характеристиками периферических нейрогенных опухолей, выявляемыми с помощью количественной МРТ, и их морфологическими и молекулярно-генетическими свойствами.

Научная новизна

- Разработана оригинальная мультигенная экспрессионная панель на платформе nCounter (NanoString), позволяющая прогнозировать клиническое

течение НБ при анализе фиксированной и залитой в парафиновый блок ткани опухоли. Была установлена патогенетическая роль белковых продуктов генов, включённых в классификатор.

- Впервые было продемонстрировано негативное прогностическое значение глобальной дисрегуляции микроРНК в клетках НБ. Также впервые получены данные о клиническом значении потери экспрессии онкосупрессорной микроРНК *miR-128-3p*, а также о комплементарности данного маркера с гиперэкспрессией гена *TERT*.

- Впервые при анализе образцов нейрогенных опухолей, сопровождающихся развитием синдрома опсоклонус-миоклонус (ОМС), показана гетерогенность опухолей, связанная с их различной иммуногенностью и степенью взаимодействия с клетками реактивного микроокружения. Было показано, что в образцах иммуногенных опухолей происходит индукция как клеточного, так и гуморального иммунного ответа, а также NK-клеток, а полноценной реализации цитотоксичности препятствует экспрессия генов *PDCD1 (PDI)* и *CTLA4*, белковые продукты которых могут выступать в качестве мишеней для фармакологического воздействия.

- Впервые были продемонстрированы идентичные молекулярные механизмы созревания НБ и центральных нейрогенных опухолей, для которых данный феномен является чрезвычайно редким. Были выявлены два молекулярных пути дифференцировки опухолевых клеток: первый, связанный с TgkA-зависимым сигнализированием, характерный для спонтанной регрессии или созревания НБ у пациентов младше 18 мес., и второй, ассоциированный с изменением экспрессии транскрипционных факторов и эпигенетических регуляторов, типичный для дифференцировки опухоли у старших пациентов в ответ на терапию. В процессе созревания опухолей ЦНС были отмечены оба механизма.

- Было определено пороговое значение возраста манифестации НБ – 6,58 лет, связанное с более частым обнаружением aberrаций гена *ATRX*, которые позволили объективизировать второй возрастной период смены биологии и клинического поведения с переходом к индолентным, прогрессивно прогрессирующим формам НБ.

- Впервые в РФ продемонстрирована эффективность применения ингибиторов ALK, назначенных на основании выявления соответствующих активирующих мутаций, и позволяющих добиться объективного ответа опухоли в 66,7% случаев в сочетании с химиотерапией.

- Показана возможность реализации в клетках НБ таких агностических предиктивных феноменов, как микросателлитная нестабильность (впервые) и высокая мутационная нагрузка, которые указывают на потенциальную эффективность применения ингибиторов контрольных точек иммунного ответа.

- Определён пороговый уровень измеряемого коэффициента диффузии (ИКД) опухоли, позволяющий дифференцировать случаи НБ с наличием и отсутствием амплификации гена *MYCN* на основании данных количественной МРТ. Также показано независимое прогностическое значение величины ИКД и

геномного типа опухоли, определённого на основании профиля несбалансированных геномных aberrаций.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Проведённый анализ транскриптомных характеристик нейрогенных опухолей позволил выявить совокупность генов, дифференциальная экспрессия которых позволяет определить прогноз заболевания. Было установлено, что белковые продукты генов, включённых в классификатор, имеют значение в молекулярном патогенезе НБ: ассоциированные с благоприятным течением заболевания кодируют факторы дифференцировки нервных клеток, контроля клеточного цикла и апоптоза, противоопухолевого иммунного ответа. Напротив, гены, гиперэкспрессированные в неблагоприятных, опухолях принадлежат к протоонкогенам, задействованы в репликации ДНК, синтезе нуклеотидов и обмене полиаминов. Компактная таргетная панель может быть проанализирована с помощью технологии NanoString или мультиплексной количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, что снижает требования к качеству выделенной РНК и повышает доступность исследования по сравнению с высокопроизводительными технологиями экспрессионного профилирования. Повышенная экспрессия в клетках агрессивных НБ гена *ODC1*, кодирующего орнитин-декарбоксилазу – ключевой фермент биосинтеза полиаминов – обосновывает возможность терапевтического применения специфического ингибитора диформетилорнитина.

Впервые продемонстрированное в работе глобальное снижение экспрессии микроРНК в клетках неблагоприятных НБ позволяет рассматривать его, как один из механизмов канцерогенеза, а анализ генных сетей указывает на дисрегуляцию биологических процессов, происходящих в клетке на фоне дефицита посттранскрипционной репрессии генов. Данный феномен не имеет непосредственного практического значения, тогда как потеря *miR-128-3p*, особенно в совокупности с гиперэкспрессией гена *TERT*, может служить прогностическим фактором, определяющим агрессивное течение НБ.

Разделение образцов НБ по степени взаимодействия с клетками микроокружения на «иммунологически-холодные» и «иммунологически-горячие» опухоли не показало непосредственного прогностического значения или предиктивной роли в отношении эффективности анти-GD2 иммунотерапии. Однако наличие экспрессии генов *PDCD1* (PD1) и *CTLA4* указывает на торможение противоопухолевого иммунного ответа на фоне массивной инфильтрации опухоли цитотоксическими Т, В и НК-клетками в случае «иммунологически-горячей» НБ. Данное наблюдение позволяет предполагать эффективность моноклональных антител – ингибиторов контрольных точек иммунитета, а степень взаимодействия опухоли с микроокружением рассматривать как предиктивный маркер в соответствующих клинических исследованиях. В пользу данной теории говорят отдельные случаи НБ, сопровождающиеся высокой мутационной нагрузкой (Tumor Mutation Burden,

ТМВ) или микросателлитной нестабильностью (Microsatellite Instability, MSI), принадлежащие к кластеру «иммунологически-горячих» опухолей.

Анализ механизмов созревания нейрогенных опухолей имеет важное теоретическое значение, поскольку доказывает их общность среди НБ и первичных опухолей ЦНС. В данном исследовании было показано, что сохранение сигнализирования через пути RAS-RAF-МЕК и PI3K-AKT-mTOR является непреложным условием реализации феномена созревания. Снижение степени злокачественности опухолей сопровождалось нарастанием их иммуногенности, снижением геномной нестабильности и торможением клеточного цикла. Были охарактеризованы два механизма дифференцировки нейрогенных опухолей – зависимый от нейротрофинового сигналинга и связанный с эпигенетической регуляцией и активностью транскрипционных факторов. Перспективным направлением может стать разработка методов лекарственного воздействия на опухоль с целью индукции её созревания.

Технология NGS опухолевой ДНК широко распространена в клинической онкологии и направлена, в первую очередь, на выявление маркеров чувствительности (или резистентности) к препаратам МНТ. В настоящем исследовании было продемонстрировано, что данный метод может успешно применяться для выявления нуклеотидных замен, коротких делеций и инсерций нуклеотидов, а также аномалий числа копий генов. Согласно полученным данным, наиболее часто абберации затрагивали гены *ATM*, *ALK*, *ATRX*, *PTEN*, *BRCA2* и, в большинстве своём, были представлены аномалиями числа копий (за исключением *ALK*, где преобладали миссенс-мутации). Несмотря на широкую распространённость аббераций в генах *ATM* и *BRCA2*, ни в одном случае не было зафиксировано их биаллельной инактивации и реализации феномена дефицита гомологичной рекомбинации ДНК (HRD, homologous recombination deficiency). Важным клиническим значением обладали мутации в гене *ALK*, послужившие основанием для интенсификации терапии за счёт использования соответствующих ингибиторов, и абберации в гене *ATRX* (нуклеотидные варианты и делеции, в том числе, отдельных экзонов), позволившие объяснить клинический феномен «подростковой НБ». Неожиданной находкой явилось крайне неблагоприятное прогностическое значение аббераций гена *NOTCH1*, вероятно, связанное с индукцией адренергическо-мезенхимального перехода клеток.

Важной с практической точки зрения представляется возможность определения гистологического типа нейрогенной опухоли и наличия амплификации гена *MYC* на основании ИКД патологической ткани. Проведение количественной МРТ позволяет полностью проанализировать массив патологического очага, в том числе, в местах недоступных для стандартной биопсии, что важно в условиях выраженной внутриопухолевой гетерогенности, например, для диагностики прогностически-неблагоприятной нодулярной ГНБ.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнена в соответствии с задачами исследования. На первом этапе работы была проанализирована мировая литература по теме исследования с использованием баз Pubmed, Google Scholar и Elibrary. На втором этапе осуществлялось исследование транскрипционных свойств опухолей с применением технологии NanoString и количественной ПЦР с обратной транскрипцией, в том числе, для профилирования микроРНК и оценки экспрессии генов, задействованных во взаимодействии клеток опухоли и микроокружения. На третьем этапе с использованием разнообразных молекулярно-генетических и морфологических методик были исследованы случаи центральных и периферических нейрогенных опухолей, подвергшихся созреванию. Направление пациентов с НБ группы высокого риска и с рецидивирующим / рефрактерным течением на исследование методом NGS преследовало цель поиска предиктивных маркеров (в первую очередь, мутаций в гене *ALK*) и носило проспективный характер. На завершающем этапе исследования анализировалось соответствие данных количественной МРТ, морфологических и молекулярно-генетических характеристик периферических нейрогенных опухолей.

Полученные результаты работы были проанализированы с использованием методов биоинформатики и биомедицинской статистики.

Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту

1. У пациентов с НБ экспрессионный профиль белок-кодирующих генов является предиктором прогноза заболевания. Повышенная экспрессия генов *ULK2*, *WSB1*, *CLSTN1*, *EPN2*, *MAP7*, *AKR1C1*, *PRKACB*, *MAPT*, *HIVEP2*, *INPP1*, *SAMTA2*, *ARHGEF7* ассоциирована с благоприятным течением заболевания, а генов *CDKN3*, *MCM2*, *TYMS*, *CDC45*, *BIRC5*, *ODC1*, *NME1*, *AHCY*, *PAICS* и *TERT* – с неблагоприятным. На основании дифференциально экспрессирующихся генов может быть создана диагностическая панель, пригодная для анализа фиксированных образцов ткани опухоли.

2. Неблагоприятные НБ характеризуются глобальным снижением экспрессии малых некодирующих РНК. Основными биологическими процессами, вышедшими из-под негативной пост-транскрипционной регуляции, являются контроль клеточного цикла и митоза, ответ клетки на эндогенный стресс, сигнализирование с помощью ГТФаз Rho, *TP53*-зависимая транскрипционная программа. Значимым негативным прогностическим вкладом обладает потеря экспрессии онкосупрессорной miR-128-3p, которая комплементарно дополняет гиперэкспрессию гена *TERT*.

3. На основании анализа дифференциальной экспрессии генов, вовлечённых во взаимодействие клеток опухоли и микроокружения, в сбалансированных по клиническим параметрам группах опухолей с наличием и отсутствием ОМС, выделена экспрессионная сигнатура, позволяющая разделить иммуногенные и неиммуногенные случаи НБ. Наряду с MSI и высокой ТМБ, которые выявляются

в отдельных случаях, данная сигнатура может рассматриваться, как предиктивный маркер для терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа.

4. Молекулярные механизмы созревания нейрогенных опухолей идентичны для опухолей интра- и экстракраниальной локализации. Опухоли, подвергшиеся созреванию, имеют конститутивную активацию сигнальных путей RAS-RAF-MEK и PI3K-AKT-mTOR и, в значительной доле случаев, мутации в генах, кодирующих компоненты данных путей (*BRAF*, *PTEN*, *PTPN11*, *HRAS*, *NF1*). При созревании НБ у пациентов в возрасте младше 18 мес. преобладает *NTRK1*-зависимое сигнализирование, а среди больных НБ старше 18 мес. – изменение активности транскрипционных факторов и эпигенетических модификаторов (*HDAC2*, *HDAC10*, *DNMT3A*, *EZH2*, субъединиц комплекса SWI/SNF). При созревании опухолей ЦНС задействованы оба механизма.

5. При проведении NGS ДНК прогностически неблагоприятных НБ основными выявляемыми клинически-значимыми биомаркерами являются миссенс-мутации в гене *ALK* и различные абберации гена *ATRX*. Первые являются основанием для интенсификации терапии ингибиторами ALK, которая позволяет добиться контроля над заболеванием в 83,4% случаев. Вторые позволяют объективизировать второй возрастной период смены биологических свойств и клинического течения НБ и объяснить феномен «подростковой НБ».

6. Значения ИКД опухоли, получаемые при проведении МРТ в дебюте заболевания, позволяют достоверно дифференцировать нейрогенные опухоли бедные и богатые шванновской стромой, а также с наличием и отсутствием амплификации гена *MYCN*. Среди пациентов с нормальным количеством копий гена *MYCN* величина ИКД и геномный тип опухоли, определённый на основании профиля несбалансированных хромосомных аббераций, обладают независимым прогностическим значением.

Внедрение результатов работы в клиническую практику

Результаты работы внедрены в практику лаборатории молекулярной онкологии; отдела лучевой диагностики; отделений клинической онкологии; онкологии / гематологии старшего возраста; нейроонкологии; детской онкологии и хирургии; детской онкологии, хирургии головы и шеи и нейрохирургии; патологической анатомии ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Д. Рогачёва. Результаты исследования были включены в клинические рекомендации Министерства здравоохранения РФ по лечению пациентов с НБ от 24.01.2025 (ID:78_2 «Нейробластома»).

Также определение экспрессии генов *TERT* и miR-128-3p для оценки прогноза у пациентов с НБ внедрено в практику лаборатории молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница» (ОДКБ), Екатеринбург. Разработанная мультигенная панель для таргетного NGS опухолевой ДНК внедрена в ГАУЗ СО «ОДКБ», Екатеринбург, а также ФГБУ НМИЦ имени В.А. Алмазова и ООО

«Лечебно-диагностический центр медицинского института биологических систем имени С. Березина», Санкт-Петербург.

Полученные результаты используются в образовательном процессе при обучении клинических ординаторов, аспирантов, при профессиональной переподготовке врачей детских онкологов / гематологов и врачей клинической лабораторной диагностики на базе кафедры Детской онкологии, клинической онкологии и радиологии и кафедры Клинической лабораторной диагностики и трансфузиологии ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Д. Рогачёва.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность представленных результатов обеспечена скрупулёзным анализом литературных источников, использованием современных молекулярно-генетических, морфологических, иммуногистохимических (ИГХ) и визуализационных методов исследования, а также биоинформатических и статистических инструментов для обработки данных. В исследование было включено 534 уникальных пациента с периферическими нейрогенными опухолями, включая 464 с НБ различной степени дифференцировки, 47 – ГНБ, 23 – ГН. Кроме того, для решения поставленных задач использовались группы сравнения, куда вошли образцы глиом высокой и низкой степени злокачественности, МБ групп WNT и SHH, эмбриональной опухоли ЦНС с многослойными розетками (ETMR, embryonal tumor with multilayered rosettes), супратенториальной эпендимомы группы RELA, атипичской тератоид-рабдоидной опухоли, сарком с перестройкой генов протеинкиназ, саркомы Юинга, альвеолярной рабдомиосаркомы.

Основные результаты работы были представлены на следующих научно-практических конференциях: III, IV, V Петербургские международные онкологические форумы «Белые ночи», Санкт-Петербург, 23–25.07.2017, 5–8.07.2018, 20–23.05.2019; 49, 50, 51, 52 Конгрессы Международного общества детской онкологии (SIOP, International Society of Paediatric Oncology), Вашингтон, 12–15.10.2017, Киото 16–19.11.2018, Лион 23–26.10.2019, онлайн 14–17.10.2020; 2 KiTZ (Kindertumorzentrum) Симпозиум по детской онкологии и гематологии, Хайдельберг, 24–25.01.2018; Встречи «Достижения в исследовании нейробластомы» (ANR, Advances in Neuroblastoma Research), Сан-Франциско, 9 – 12.05.2018, Амстердам 15–18.05.2023; 16 Международная встреча по детской гематологии и онкологии (IPHOUM, International Paediatric Haematology and Oncology Update Meeting), Эдинбург, 6–7.09.2018; Встречи пользователей NanoString, Москва 25.10.2018, онлайн 10.10.2020, онлайн 12.04.2023; III, V, VI Школы по диагностике и лечению эмбриональных опухолей, Москва, 9.11.2018, 2.10.2020, 30.09.2021; Конференции «Опухолевые маркёры: фундаментальные и клинические аспекты», Горно-Алтайск 3–5.07.2019, 4.08.2022, 26.07.2023, 30.07.2024; XXIII, XXVI Российские онкологические конгрессы, Москва, 12 – 14.11.2019; 16–17.11.2022; Форум «Клинические и фундаментальные исследования биомаркеров», онлайн, 18–19.11.2020; Встречи пользователей продукции Qiagen, Москва, 7.04.2021, Алматы 16.09.2022; Российский конгресс

«Детская онкология, гематология и иммунология XXI века: от науки к практике», Москва, 27–29.05.2021; V Международный форум онкологии и радиотерапии For Life, Москва, 22.09.2021; 3 Научно-практическая онлайн-конференция Российского общества медицинской генетики «Новые технологии в диагностике и лечении наследственных болезней», онлайн 19.10.2021; 2 Российский клинко-лабораторный симпозиум с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование (NGS) в клинической онкологии», Москва, 8–9.12.2021; I Школа по синдромам предрасположенности к опухолевым заболеваниям, Москва, 20.05.2022; Научно-практическая конференция «Инновационные методы лечения онкологических и гематологических заболеваний у детей», Санкт-Петербург, 21.05.2022; III Школа по детской онкохирургии, Москва, 6.12.2022; Всероссийская научно-практическая конференция «Лабораторная онкогенетика. Проблемы и перспективы», Екатеринбург, 17.02.2023; XXVII Всероссийская научно-практическая конференция «Наукоёмкие лабораторные технологии для клинической практики». Лабораторная диагностика – 2023, Москва, 20–22.03.2023; Всероссийский конгресс с международным участием «Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике», Москва, 1–3.06.2023; Конференция «Молекулярная диагностика», Москва, 14–15.11.2023, I Школа по детской нейроонкологии и нейрохирургии, Москва, 29.03.2024, Международная научно-практическая конференция «NGS в медицинской генетике (MGNGS)», Суздаль, 24–26.04.2024; XV, XVI Конгрессы Азиатского подразделения Международного общества детской онкологии (SIOP Asia), Ереван, 18–21.05.2023, Йокогама, 22–25.06.2024; 12 Всероссийская научно-практическая конференция центров геномных исследований мирового уровня «Геномное секвенирование и редактирование 2024», Москва, 22.05.2024; 2 Научно-практическая конференция «Новые горизонты в диагностике онкологических и онкогематологических заболеваний у детей и взрослых», Екатеринбург, 23–24.08.2024; Российский конгресс «Актуальные вопросы детской онкологии и онкохирургии» 26–28.09.2024; Научно-практическая конференция «Редкие онкологические и гематологические заболевания. Кооперированные исследования», Москва, 15–16.11.2024; Научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика в онкологии», Нижний Новгород, 18–19.01.2025.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационной работы были опубликовано 36 научных работ, из них 18 статей в медицинских журналах, рекомендованных высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования РФ по специальностям 3.1.6. «Онкология, лучевая терапия» и 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика», а также 3 статьи в зарубежных научных журналах. Издано учебное пособие «Нейробластома у детей и подростков: эпидемиология, клиническая презентация и диагностика» (ISBN 978-5-6049854-2-7).

Личный вклад автора

Автором был разработан дизайн исследования, проведён анализ литературных данных, выполнено изучение транскрипционных характеристик опухолей, в том числе, экспрессии белок-кодирующих генов, малых некодирующих РНК и генов, продукты которых вовлечены в противоопухолевый иммунный ответ. Диссертант принимал участие в проведении NGS и интерпретации данных, а также их коллегиальном обсуждении на междисциплинарном «молекулярном» консилиуме с решением вопроса о назначении таргетной терапии (ТТ). Автор участвовал в сопоставлении данных молекулярно-генетических технологий с результатами морфологического исследования и количественной МРТ. Диссертантом осуществлён расчёт и статистический анализ количественных параметров, лежащих в основе работы.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 343 страницах машинописного текста и состоит из глав «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Экспрессионная гетерогенность нейрогенных опухолей», «Иммунология нейрогенных опухолей. Исследование взаимодействия опухоли и микроокружения», «Исследование молекулярных механизмов феномена созревания нейрогенных опухолей», «Анализ клинического значения генетических aberrаций, выявленных методом высокопроизводительного секвенирования ДНК», «Установление взаимосвязи между молекулярно-генетическими характеристиками и радиологическим фенотипом опухоли. Радиогеномика периферических нейрогенных опухолей», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Практические рекомендации». Отдельно представлены список используемых сокращений и перечень литературных источников, включающий 517 публикаций (24 отечественные и 493 зарубежные). Работа содержит 33 таблицы и иллюстрирована 98 рисунками.

Основное содержание работы

Материалы и методы исследования

Общие сведения об исследовании и включенные в него пациенты

Исследование было выполнено на базе ФГБУ НМИЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачёва Минздрава РФ и носило моноцентровый ретроспективно-проспективный характер (2013 – 2024 гг.). В анализ было включено 534 уникальных пациента детского возраста с верифицированным диагнозом периферической нейрогенной эмбриональной опухоли. Инициальные характеристики пациентов исследуемой группы были следующими: гистологический диагноз НБ был установлен у 464 пациентов (86,9%), ГНБ – у 47 (8,8%) и ГН – у 23 (4,3%) больных. Стадию 1 (International Neuroblastoma Staging System, INSS) имели 92 пациента, стадию 2 – 80; стадию 3 – 64; стадию 4 – 251 и стадию 4S – 47 больных. Медиана возраста больных составила 2,10 г. (диапазон 0,24 мес. – 22,28 г.) Согласно схеме стратификации протокола NB2004, в группу наблюдения были отнесены 228, в группу промежуточного риска – 53 и в группу высокого риска – 253 пациента. Медиана времени наблюдения за пациентами составила 4,60 лет (диапазон 0,12 мес. – 11,29 лет). Стадирование осуществлялось на основании результатов компьютерной томографии, МРТ, сцинтиграфии с ¹²³I-MIBG, миелограммы и ИГХ исследования трепанобиоптатов костного мозга. Стандартные генетические маркеры (амплификация гена *MYCN*, делеция / дисбаланс 1p, 11q) оценивались с помощью FISH и/или MLPA. Лечение осуществлялось в соответствии с оригинальным протоколом NB2004 и его модификацией (Berthold F., 2017, Шаманская Т.В., 2023). Дополнительными критериями включения пациентов в проспективное исследование (2018 – 2024 гг.), основной целью которого был поиск предиктивных молекулярных маркером методом NGS, служили:

1. Рецидив или прогрессия заболевания при исчерпании терапевтических возможностей, хорошем соматическом статусе (индекс Карновского >50%) и ожидаемой продолжительности жизни более 6 месяцев;
2. Стратификация пациента в группу высокого риска, согласно протоколу NB2004 и его модификациям;
3. Необходимость уточнения диагноза с помощью молекулярно-генетических маркеров при нетипичной локализации новообразования (тимус, почка, матка) или анализа гистогенетической связи опухолей при мультифокусном поражении.

Данным критериям включения удовлетворяло 270 пациентов, медиана времени наблюдения за которыми составила 3,73 г. (диапазон 0,12 мес. – 11,12 лет). При выявлении предиктивных биомаркеров пациент обсуждался на междисциплинарном «молекулярном» консилиуме, где коллегиально принималось решение о проведении таргетной терапии (n=20, во всех случаях были назначены ингибиторы ALK).

Молекулярно-генетические методы исследования

Исследование молекулярно-генетических характеристик опухоли осуществлялось с использованием нативной (n=155) или фиксированной и залитой в парафиновый блок (n=315) ткани опухоли. Для анализа экспрессии генов применялись гибридационные чипы Agilent (Германия, n=26) и кастомизированные панели NanoString (США, n=91). Исследование онкогенных сигнальных путей, взаимодействия клеток опухоли с реактивным микроокружением и профиля экспрессии микроРНК проводилось на основании анализа тотальной РНК, выделенной из ткани опухоли с применением панелей nCounter Human PanCancer Pathways Panel (n=21), PanCancer Immune Profiling Panel (n=71) и Human v3 miRNA Assay (n=24), NanoString, США. Экспрессия генов, не вошедших в таргетные панели (*TERT*, *PHOX2B*), а также miR-128-3p оценивалась с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени. Для выявления генетических вариантов в исследовании применялись кастомизированные таргетные панели QIAseq (Qiagen, Германия, n=185) и Prep&Seq U-panel (ParSeq Lab, Россия, n=85), включающие гены, задействованные в молекулярном патогенезе новообразований у детей, и мутации в которых определяют чувствительность опухоли к препаратам МНТ.

Специфические задачи, включающие анализ MSI, HRD и расчёт TMB, решались с использованием панелей для NGS Соло-тест Атлас Плюс (OncoAtlas, Россия, n=5), AmoyDx HRD Focus Panel (Amoy Diagnostics, Китай, n=9) и кастомизированной панели QIAseq Targeted DNA Human TMB Panel (Qiagen, Германия, n=40), соответственно. Исследование несбалансированных aberrаций (n=28) осуществлялось методом сравнительной геномной гибридизации, совмещённым с анализом однонуклеотидных полиморфизмов с использованием реагентов и чипов CytoSure Cancer + SNP Arrays 4×180K (OGT, Великобритания).

Кроме того, для решения поставленных задач была сформирована группа сравнения, которая включала 82 пациента с различными опухолями детского возраста (астроцитарные глиомы, веретеночлеточные саркомы с перестройкой генов семейства NTRK, МБ групп WNT и SHH, эпендимомы группы RELA, ЕТМР, атипичические тератоид-рабдоидные опухоли, саркома Юинга и альвеолярная рабдомиосаркома), которые были охарактеризованы морфологически и молекулярно.

Анализ данных количественной МРТ

110 пациентам с опухолями паравертебральной локализации и надпочечников, которые впоследствии были верифицированы, как нейрогенные, до проведения хирургических и терапевтических вмешательств было проведено МРТ исследование с выполнением диффузионно-взвешенных изображений (DWI) и построением карт диффузии по 3 b-факторам (50; 600; 800). Все исследования состояли из стандартных МРТ последовательностей области шеи, органов грудной клетки, брюшной полости, малого таза в зависимости от зоны интереса. Выбор трёх зон интереса ИКД выполнялся тремя независимыми рентгенологами в

объёме опухоли на 3 разных срезах в солидном компоненте с одинаковой площадью 10 мм². Учитывалось среднее значение ИКД, полученное при исследовании трёх зон интереса.

Биоинформатическая и статистическая обработка данных

Обработка данных экспрессионного анализа опухолей осуществлялась с помощью пакетов программ nSolver Analysis Software 4.0, Rosalind и Partek Genomics Suite (США), где осуществлялся неконтролируемый кластерный анализ и расчет дифференциальной экспрессии генов с построением графиков-вулканов. Различия в экспрессии генов между анализируемыми группами считались достоверными при кратном изменении экспрессии $>1,5$ и $< -1,5$ (в отдельных сравнениях $>2,0$ и $< -2,0$) и значении p с поправкой на множественные сравнения (False Discovery Rate, $FRD < 0,01$). Принадлежность белковых продуктов генов к биологическим процессам и внутриклеточным сигнальным путям определялась с помощью баз знаний Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) и Reactome Pathway Database. Анализ степени активации сигнальных путей проводился на основании расчета направленных глобальных коэффициентов значимости.

Этапы биоинформатической обработки данных NGS для поиска генетических вариантов включали: очистку входных данных в формате fastq; картирование последовательностей на референсную последовательность генома человека (GRCh37 или GRCh38); маркировку оптических и ПЦР дубликатов; поиск и аннотацию генетических вариантов. Отдельно проводился анализ аномалий числа копий генов на основании данных таргетного NGS.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с использованием программ XLStat Life Sciences (Lumivero, США) и StatTech (Россия). Тип распределения количественных данных оценивался с помощью критериев Шапиро-Уилка и Лилиефорса. Сравнение количественных переменных в двух группах проводилось с помощью критерия Манна-Уитни, в большем количестве групп – Крускала-Уоллиса. При использовании последнего вводилась поправка Данна-Шидака на множественную проверку гипотез и применялась корректировка Бонферрони. Для установления взаимосвязи между качественной и количественной переменными применялся анализ характеристических (Receiver Operating Characteristic, ROC) кривых.

Оценивались показатели ОВ и БСВ. Функция выживания оценивалась с помощью метода Каплана-Майера, сравнение кумулятивной выживаемость в различных группах осуществлялось с использованием log-rank критерия. При сравнении вероятности выживания более, чем в двух группах вводилась поправка Данна-Шидака. С целью оценки вклада отдельных факторов риска в вероятность развития неблагоприятного события был использован многофакторный анализ с помощью регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса. Оценка данных выживаемости пациентов была осуществлена по состоянию на 24 августа 2024.

Результаты исследования и обсуждение

Экспрессионная гетерогенность нейрогенных опухолей

На основании анализа опубликованных экспрессионных классификаторов НБ была создана собственная панель, реализованная на платформе NanoString, включающая 46 генов, профиль экспрессии которых был оценён в ткани опухоли 43 пациентов. Распределение пациентов по стадиям заболевания было следующим: стадия 1 – 11 больных, стадия 2 – 11, стадия 3 – 2, стадия 4 – 12, стадия 4S – 7 пациентов. 26 (60,5%) пациентов были стратифицированы в группу наблюдения, согласно критериям протокола NB2004, 17 (39,5%) – в группу высокого риска. Медиана возраста составила 0,87 года (диапазон 1,08 мес. – 6,06 лет), 25 (58,1%) пациентов были младше одного года. Амплификация гена *MYCN* была выявлена у 10 (23,3%) больных; делеция / дисбаланс короткого плеча хромосомы 1 (1p) – у 10 (23,3%); делеция / дисбаланс длинного плеча хромосомы 11 (11q) – у 2 (4,7%) пациентов. Среди 26 пациентов группы наблюдения, у 13 было зафиксировано развитие неблагоприятного события (6 случаев локальной прогрессии, 6 – системной прогрессии, 1 – смерть, связанная с осложнениями терапии). Группа была искусственно обогащена случаями агрессивного течения заболевания, поскольку именно среди пациентов с НБ низкого риска, определённой на основании конвенциональных критериев, экспрессионное профилирование имеет наибольшую диагностическую ценность. В группу больных НБ высокого риска, напротив, включались, в первую очередь, пациенты без неблагоприятного события, при этом в 4 случаях была отмечена системная прогрессия заболевания, в индивидуальных случаях – локальная прогрессия и смерть, связанная с осложнениями терапии.

Профиль экспрессии генов в опухоли принципиально различался в зависимости от развития неблагоприятного события, но не зависел от конвенциональной группы риска. Представленность транскриптов *ULK2*, *WSB1*, *CLSTN1*, *EPN2*, *MAP7*, *AKR1C1*, *PRKACB*, *MAPT*, *HIVEP2*, *INPP1*, *SAMTA2*, *ARHGAP7* была значимо снижена в опухолях, характеризующихся развитием неблагоприятного события ($FDR < 0,001$), в то время как экспрессия генов *ODC1*, *NME1*, *AHCY*, *PAICS*, *CDKN3* ($p < 0,01$), *MCM2* ($p < 0,05$), а также *TYMS*, *CDCA5* и *BIRC5* (на уровне тенденции), напротив, была повышена.

На основании дифференциальной экспрессии генов в ткани НБ с различным клиническим течением, была определена панель, включающая 21 транскрипт, анализ которых может быть использован для прогнозирования развития неблагоприятного события. Картирование генов на референсные сигнальные пути позволило установить принадлежность белковых продуктов генов, экспрессирующихся в благоприятных опухолях к метаболическим путям в клетке («Биосинтез аминокислот», «Метаболические пути», «Метаболизм фруктозы и маннозы», «Гликолиз и глюконеогенез», «Метаболизм углеводов», «Метаболизм инозитол-фосфата»), а генов, активированных в агрессивных опухолях – преимущественно, к онкогенным каскадам и биосинтезу нуклеиновых кислот («Метаболизм пиримидинов», «Резистентность к антифолатам», «МикроРНК при

опухолях», «Апоптоз», «Репликация ДНК», «Клеточный цикл»). Анализ нормализованной величины экспрессии данных генов привёл к разделению случаев на две группы (Рисунок 1), показатели выживаемости в которых драматически различались. Пятилетняя БСВ в неблагоприятной группе составила $16,7 \pm 8,8\%$, в благоприятной – $94,7 \pm 5,1\%$, $p < 0,001$. Случаев рецидива или прогрессии основного заболевания во второй группе зафиксировано не было, а единственным событием была смерть, связанная с осложнениями терапии. ОВ пациентов с НБ, принадлежащей к благоприятному экспрессионному кластеру также была выше, однако различия не достигли статистической значимости: $94,7 \pm 5,1\%$ и $70,9 \pm 11,0\%$, $p = 0,069$, Рисунок 2.

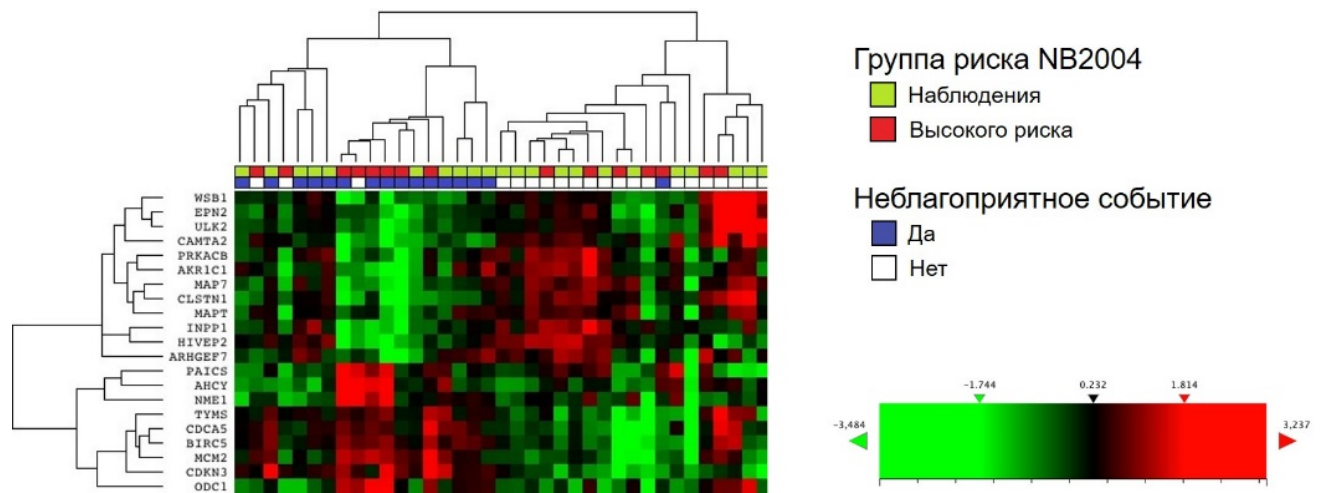


Рисунок 1 – Неконтролируемая иерархическая кластеризация образцов НБ на основании нормализованной величины экспрессии селектированных генов

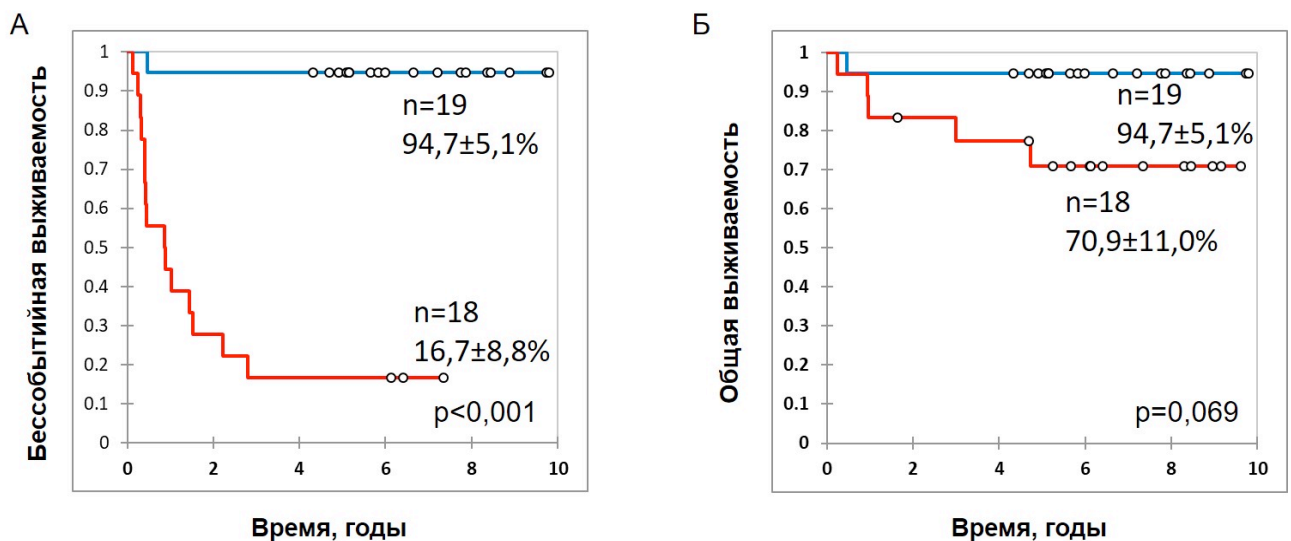


Рисунок 2 – Бессобытийная (А) и общая (Б) выживаемость пациентов в группах, разделённых на основании дифференциальной экспрессии селектированных генов. Красная кривая соответствует пациентам, кластеризованным в неблагоприятную группу, синяя – в благоприятную

Неблагоприятный профиль экспрессии генов был единственным предиктором наступления неблагоприятного события, сохраняющим своё значение при проведении многофакторного анализа влияния клинических (возраст, стадия заболевания, группа риска NB2004) и генетических (экспрессионная группа, статус 1p, 11q и гена *MYCN*) факторов риска – отношение опасностей (ОО) составило 172,4 (95% доверительный интервал (ДИ) 12,9 – 2310,8), $p < 0,001$. Независимым прогностическим значением при расчёте ОВ обладал только статус гена *MYCN*: ОО – 34,7 (95% ДИ 2,5 – 478,6), $p = 0,008$. Из анализа были исключены ковариаты «делеция / дисбаланс 1p» и «группа риска NB2004», как зависимые от статуса гена *MYCN* (Рисунок 3).

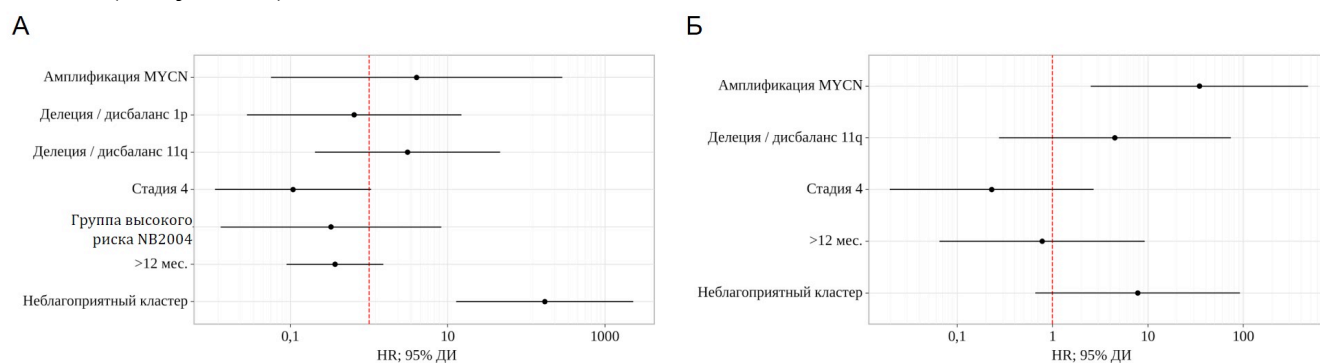


Рисунок 3 – Оценка отношения опасностей с 95% ДИ для изучаемых прогностических факторов: А – БСВ; Б – ОВ

Таким образом, гены, дифференциально экспрессирующиеся в образцах НБ с различным клиническим течением, были объединены в панель, пригодную для проспективной валидации и клинического использования. Ограниченное количество транскриптов позволяет оценивать их без применения высокопроизводительных технологий экспрессионного анализа, в частности, с помощью технологии молекулярных штрих-кодов NanoString или ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией.

Анализ онкогенных сигнальных путей оценивался в 21 образце НБ. Медиана возраста пациентов составила 2,49 г. (диапазон 0,60 мес. – 6,78 лет), локализованная опухоль (стадии 1–3) была выявлена у пяти пациентов, стадия 4 – у 14 больных, стадия 4S – у двух пациентов. На основании стандартных критериев стратификации, к группе наблюдения были отнесены 6, к группе промежуточного риска – 6, к группе высокого риска – 9 больных, соответственно. Кроме того, исследование сигнальных путей производилось в 73 образцах опухолей детского возраста интра- и экстракраниальной локализации, составивших группу сравнения, куда вошли заболевания «одного сигнального пути» и «множества сигнальных путей»

Наименьшие значения направленных глобальных коэффициентов значимости, свидетельствующие о репрессии биологических процессов в клетках НБ, были получены для сигнальных путей Hedgehog: (-3,760), TGF β (-2,877) и WNT (-2,476), тогда как наибольшие – для каскадов RAS (-1,127), MAPK (-1,018) и JAK-STAT (1,674), что указывало на их активацию. Конститутивная активация сигнального пути RAS была подтверждена обнаружением экспрессии фосфорилированной формы эффекторов каскада – белков ERK (Phospho-ERK1/2 Thr202+Tyr204 /

Thr185+Tyr187) в 17/21 (81,0%) образцах НБ вне зависимости от молекулярно-генетического драйвера.

Анализ экспрессии малых некодирующих РНК (микроРНК)

Пилотная группа пациентов состояла из 21 больного НБ и трёх больных смешанной ГНБ. Тринадцать пациентов имели локализованную опухоль, 8 – стадию 4, 3 – стадию 4S; 15 больных были стратифицированы в группу наблюдения, 2 – в группу промежуточного риска, 7 – в группу высокого риска. Медиана возраста составила 1,11 г. (диапазон 1,80 мес. – 5,98 лет). Развитие неблагоприятного события было зафиксировано у 10 пациентов (9 случаев прогрессии заболевания, 1 – смерть, связанная с осложнениями терапии). Во всех случаях количество копий гена *MUCN* было нормальным.

Неконтролируемая иерархическая кластеризация позволила выделить группу, характеризующуюся глобальным снижением экспрессии малых некодирующих РНК и включавшую образцы опухоли 9 пациентов, принадлежащих к различным группам риска, у 7 из которых было зафиксировано развитие неблагоприятного события (5-летняя БСВ $33,3 \pm 15,7\%$). В группе опухолей с сохраненной экспрессией микроРНК ($n=15$), прогрессия заболевания была отмечена только у 3 больных (5-летняя БСВ $78,8 \pm 11,0\%$, $p=0,007$). Было установлено значимое снижение экспрессии 92 микроРНК ($FDR < 0,05$), а также определены 6192 белок-кодирующих гена, находящихся под негативной пост-транскрипционной регуляцией от 10 до 86 микроРНК, имеющих сниженную экспрессию в образцах неблагоприятных опухолей. Биологическими процессами, которые, согласно анализу *in silico*, вышли из-под негативной регуляции системой микроРНК, являются контроль клеточного цикла и митоза ($FDR=2,74 \times 10^{-7}$, включая переход G1 в S фазу клеточного цикла, $FDR=5,72 \times 10^{-5}$); ответ клетки на стресс / внеклеточные стимулы, $FDR=9,76 \times 10^{-7}$; внутриклеточное сигнализирование с помощью ГТФаз Rho, $FDR=1,22 \times 10^{-6}$; транскрипционная регуляция с помощью *TP53*, $FDR=6,11 \times 10^{-6}$; регулирование экспрессии генов ($FDR=1,86 \times 10^{-4}$, включая синтез мРНК РНК-полимеразой II, $FDR=9,40 \times 10^{-4}$); старение клеток ($FDR=8,09 \times 10^{-4}$, включая механизмы репликативной иммортализации за счёт поддержания длины теломер); SUMO-илирование пептидов, $FDR=0,001$; мембранный транспорт, $FDR=0,003$, что патогенетически объясняет агрессивное течение НБ с глобальной потерей экспрессии микроРНК.

Одной из микроРНК, экспрессия которой снижена в образцах неблагоприятных нейрогенных опухолей, является miR-128-3p. Прогностическое значение потери её экспрессии, а также гиперэкспрессии гена *TERT*, было проанализировано на отдельной когорте из 103 пациентов: 77 с диагнозом НБ, 14 – смешанная ГНБ, 12 – ГН. 68 (66,0%) больных имели локализованную опухоль; 26 (25,2%) – стадию заболевания 4; 9 (8,7%) – стадию 4S. 46 (44,7%) пациентов были младше 12 мес. на момент постановки диагноза; 16 (15,5%) имели амплификацию *MUCN*, 22 (21,4%) – делецию (дисбаланс) короткого плеча хромосомы 1. Таким образом, 61 (59,2%) больной был стратифицирован в группу наблюдения, 11 (10,7%) – в группу промежуточного риска; 31 (30,1%) – в группу высокого риска.

С помощью ROC-анализа были установлены пороговые уровни нормализованной экспрессии *TERT* ($-2,32 \log_{10}$, $p=0,027$) и *miR-128-3p* ($-1,33 \log_{10}$, $p=0,080$) позволяющие выделить пациентов с повышенным риском развития неблагоприятного события. На основании данных значений пациенты были разделены на следующие группы: (1) с отсутствием активации *TERT* ($< -2,32 \log_{10}$) и сохранной экспрессией *miR-128-3p* ($\geq -1,33 \log_{10}$), $n=23$; (2) с наличием активации *TERT* ($\geq -2,32 \log_{10}$) и сохранной экспрессией *miR-128-3p* ($\geq -1,33 \log_{10}$), $n=44$; (3) с отсутствием активации *TERT* ($< -2,32 \log_{10}$) и утраченной экспрессией *miR-128-3p* ($< -1,33 \log_{10}$), $n=10$; (4) с наличием активации *TERT* ($\geq -2,32 \log_{10}$) и утраченной экспрессией *miR-128-3p* ($< -1,33 \log_{10}$), $n=10$; отдельно анализировались пациенты (5) с наличием амплификации гена *MYCN*, $n=16$. Клинические характеристики и показатели выживаемости пациентов в данных группах представлены в Таблице 1. Разделение пациентов в соответствии с экспрессионными aberrациями *TERT* и *miR-128-3p* обладало выраженным прогностическим значением, негативное влияние потери экспрессии *miR-128-3p* на БСВ пациентов сохранялось в многофакторном анализе (ОО – 2,4 (95% ДИ 1,2-4,8), $p=0,019$).

Таблица 1 – Клинические, молекулярно-генетические характеристики и прогностические данные пациентов в группах, выделенных на основании экспрессионных aberrаций *TERT* и *miR-128-3p* и наличия амплификации *MYCN*

Признак	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5 (MNA)
Количество пациентов	23	44	10	10	16
Группы риска NB2004:					
Наблюдения	20	29	7	5	0
Промежуточного риска	3	6	1	1	0
Высокого риска	0	9	2	4	16
Стадии INSS					
1	10	20	5	2	2
2	0	4	1	0	1
3	9	6	1	2	5
4	1	11	2	5	7
4S	3	3	1	1	1
Аберрации 1p	2	8	1	1	10
Медиана \log_{10} экспрессии <i>TERT</i> (диапазон)	-2,99 (-4,04...-2,36)	-1,18 (-2,30...0,04)	-2,66 (-3,28...-2,36)	-2,06 (-2,23...-0,94)	-1,38 (-3,20...0,02)
Медиана \log_{10} экспрессии <i>miR-128-3p</i> (диапазон)	-0,20 (-1,33...0,95)	0,44 (-1,32...3,08)	-1,64 (-2,80...-1,36)	-2,00 (-2,76...-1,42)	-1,33 (-2,90...3,11)
5-летняя БСВ, %	91,3±5,9	74,4±7,7	60,0±15,5	40,0±15,5	25,0±10,8
КЧП, %	8,7±5,9	23,4±7,5	40,0±15,5	60,0±15,5	75,0±10,8
5-летняя ОВ, %	91,3±5,9	90,2±4,7	70,0±14,5	60,0±15,5	37,5±12,1

Примечание: MNA – амплификация гена *MYCN*; КЧП – кумулятивная частота прогрессии

Исследование взаимодействия опухоли и микроокружения

В работе образцы нейрогенных опухолей (n=9), сопровождающиеся клиникой иммуноопосредованного паранеопластического ОМС, рассматривались, как модель высокоиммуногенной неоплазии и с целью изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе данного феномена, сравнивались с группой из 17 пациентов без проявлений ОМС, сбалансированной по клиническим и цитогенетическим параметрам с анализируемой когортой. На основании исследования дифференциальной экспрессии генов были обнаружены 20 транскриптов, представленность которых в образцах ОМС⁺ опухолей была значимо выше (FDR<0,01). Анализ специфичности данных генов для различных типов иммунокомпетентных клеток выявил индукцию и поддержание как гуморального, так и клеточного иммунного ответа в иммуногенных ОМС⁺ опухолях. Были выявлены поляризация Т-клеток в сторону Th1 / IFN γ ответа, наличие В-клеток в реактивном микроокружении и их дифференцировка в плазматические Ig-продуцирующие клетки. В значительном количестве экспрессировались маркёры натуральных киллеров (*KLRC2*, *KLKRI*), что, совместно с активацией В-клеток, свидетельствует о реализации механизма антителозависимой НК-клеточной цитотоксичности. В опухолевом микроокружении отмечены нейротропные CD247⁺ (TCR ζ) Т-клетки. При этом, наблюдалась экспрессия генов, кодирующих репрессорные молекулы *PDCD1* (PD1, изменение экспрессии 3,45 \times , FDR=7,15 $\times 10^{-3}$) и *CTLA4* (изменение экспрессии 5,05 \times , FDR=7,15 $\times 10^{-3}$), которые являются мишенями для ингибиторов контрольных точек иммунного ответа.

Экспрессионная сигнатура полностью воспроизводилась на независимой когорте больных без иммуноопосредованных паранеопластических процессов, куда вошли 44 пациента с НБ и 2 – со смешанной ГНБ. Медиана возраста на момент постановки диагноза составила 3,23 г. (диапазон 1,32 мес. – 21,4 г.), распределение по стадиям заболевания INSS было следующим: стадия 1 – 1 пациент; стадия 2 – 4 пациента; стадия 3 – 2 пациента, стадия 4 – 38 пациентов; стадия 4S – 1 пациент. Нормальный статус гена *MYCN* был зафиксирован у 30 больных, амплификация *MYCN* – у 11, увеличение числа копий, не достигающее порога амплификации – у двух пациентов. Делеция / дисбаланс 1p выявлены у 13, отсутствие aberrаций – у 29 больных. Таким образом, в группу наблюдения были стратифицированы 4 пациента, в группу промежуточного риска – 4, в группу высокого риска – 38 больных. Три образца были непригодны для исследования, тогда как анализ экспрессии 20 генов в оставшихся образцах позволил классифицировать их в соответствии со степенью иммуногенности опухоли на два неперекрывающихся кластера, аналогичных разделению ОМС⁺ и ОМС⁻ случаев (Рисунок 4). Вопреки распространённой позиции, характеризующий опухоли с амплификацией *MYCN* как крайне неиммуногенные («иммунная пустыня»), в настоящем исследовании 10 случаев с амплификацией *MYCN* распределялись поровну между группами опухолей с высокой и низкой иммуногенностью. Анализ выживаемости пациентов, а также оценка частоты ответа на иммунотерапию динутуксимабом бета, не показали различий в

зависимости от принадлежности опухоли к иммуногенной или неиммуногенной группе, однако наличие в микроокружении иммуногенных опухолей Т-клеток, экспрессирующих мРНК корепрессорных факторов *PDCD1* и *CTLA4*, открывает возможности потенцирования иммунного ответа, а предложенная экспрессионная сигнатура может стать предиктивным маркёром эффективности моноклональных антител к PD1 и CTLA4.

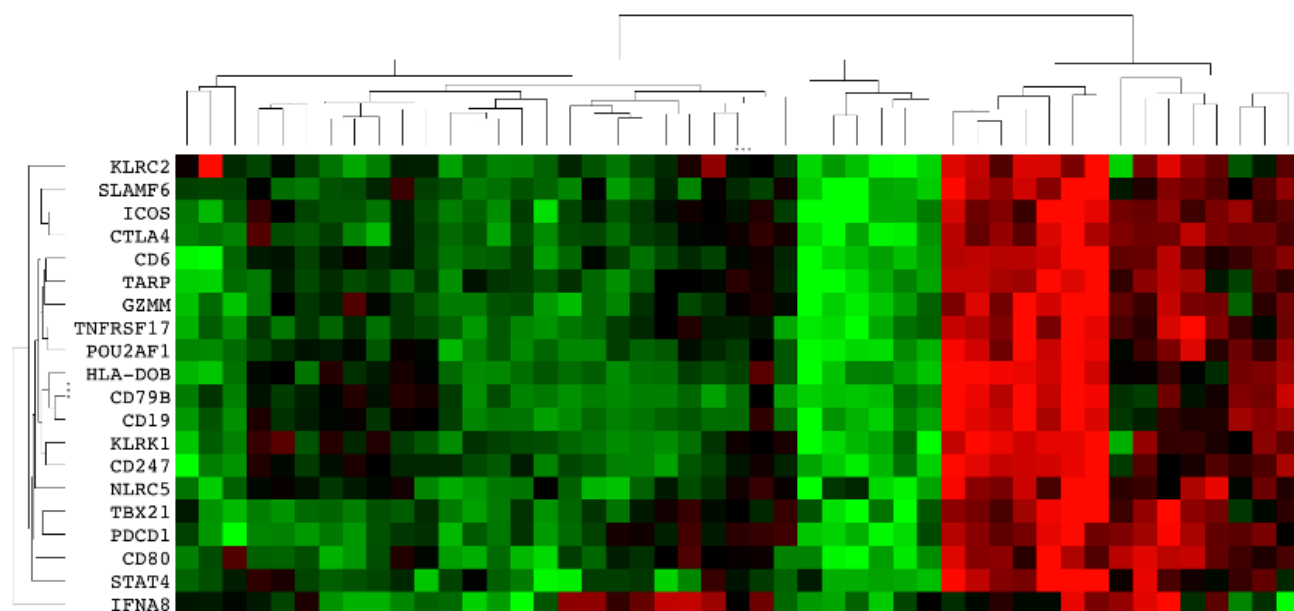


Рисунок 4 – Кластеризация образцов опухолей, не сопровождающихся клиникой иммуноопосредованных паранеопластических процессов, на основании уровня экспрессии 20 генов, включённых в сигнатуру

Исследование молекулярных механизмов феномена созревания нейрогенных опухолей

Молекулярные механизмы дифференцировки и регрессии нейрогенных опухолей были изучены на группе из 23 пациентов с НБ (17 – низкодифференцированная, 4 – дифференцирующаяся, 2 – НБ без дополнительного уточнения (БДУ)) у которых созревание опухоли было верифицировано морфологически после биопсии или удаления остаточного компонента опухоли. Медиана возраста пациентов с НБ на момент постановки диагноза составила 1,69 г. (диапазон 1,20 мес. – 6,78 лет); локализованная стадия (INSS 2–3) была выявлена у 9 пациентов, стадия 4 – у 11, стадия 4S – у трёх больных. В шести случаях результатом созревания явилась ГН, в 11 – смешанная ГНБ, в одном – нодулярная ГНБ и в одном – дифференцирующаяся НБ. У четырёх пациентов с низкодифференцированной НБ по данным лучевых методов исследования была зафиксирована спонтанная регрессия опухоли с полным нивелированием патологического очага. Амплификация гена *MYCN* не была обнаружена ни в одном случае, в одном случае определялась делеция 1p. В четырёх из 18 исследованных образцов была обнаружена делеция 11q. Таким образом, 8 пациентов были стратифицированы в группу наблюдения, 6 – в группу промежуточного риска, 9 – в

группу высокого риска. Медиана времени до созревания / регрессии НБ составила 4,3 мес. (диапазон 2,00 мес. – 11,16 лет). Также были исследованы чрезвычайно редкие случаи созревания опухолей ЦНС, объединённых с НБ общим нейроэктодермальным происхождением: у двух пациентов была зафиксирована трансформация ETMR и МБ с экстенсивной нодулярностью (группы SHH) в ганглиоглиому, неспецифицированной эмбриональной опухоли ЦНС в плеоморфную ксантоастроцитому, а также снижение степени злокачественности опухоли пинеального зачатка и диффузной астроцитарной глиомы таламуса.

Для исследования изменений в профиле экспрессии генов, происходящих в клетках опухолей при их фенотипическом созревании, была использована панель nCounter PanCancer Pathways Panel. Сравнительный анализ проводился в патологическом субстрате, полученном в дебюте заболевания и после морфологической верификации феномена созревания, а также в опухолях групп сравнения, идентичных по гистологическому и молекулярно-генетическому диагнозу с опухолями, подвергшимися созреванию. Неконтролируемая иерархическая кластеризация образцов позволила выделить четыре основные группы: (1) первичные случаи НБ вне зависимости от реализации созревания в последующем и стандартных факторов риска; (2) МБ группы SHH и (3) ETMR (оба случая данных опухолей с созреванием кластеризовались в соответствующие группы); (4) первичные астроцитарные глиомы с перестройками генов протеинкиназ и все случаи созревания как экстракраниальных, так и интракраниальных опухолей. Отдельно кластеризовалась эмбриональная опухоль ЦНС БДУ. Астроцитарная глиома таламуса и опухоль пинеального зачатка не изменили профиль экспрессии генов в исходе созревания и из дальнейшего анализа были исключены. Во всех остальных случаях созревания была выявлена однозначная траектория изменения экспрессионного профиля в сторону глиальных / нейрональных опухолей, в молекулярном патогенезе которых преобладает сигнальный путь MAPK (RAS-RAF-MEK), Рисунок 5.

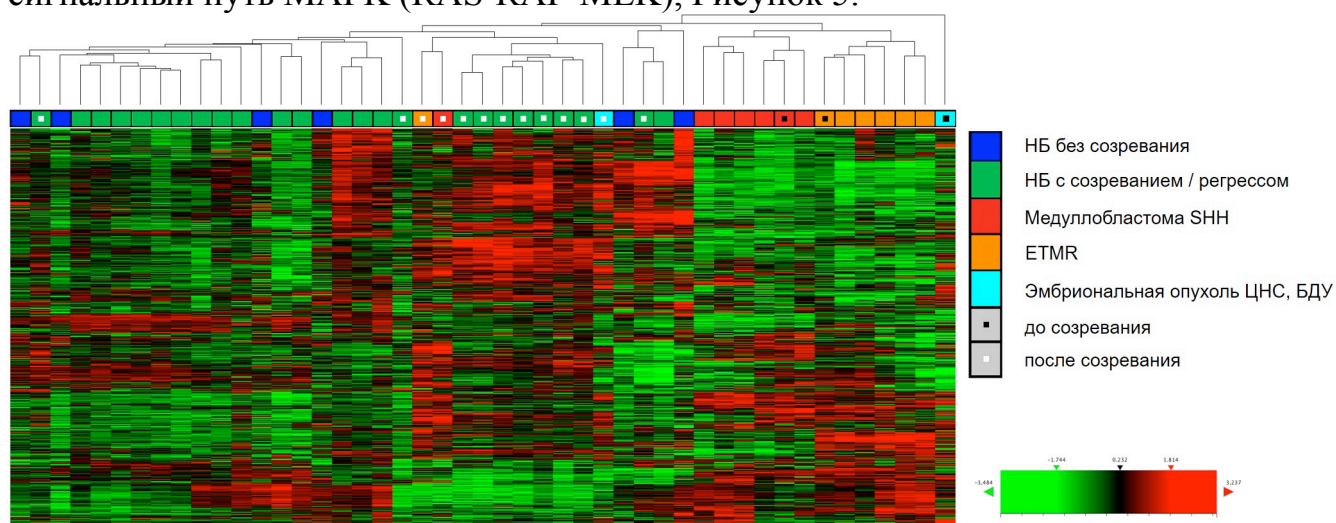


Рисунок 5 – Экспрессионный профиль НБ, МБ группы SHH и ETMR, включая случаи, подвергшиеся созреванию, и образцов контрольной группы. Образцы опухолей в исходе созревания имеют сходный профиль экспрессии генов вне зависимости от первоначального диагноза

Оценка дифференциальной экспрессии генов позволила установить 169 транскриптов, представленность которых значимо отличалась ($FDR < 0,01$) в образцах опухолей до и после созревания вне зависимости от первоначального диагноза. 112 генов, имели повышенную экспрессию (кратное изменение $> 1,5\times$) среди них проапоптотические (*CASP7*, *CASP10*, *FAS*), регуляторы сигнального пути RAS-RAF-МЕК (*PTPN11*, *MAP2K1*, *MAP3K5*, *MAPK3*, *DUSP5*, *DUSP6*, *DUSP10*), а также *CDKN1A*, *PTEN* и *NTRK2*. Из 57 репрессированных генов (кратное изменение $< -1,5\times$) были отмечены *ARID1A*, *BCOR*, *CDK6* и *MYCN*, как участвующие в патогенезе НБ и других эмбриональных опухолей, а также множество генов, задействованных в ответе клетки на повреждение ДНК, поддержании стабильности генома и индукции репарации ДНК (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK1*, *FANCA*, *FANCC*, *FANCG*, *MSH2*, *MSH6*, *POLD1*, *POLE2*, *RAD51*, *RAD52*). Последнее указывает на снижение уровня геномной нестабильности на фоне созревания опухоли.

Наиболее значимая активация клеточных процессов при созревании нейрогенных опухолей происходила за счёт стимуляции мембранных рецепторов семейства NTRK ($FDR = 3,31 \times 10^{-12}$). Трансдукция экзогенного сигнала, полученного клеткой через систему рецепторных тирозинкиназ, осуществлялась путём активации каскадов семейства MAPK ($FDR = 1,54 \times 10^{-14}$), JAK-STAT, ГТФ-Ras ($FDR = 2,29 \times 10^{-11}$), NOTCH ($FDR = 3,00 \times 10^{-3}$). При этом среди путей MAPK преобладал канонический MAPK1/3 (зависимый от *ARAF*, *BRAF*, *RAF1*, $FDR = 1,35 \times 10^{-11}$), а среди вторичных внутриклеточных мессенджеров – каскад PI3K-АКТ и его дериваты. Данный факт указывает на роль классических онкогенных сигнальных путей не только в приобретении клеткой пролиферативной автономии, но и в процессах созревания опухолевых клеток.

Была выявлена индукция значительного количества генов, участвующих в регуляции иммунного ответа, в частности, в межклеточном сигнализировании с участием интерлейкинов (IL). Отмечена активация как провоспалительных каскадов, приводящих к запуску Th1-CTL-иммунного ответа (IL6-зависимое сигнализирование, $FDR = 1,90 \times 10^{-6}$; IL7, $FDR = 2,39 \times 10^{-4}$), Th2-В-клеточного иммунного ответа (IL4/IL13, $FDR = 1,54 \times 10^{-14}$, IL17, $FDR = 4,09 \times 10^{-5}$), В и NK-клеточного ответа (IL1, $FDR = 3,23 \times 10^{-4}$), а также противовоспалительного IL10-зависимого сигнализирования ($FDR = 1,15 \times 10^{-8}$). В целом, отмечено повышение иммунореактивности опухолей при реализации феномена созревания, что было особенно выражено для опухолей ЦНС. Гены, экспрессия которых снижалась при созревании опухоли, кодируют белки, участвующие исключительно в контроле клеточного цикла ($FDR = 1,53 \times 10^{-14}$), репликации ($FDR = 1,24 \times 10^{-10}$) и репарации ДНК ($FDR = 3,60 \times 10^{-13}$), ответе клетки на повреждение генетического материала, включая активацию ATM/ATR в результате репликативного стресса ($FDR = 2,04 \times 10^{-14}$) и транскрипционные программы TP53 ($FDR = 2,04 \times 10^{-14}$). Таким образом, в процессе созревания нейрогенных опухолей клетки снижают пролиферативный потенциал и темп репликации ДНК. Одновременно с этим нивелируется геномная нестабильность, связанная с двунитевыми разрывами

ДНК и остановкой репликативной вилки, что определяет снижение активности системы репарации ДНК путём гомологичной рекомбинации.

Исследование экспрессии отдельных генов, описанных в контексте созревания НБ, выявило усиление экспрессии гена *NTRK1* в дебюте созревания, наиболее выраженное у пациентов с благоприятной НБ в возрасте младше 18 мес., а также нарастание экспрессии *NTRK2* в исходе созревания, которое в большей степени было характерно для пациентов с НБ старше 18 мес. Анализ созревания нейрогенных опухолей выявил синонимичное изменение экспрессии генов негативных (*EZH2*, *DNMT3A*, *HDAC2*, *HDAC10*) и позитивных (*ARID1A*, *ARID2*, *PBRM1*, *SMARCB1*, *SMARCA4*) эпигенетических регуляторов. Экспрессия первых значимо не отличалась в контрольных образцах без созревания и опухолях в дебюте дифференцировки, тогда как значимо падала в её исходе, вторых – резко нарастала в опухолях в дебюте созревания. В исходе дифференцировки было отмечено увеличение экспрессии генов Zn^{2+} -содержащих транскрипционных факторов семейства Krüppel (*KLF4*, *GLI1* и *GLI3*), причем изменение экспрессии эпигенетических регуляторов и транскрипционных факторов сопровождали процесс созревания опухолей ЦНС и НБ в возрасте старше 18 мес.

Кроме того, группа нейрогенных опухолей, подвергшихся созреванию, была обогащена случаями с наличием генетических вариантов, приводящих к активации сигнальных путей RAS-RAF-MEK и PI3K-AKT-mTOR: *BRAF* p.G464R, p.G469A, p.L597S, p.V600E; *HRAS* p.Q61R; *NF1* p.Y2285Tfs*5; *PTEN* p.V217Sfs*4; *PTPN11* p.I282M.

Анализ клинического значения генетических aberrаций, выявленных методом высокопроизводительного секвенирования ДНК

Исследование клинической значимости нуклеотидных вариантов и аномалий числа копий генов, выявляемых методом NGS, носило проспективный характер и было направлено на поиск маркеров чувствительности к препаратам МНТ у пациентов с прогностически неблагоприятной НБ. Критериям включения удовлетворяли 270 пациентов, абсолютное большинство из которых (n=186, 68,9%) были стратифицированы в группу высокого риска: у трёх из них отмечалось первично-рефрактерное течение заболевания, у 53 – на момент проведения исследования был зафиксирован рецидив или прогрессия опухоли, 130 больных были подвергнуты исследованию по причине стратификации в группу высокого риска до развития неблагоприятного события. 25 (9,3%) и 58 (21,5%) пациентов первоначально относились к группам промежуточного и низкого риска (наблюдения), однако в 63 случаях имели первично-рефрактерное или рецидивирующее течение заболевания и, таким образом, рассматривались, как кандидаты для получения МНТ.

Медиана возраста пациентов исследуемой группы составила 2,88 г. (диапазон 0,50 мес. – 20,60 лет). Преобладали пациенты с 4 стадией заболевания (n=187, 69,3%), в остальном распределение по стадиям INSS было следующим: стадия 1 – 15 (5,6%), 2 – 30 (11,1%), 3 – 23 (8,5%), 4S – 14 (5,2%). Амплификация гена *MUCN* была выявлена у 83 из 268 пациентов, которым данное исследование

выполнялось и было информативным (31,0%), увеличение числа копий *MYCN*, не достигающее порога амплификации – у 23 (8,6%) больных. Делеции или дисбаланс хромосомных локусов 1p и 11q были обнаружены у 79/263 (30,0%) и 64/230 (27,8%) пациентов. Также дополнительной цитогенетической характеристикой опухоли, которая одновременно может рассматриваться, как мишень для МНТ является амплификация гена *ALK*, выявленная у 5/88 (5,7%) больных, увеличение числа копий локуса *ALK* было зафиксировано в 10/88 (11,4%) случаях. Медиана времени наблюдения за пациентами, которым проводилось исследование методом NGS, составила 3,73 г. (диапазон 0,10 мес. – 11,12 лет).

В исследуемой когорте у 188 (69,6%) пациентов методом NGS был выявлен один или более генетический вариант, имеющий клиническое значение или потенциально задействованный в молекулярном патогенезе опухоли. Аномалии числа копий генов, типичные для агрессивных НБ, составляли основную часть обнаруженных aberrаций – 325 из 467 (69,6%, увеличение числа копий генов выявлено в 37 образцах; делеции – в 287). При этом таргетный характер исследования позволял анализировать только количество копий соответствующих генов, но не хромосомных локусов, в которых они картированы. У 109 пациентов были обнаружены 142 нуклеотидных варианта. Спектр генетических aberrаций, выявленных при проведении таргетного NGS представлен на Рисунке 6. Интерпретация соматических генетических вариантов осуществлялась на основании их клинической значимости в качестве прогностических или предиктивных биомаркёров, в соответствии с рекомендациями AMP/ASCO/CAP.

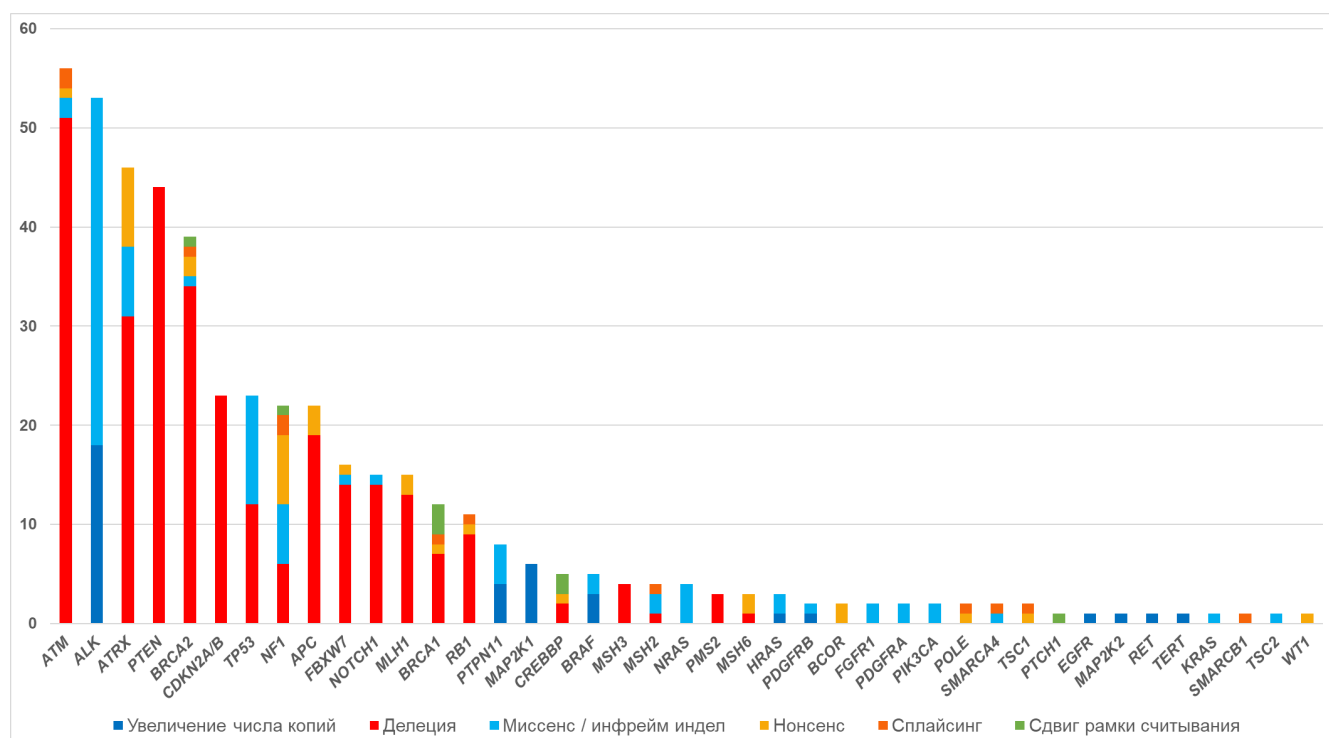


Рисунок 6 – Спектр генетических aberrаций, выявленных методом таргетного высокопроизводительного секвенирования ДНК, выделенной из ткани опухоли

Аберрации гена *ALK* были обнаружены у 50 из 270 обследованных пациентов (18,5%) в когорте, обогащённой случаями НБ группы высокого риска или характеризующимися неблагоприятным клиническим течением. Увеличение числа копий 2p23.2, где картирован ген *ALK* наблюдалось в 15 случаях, в 32 образцах были выявлены активирующие миссенс-мутации в кодирующей последовательности каталитического домена белка, в двух случаях наличие амплификации гена *ALK* сочеталось с вариантом p.R1275Q, в одном – с заменой p.F1174L.

Наиболее часто аминокислотные замены затрагивали позиции Arg1275 (p.R1275Q n=15, p.R1275L n=2); Phe1174 (p.F1174L n=8, p.F1174C n=2, p.F1174I n=1) и Phe1245 (p.F1245V n=3, p.F1245L n=1). В индивидуальных случаях были отмечены миссенс-мутации p.I1170T, p.I1171T, p.Y1278S. Все выявленные варианты локализовались в кодирующей последовательности каталитического домена белка.

МНТ с целью интенсификации стандартного лечения была назначена 20 пациентам с аберрациями в гене *ALK* (p.R1275Q/L – 8, p.F1174L/I – 3, p.F1245L – 2, p.I1171T – 1, p.Y1278S – 1, амплификация гена – 4, сочетание миссенс-мутации p.R1275Q и амплификации гена *ALK* – 1). В качестве ALK-ингибиторов использовались препараты кризотиниб (n=4), алектиниб (n=1), церитиниб (n=5), лорлатиниб (n=12). Медиана длительности ТТ – 7,03 мес. (0,27–43,47 мес.). На момент написания девять пациентов продолжают получать ТТ.

Семи пациентам с НБ группы высокого риска ALK-ингибиторы были назначены в первой линии в комбинации со стандартной терапией: в трех случаях параллельно с индукционной терапией, в четырёх – на этапе консолидации после проведения высокодозной химиотерапии (ХТ). Объективный ответ на сочетании ТТ и ХТ в первой линии лечения отмечен у 4/7 пациентов, в одном случае отмечена прогрессия заболевания после отмены ТТ по причине токсичности, два пациента находятся на этапе лечения до оценки ответа (Рисунок 7).

13 пациентов получали терапию ALK-ингибиторами при развитии первого или последующего рецидива, или прогрессии заболевания. В 5/13 случаев комбинация ТТ с противорецидивной ХТ позволила добиться объективного ответа, в 2 – длительной стабилизации заболевания, у 5 пациентов не имела успеха. Один пациент находится на этапе лечения до оценки ответа (Рисунок 7).

Таким образом, сочетание ТТ с ХТ позволило добиться контроля над заболеванием в 11/17 случаев (64,7%): в 9/17 случаев (52,9%) был зафиксирован объективный ответ опухоли в 2/17 (11,8%) – стабилизация процесса. При использовании наиболее активного ингибитора ALK – лорлатиниба – у 10/12 (83,3%) пациентов был осуществлен контроль над заболеванием: в 8/12 (66,7%) случаев – объективный ответ, в 2/12 (16,7%) – стабилизация патологического процесса.

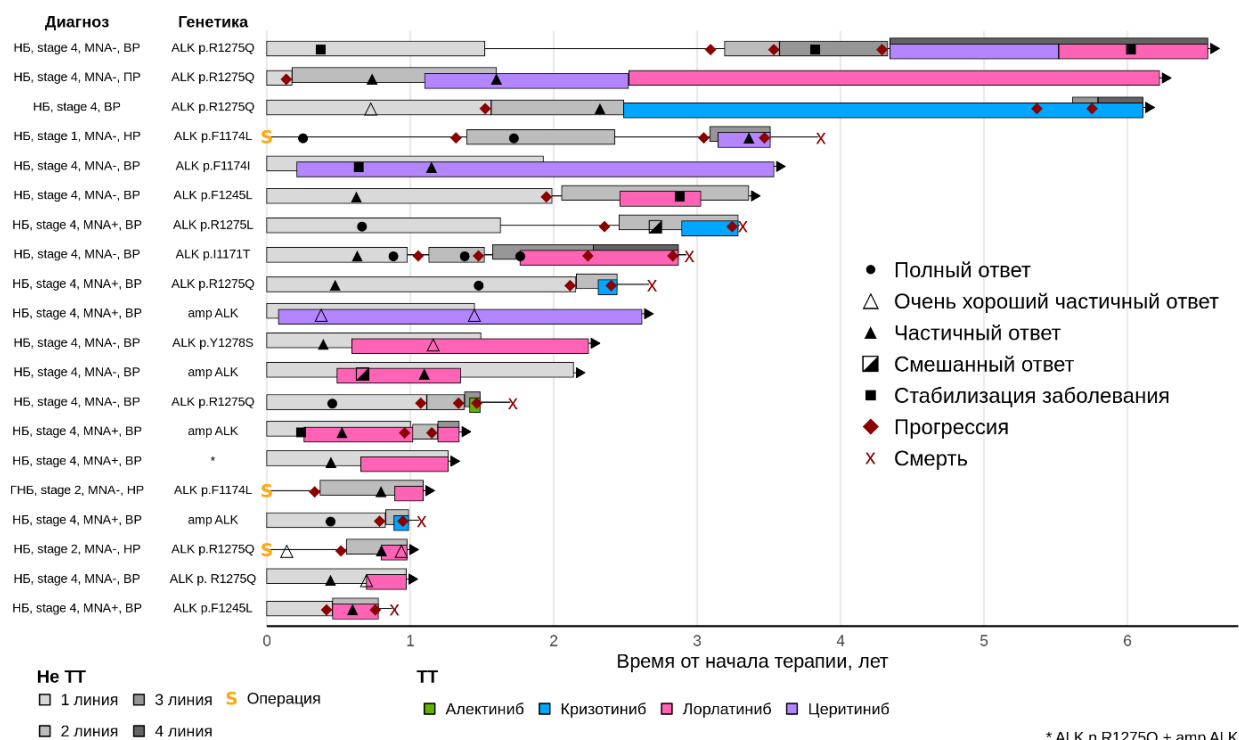


Рисунок 7 – Графическое представление наблюдения за пациентами, получающими таргетную терапию ингибиторами ALK, с указанием ответа на проводимую терапию и неблагоприятных событий

Исследование методом NGS позволило обнаружить aberrации в гене *ATRX* у 48 (17,8%) из 270 пациентов. В половине случаев (24/48) выявлены делеции кодирующей последовательности гена *ATRX*; в 5 – утрата отдельных экзонов (экзоны 2–10 n=2, экзоны 2–13 n=1 и 3' экзоны 29–35 n=2). У 4 (8,3%) пациентов женского пола утрата всей кодирующей последовательности гена *ATRX* была связана с моносомией X, обнаруженной по снижению копийности генов, картированных как на длинном, так и на коротком плече хромосомы X. В 3 случаях делеция гена *ATRX* или экзонов 4–12 (в 1 случае) носила субклональный характер. У 7 (14,6%) пациентов выявлены нуклеотидные миссенс-мутации p.R246C, p.V520I, p.G2120V, p.N2125I, p.S2142F, p.R2178Q, p.A2274S; у 8 (16,7%) – нонсенс-мутации p.S213*, p.E447*, p.R781*, p.I1049*, p.Q1385*, p.Q1569*, p.R2028*, p.W2275*. Aberrации в гене *ATRX* рассматривались в качестве маркера индукции альтернативного (*TERT*-независимого) пути поддержания длины теломер. Ключевой клинической особенностью пациентов, в ткани опухоли которых были выявлены варианты в гене *ATRX*, был старший возраст манифестации заболевания: согласно ROC-анализу, aberrации *ATRX* достоверно чаще отмечались у пациентов старше 6,58 лет ($p < 0,001$, площадь под ROC-кривой 0,671). При анализе выживаемости 45 больных с инактивирующими aberrациями гена *ATRX* (без учета мультиэкзонных делеций с сохранением рамки считывания белка) прослеживается индолентное течение НБ, характеризующееся медленным, но неуклонным прогрессированием. 5-летняя БСВ составила $12,1 \pm 9,7\%$ и не отличалась от выживаемости пациентов без аномалий гена *ATRX* ($16,7 \pm 3,8\%$,

$p=0,355$). Напротив, 5-летняя ОВ больных достигла $97,6\pm 2,4\%$ при наличии aberrаций *ATRX* и $68,5\pm 4,2\%$, $p=0,006$ без них (Рисунок 8). При этом у пациентов с дефицитом *ATRX* отмечались многочисленные повторные эпизоды прогрессии заболевания, не приводящие к летальному исходу в указанные сроки наблюдения (медиана 3,73 г., диапазон 0,10 мес. – 11,12 лет)

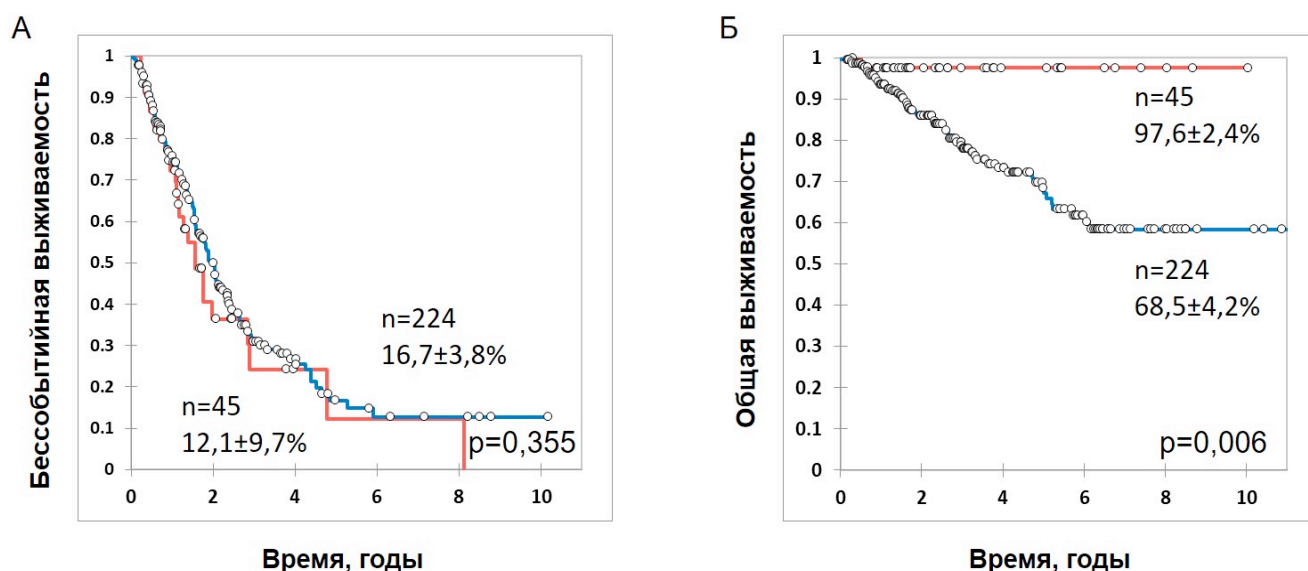


Рисунок 8 – Бессобытийная (А) и общая (Б) выживаемость пациентов с наличием (красная кривая) и отсутствием (синяя кривая) инактивирующих aberrаций в гене *ATRX*

Клиническое течение НБ в детском и более старшем возрасте значительно различается. Для НБ, возникшей в старшем возрасте, характерно индолентное течение со склонностью к прогрессированию. Биологические особенности и клиническая агрессивность подростковой НБ могут быть объяснены репликативной иммортализацией клеток за счёт альтернативного пути поддержания длины теломер. Маркёром и важным условием реализации данного феномена являются инактивирующие aberrации в гене *ATRX* (делеции или нуклеотидные варианты), сопровождающиеся экспрессионным репрограммированием, блоком дифференцировки и нарастающей геномной нестабильностью. Дефекты гена *ATRX* могут стать маркёром, обеспечивающим объективизацию смены биологии опухоли при переходе от классической НБ раннего возраста к подростковой НБ и важным дифференциально-диагностическим критерием.

Несмотря на значительную частоту выявления aberrаций в генах, участвующих в репарации ДНК путём гомологичной рекомбинации, *ATM* (20,4%), *BRCA2* (14,1%), *BRCA1* (2,6%), ни в одном случае не была выявлена их биаллельная инактивация и реализация феномена HRD среди 9 пациентов с наличием мутаций в генах гомологичной рекомбинации, исследованных с помощью панели AmoyDx HRD Focus Panel: медиана индекса гомозиготности геномных регионов (Genome Scar Score) составила 1,4 (диапазон 0,7 – 6,3) при

пороговом значении 50,0. Напротив, MSI, которая не описывалась ранее у пациентов с НБ, была выявлена в единичном случае при сочетании соматической мутации *MLH1* p.E694* и делеции хромосомного региона 3p21-22, выявляющейся с частотой до 18% среди пациентов с НБ. Наличие MSI было подтверждено методами NGS и ИГХ, где была выявлена утрата ядерной экспрессии белков MLH1 и PMS2. В целом, у 25 (9,3%) пациентов были выявлены инактивирующие aberrации в канонических генах восстановления ошибочно спаренных нуклеотидов (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2* и *MSH6*), из них в двух случаях это были нонсенс-мутации в гене *MLH1*. Их сочетание с рекуррентной делецией 3p может реализоваться в феномен MSI, который является агностическим предиктивным маркером эффективности иммунотерапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа.

Также предиктивным значением в отношении иммунотерапии обладает мутационная нагрузка в клетках опухоли, которая была проанализирована у 40 пациентов. Исследованные опухоли характеризовались низкой мутационной нагрузкой – медиана 3 Mut/Mb (диапазон 1 – 17 Mut/Mb), однако 9 случаев характеризовались повышенной ТМВ (эмпирически определённый пороговый уровень ≥ 8 Mut/Mb), а в четырёх из них были выявлены генетические варианты, способные объяснить данный феномен: мутации *MSH6* p.W142* (фракция альтернативного аллеля (ФАА) – 9%); *WRN* c.96+1G>A (ФАА – 95%); *MUTYH* p.G368D (ФАА – 91%) и сочетание вариантов *FANCD2* p.G333* (ФАА – 11%), p.W364* (ФАА – 24%) и c.696-1G>A (ФАА – 19%). Образцы НБ, где были выявлены повышенная ТМВ или MSI, проанализированные с помощью экспрессионного профилирования NanoString, имели признаки выраженной инфильтрации иммунокомпетентными клетками. При этом повышенная ТМВ оказывала негативное влияние на выживаемость пациентов, однако в силу немногочисленности выборки, различия остались на уровне тенденции. Введённый в настоящей работе порог ≥ 8 Mut/Mb, как признак гипермутабельных НБ, был связан с тенденцией к снижению показателей 5-летних БСВ и ОВ: 0% и 64,8 \pm 16,5% по сравнению с пациентами с менее выраженной ТМВ: 19,9 \pm 10,5% и 89,7 \pm 7,1%, $p=0,094$ и $p=0,098$.

Неожиданным наблюдением явилось выраженное негативное прогностическое значение aberrаций гена *NOTCH1*, которые были обнаружены у 15 пациентов (5,6%, 14 – гетерозиготные делеции, 1 – миссенс-мутация *NOTCH1* p.D1880N). Потеря кодирующей последовательности гена не могла быть объяснена несбалансированными хромосомными aberrациями, выявляемыми при НБ, поскольку локус 9q34.3 делециям подвергается редко. У большинства (11 из 15) пациентов с аномалиями гена *NOTCH1* было отмечено раннее наступление неблагоприятного события, что реализовалось в значительно более низкие показатели БСВ: 0% в сравнении с 16,9 \pm 3,7%, $p=0,002$ и ОВ: 38,6 \pm 27,9% против 73,3 \pm 3,8%, $p=0,013$, Рисунок 9. Пациенты с инактивирующими aberrациями в гене *NOTCH1* принадлежали к различным группам риска и имели различные стадии заболевания (2–4S). Амплификация гена *MUCN* была выявлена в 4 случаях.

Таким образом, негативное прогностическое значение aberrаций гена *NOTCH1* не может быть объяснено их сочетанием с конвенциональными факторами риска.

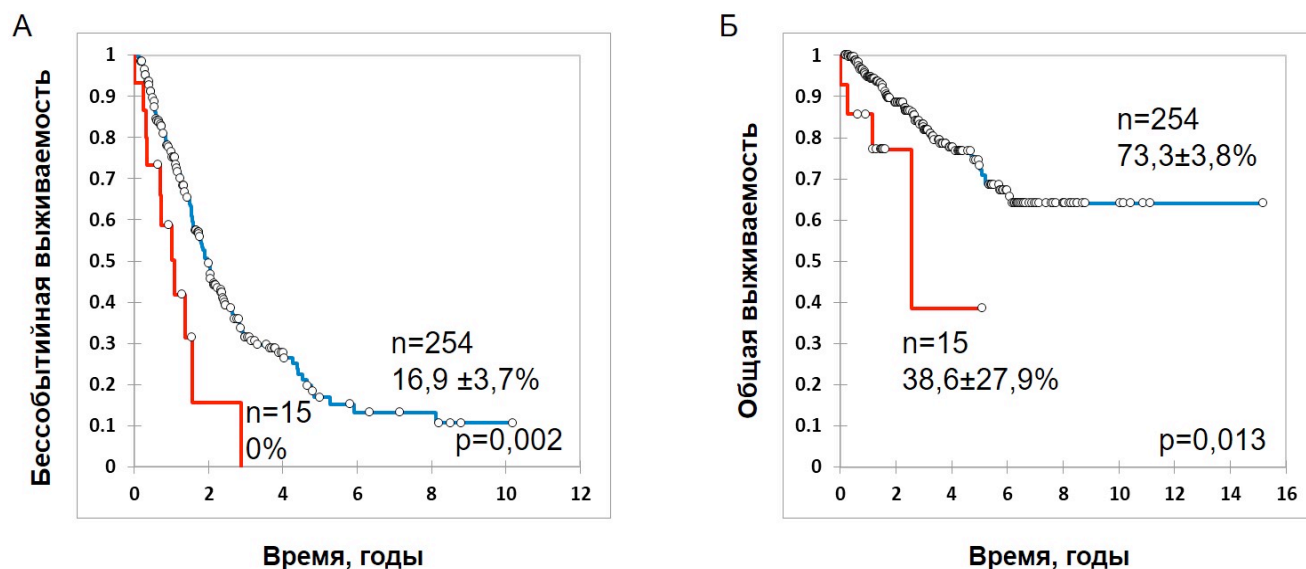


Рисунок 9 – Бессобытийная (А) и общая (Б) выживаемость пациентов с наличием (красная кривая) и отсутствием (синяя кривая) aberrаций в гене *NOTCH1*

Установление взаимосвязи между молекулярно-генетическими характеристиками и радиологическим фенотипом опухоли

Ретроспективно были проанализированы данные 110 пациентов с опухолями паравертебральной локализации и надпочечников, которым была выполнена DWI МРТ до начала специфического лечения и в дальнейшем был выставлен диагноз периферической нейрогенной опухоли на основании морфологического исследования ткани новообразования. Исследуемая когорта включала 12 пациентов с ГН, 10 – со смешанной ГНБ, 88 – с НБ. Возраст пациентов на момент постановки диагноза находился в диапазоне от 15 дней до 16 лет, медиана возраста составила 17 месяцев. Все пациенты с ГН и ГНБ имели локализованную опухоль и относились к группе наблюдения. Распределение пациентов с НБ по стадиям было следующим: стадия 1 – 9 пациентов, стадия 2 – 20 пациентов, стадия 3 – 12 пациентов, стадия 4 – 30 пациентов, стадия 4S – 17 пациентов. 53 пациента относились к группе наблюдения, 9 – к группе промежуточного риска, 26 – к группе высокого риска. Амплификация гена *MYCN* была выявлена у 16 пациентов с НБ (18,2%), у двух пациентов (2,3%) было выявлено увеличение числа копий гена *MYCN*, не достигающее порога амплификации. Среди пациентов с ГН и ГНБ aberrации гена *MYCN* не были выявлены ни в одном случае.

Величина ИКД анализируемых опухолей находилась в диапазоне 0,48–2,07 мм²/с. Медиана ИКД ГН составила 1,59±0,21 мм²/с, ГНБ – 1,37±0,25 мм²/с, НБ – 0,86±0,23 мм²/с. При этом опухоли с амплификацией гена *MYCN* характеризовались меньшим значением медианы ИКД 0,67±0,10 мм²/с, по сравнению с НБ, имеющими нормальное количество копий гена *MYCN* – 0,92±0,23 мм²/с. Были получены

достоверные различия в уровне ИКД между ГН и НБ, ГНБ и НБ, а также между НБ с наличием и отсутствием амплификации гена *MYCN*, уровень значимости с поправкой Бонферрони – 0,008. При этом различий в уровне ИКД среди опухолей, богатых шванновской стромой (ГН и ГНБ) отмечено не было. Среди пациентов с НБ наименьшие показатели ИКД опухоли были отмечены у больных, имеющих клинические неблагоприятные прогностические факторы. Пациенты с 4-й стадией имели ИКД первичного очага $0,68 \pm 0,18$ мм²/с, что было значительно ниже ИКД опухолей 1, 2, 3-й и 4S стадий, которые между собой достоверно не различались (медиана $1,09 \pm 0,29$ мм²/с; $0,95 \pm 0,21$ мм²/с; $0,92 \pm 0,19$ мм²/с и $0,94 \pm 0,23$ мм²/с, соответственно), уровень значимости с поправкой Бонферрони – 0,005. ИКД опухолей у пациентов, относящихся к группе наблюдения, напротив, был значительно выше ($0,96 \pm 0,23$ мм²/с), чем у пациентов групп промежуточного и высокого риска ($0,86 \pm 0,14$ мм²/с и $0,67 \pm 0,17$ мм²/с), уровень значимости с поправкой Бонферрони – 0,017. Аналогично, больные в возрасте до 18 месяцев характеризовались значительно большим ИКД опухоли ($0,93 \pm 0,24$ мм²/с), по сравнению с больными старше 18 месяцев ($0,76 \pm 0,18$ мм²/с), $p=0,001$.

Учитывая наличие достоверных различий в уровне ИКД опухолей богатых и бедных шванновской стромой ($p=1,53 \times 10^{-10}$) и НБ с наличием и отсутствием амплификации гена *MYCN* ($p=9,17 \times 10^{-6}$), был использован ROC-анализ для определения пороговых значений ИКД, позволяющих различать данные типы опухолей. ROC-анализ показал, что введение порогового значения ИКД, равного 1,25 мм²/с, позволяет достоверно дифференцировать опухоли богатые (ГН и ГНБ) и бедные (НБ) шванновской стромой, $p<0,001$, площадь под ROC-кривой – 0,96, Рисунок 10 А. Аналогично, уровень ИКД опухоли, соответствующий 0,78 мм²/с, позволяет уверенно различать НБ с наличием и отсутствием амплификации гена *MYCN*, $p<0,001$, площадь под ROC-кривой – 0,84, Рисунок 10 Б.

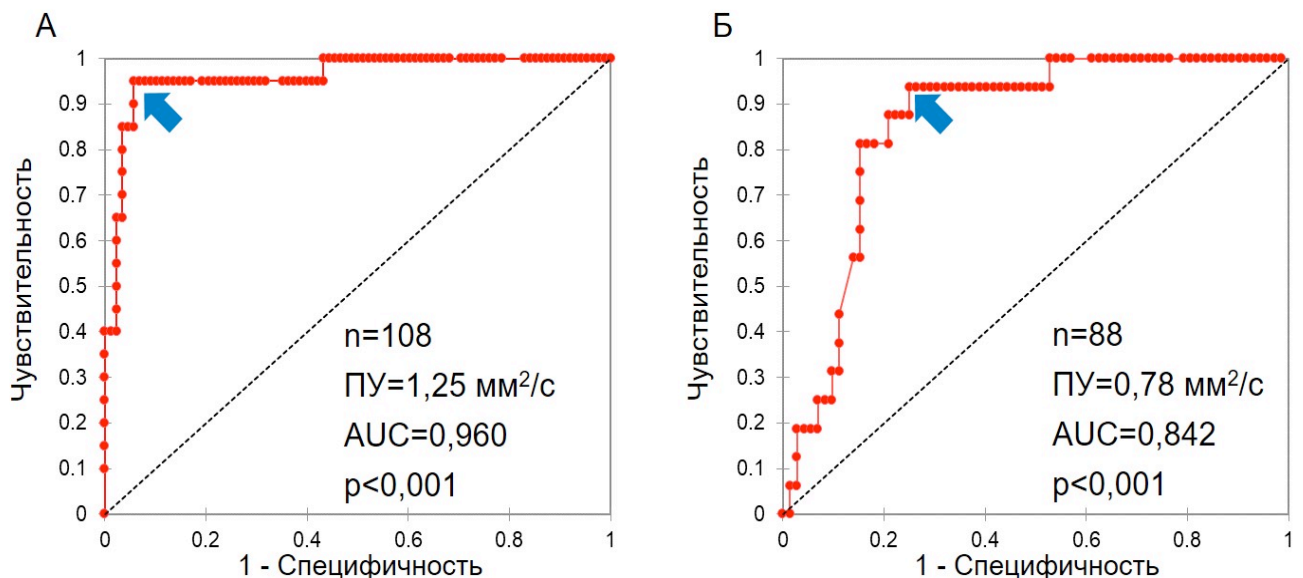


Рисунок 10 – ROC-кривые, соответствующие разделению нейрогенных опухолей богатых и бедных шванновской стромой (А) и НБ с отсутствием и наличием амплификации *MYCN* (Б) на основании ИКД опухоли. Пороговые уровни (ПУ) обозначены стрелкой, AUC – площадь под кривой

На Рисунке 11 суммированы величины ИКД всех проанализированных случаев с обозначением пороговых значений, позволяющих дифференцировать ГН и ГНБ (ИКД \geq 1,25 мм²/с) от НБ без амплификации гена *MYCN* (0,78<ИКД<1,25 мм²/с) и с наличием амплификации гена *MYCN* (ИКД \leq 0,78 мм²/с) на основании количественной МРТ.

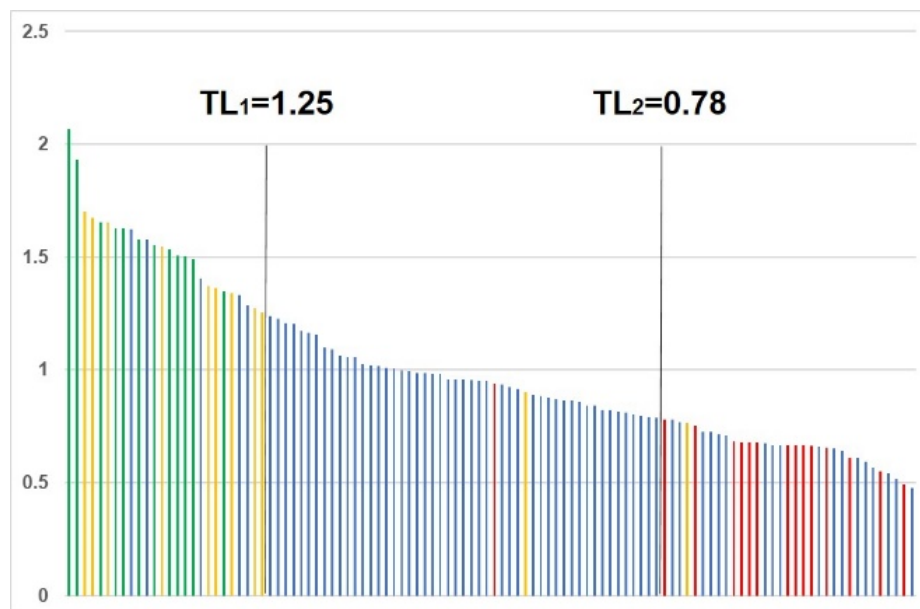


Рисунок 11 – Величины ИКД проанализированных нейрогенных опухолей (ГН обозначены зелёным цветом, ГНБ – жёлтым, НБ без амплификации *MYCN* – синим, НБ с амплификацией *MYCN* – красным) с указанием пороговых значений, позволяющих разделять опухоли богатые и бедные шванновской стромой (TL₁) и НБ с отсутствием и наличием амплификации гена *MYCN* (TL₂)

Разделение когорты пациентов на основании пороговых значений ИКД (\geq 1,25 мм²/с и \leq 0,78 мм²/с), ожидаемо, сопровождалось различиями в выживаемости больных. В группе больных с наибольшими значениями диффузии пятилетние значения БСВ и ОВ достигли 91,7 \pm 5,6% и 100,0%; среди пациентов с промежуточными значениями ИКД опухоли (0,78<ИКД<1,25 мм²/с) – составили 73,6 \pm 6,3 % и 96,0 \pm 2,8%, а больные с резко ограниченной диффузией в опухоли (\leq 0,78 мм²/с) имели наихудшие значения БСВ и ОВ – 54,5 \pm 8,7% и 75,4 \pm 8,4% (*p* с поправкой на множественные сравнения 0,009 и 0,010 в наиболее полярных группах). Среди пациентов с диагнозом НБ значимость различий БСВ на основании значений ИКД была утрачена (log-rank *p*=0,265), но не ОВ, где негативное прогностическое значение резкого ограничения диффузии в опухоли сохранялось (log-rank *p*=0,016; значение *p* с поправкой на множественные сравнения 0,007).

В 28 образцах морфологически верифицированной НБ без амплификации гена *MYCN* был осуществлён поиск несбалансированных хромосомных aberrаций для определения геномного типа опухоли. В 24 случаях гистологическим вариантом НБ был низкодифференцированный, в индивидуальных случаях – недифференцированный и дифференцирующийся, в двух – морфологический тип

НБ установлен не был. 21 пациент был стратифицирован в группу наблюдения, 4 – в группу промежуточного риска, 3 – в группу высокого риска. Медиана возраста на момент постановки диагноза составила 3,48 мес. (диапазон 0,50 мес. – 9,33 лет). Распределение пациентов по стадиям заболевания в соответствии с INSS было следующим: стадия 1 – 4 пациента, стадия 2 – 8; стадия 3 – 3, стадия 4 – 5 и стадия 4S – 8 больных. Таким образом, в группе преобладали случаи прогностически благоприятной НБ. Геномный тип А, ассоциированный с количественными хромосомными aberrациями и благоприятным клиническим течением заболевания, был диагностирован у 17 пациентов; тип В, для которого типичны только сегментарные aberrации, был определён у трёх больных; тип D, сочетающий как количественные, так и сегментарные хромосомные aberrации, был обнаружен у 6 пациентов. У двух пациентов опухолевый геном был сбалансирован и не содержал аномалий числа копий генов и хромосомных регионов (тип N).

Случаи НБ прогностически благоприятных (А и N) и неблагоприятных (В и D) геномных типов не различались по уровню ИКД опухоли. Единичные случаи НБ геномного типа В имели низкие значения ИКД – 0,48; 0,57 и 0,64 мм²/с, тогда как ИКД НБ геномных типов А и D варьировался в широких пределах: 0,59–1,62 мм²/с и 0,67–1,23 мм²/с. При этом прогностическое значение геномных типов НБ было подтверждено: 5-летняя БСВ пациентов с НБ благоприятных геномных типов составила 73,7±10,1%, неблагоприятных – 22,2±13,9%, $p=0,035$, Рисунок 12 А. При этом разделение случаев НБ на основании порогового уровня ИКД в 0,78 мм²/с сохраняло своё прогностическое значение в данной группе пациентов, несмотря на отсутствие корреляции с геномными типами НБ. Пятилетняя БСВ пациентов, опухоль которых не отличалась ограничением диффузии (ИКД>0,78 мм²/с), составила 72,2±10,6%, а с выраженным ограничением диффузии (ИКД≤0,78 мм²/с) – 30,0±14,5%, $p=0,018$, Рисунок 12 Б. Влияния как уровня ИКД, так и геномного типа НБ на ОВ пациентов отмечено не было ($p=0,645$ и $p=0,603$).

Благоприятные геномные типы НБ (А и N) определялись у пациентов группы наблюдения и только в двух случаях заболевания группы промежуточного риска. Напротив, неблагоприятные типы НБ (В и D) характеризовали, в первую очередь, клинически агрессивные опухоли (группы высокого риска), а в случае выявления у пациентов группы наблюдения ($n=4$) предопределяли наступление рецидива или прогрессии заболевания. Значения ИКД не были связаны с клинической группой риска пациентов. Можно сделать вывод, что геномный тип НБ и уровень ИКД позволяют выделить различных пациентов с повышенным риском наступления неблагоприятного события и, таким образом, обладают независимым прогностическим значением. Данное наблюдение было подтверждено при построении регрессионной модели Кокса, где уровень ИКД≤0,78 мм²/с и неблагоприятный тип НБ анализировались в качестве ковариат. Указанные параметры обладали сопоставимым уровнем отношения опасностей (2,79 и 2,38) в отношении БСВ пациентов, однако различия находились на уровне тенденции ($p=0,099$ и $p=0,174$).

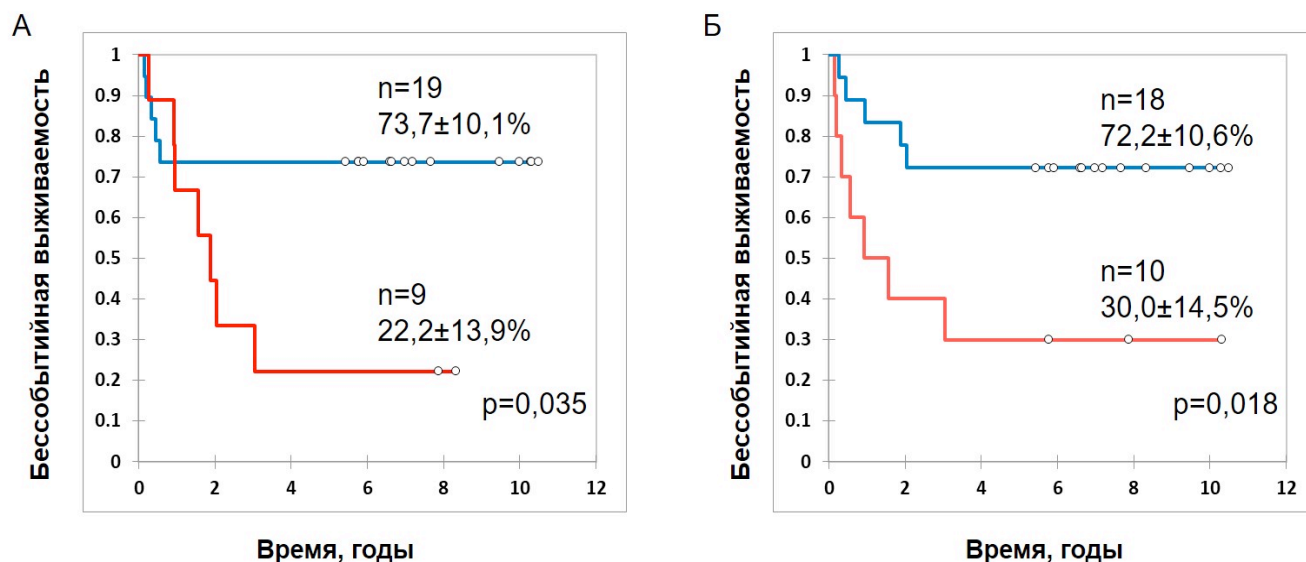


Рисунок 98 – БСВ пациентов с НБ без амплификации гена *MYCN* в зависимости от геномного типа (А) и уровня ИКД опухоли (Б). Благоприятные признаки (геномные типы А, N и ИКД $> 0,78 \text{ мм}^2/\text{с}$) обозначены кривой синего цвета, неблагоприятные признаки (геномные типы В, D и ИКД $\leq 0,78 \text{ мм}^2/\text{с}$) – кривой красного цвета

Выводы

1. Прогноз у пациентов с НБ зависит от экспрессионного профиля: у пациентов с неблагоприятными транскрипционными характеристиками опухоли 5-летняя БСВ составила $16,7 \pm 8,8\%$, тогда как в случае благоприятных характеристик достигает $94,7 \pm 5,1\%$, $p < 0,001$. Влияние профиля мРНК выступает в качестве независимого прогностического фактора (ОО – 172,4; 95% ДИ 12,9 – 2310,8, $p < 0,001$). Транскрипты, имеющие дифференциальную экспрессию в образцах НБ, задействованы в физиологических процессах в нервной ткани и патогенезе опухоли (синаптическая передача нервного импульса – в случае благоприятных НБ, $FDR=0,013$ и контроль клеточного цикла и его фаз G1/S в случае неблагоприятных опухолей, $FDR < 0,001$), а их ограниченное количество позволяет использовать методы NanoString или ПЦР-РВ для детекции, что снижает требования к качеству РНК и позволяет использовать фиксированный опухолевый материал для диагностики.

2. Доминирующими онкогенными сигнальными путями в клетках НБ являются RAS-RAF-МЕК, MAPK и JAK-STAT (коэффициенты значимости (-1,127), (-1,018) и 1,674). Активация каскадов происходит от уровня рецепторных протеинкиназ и не зависит от наличия активирующих мутаций в генах, кодирующих компоненты данных сигнальных путей.

3. Неблагоприятные НБ характеризуются глобальным снижением экспрессии малых некодирующих РНК (92 микроРНК с кратным изменением $< -1,5$ и $FDR \leq 0,05$), что приводит к расторможению таких процессов, как позитивная регуляция клеточного цикла (переход G1/S фаз) и митоза, клеточный ответ на стресс, сигнализирование с помощью ГТФаз Rho, TP53-зависимая

транскрипционная регуляция. Потеря онкосупрессорной микроРНК miR-128-3p выступает в качестве независимого фактора прогноза (ОО – 2,4; 95% ДИ 1,2-4,8, $p=0,019$), а в сочетании с гиперэкспрессией гена *TERT* определяет агрессивное течение заболевания (5-летняя БСВ $40,0\pm 1,5\%$).

4. На основании анализа образцов нейрогенных опухолей, сопровождающихся ОМС, была выявлена экспрессионная сигнатура, позволяющая разделять случаи НБ по степени иммуногенности и взаимодействия с клетками реактивного микроокружения. В образцах иммуногенных опухолей обнаружена индукция клеточного и гуморального звеньев иммунитета ($FDR < 0,001$), а также NK клеток ($FDR = 0,011$). Данное разделение не имеет непосредственного прогностического значения, однако, с учётом выявления экспрессии генов, кодирующих корепрессорные молекулы PD1 (увеличение экспрессии $3,45\times$, $FDR = 0,007$) и CTLA4 (увеличение экспрессии $2,83\times$, $FDR = 0,007$), сигнатура может послужить предиктивным маркером эффективности применения ингибиторов контрольных точек иммунного ответа.

5. Анализ случаев созревания НБ и первичных опухолей ЦНС позволил выявить общие механизмы, лежащие в основе данного феномена. Опухоли, подвергшиеся созреванию, характеризовались сходным профилем экспрессии генов с активацией сигнальных путей RAS-RAF-MEK, PI3K-AKT-mTOR, торможением клеточного цикла, репликации и гомологичной рекомбинации ДНК и нарастанием иммуногенности опухоли (для всех биологических процессов $FDR < 0,001$). Было отмечено, что спонтанная регрессия и дифференцировка НБ у детей младше 18 мес. контролируется, в первую очередь, TrkA (*NTRK1*)-зависимым сигнализированием ($p = 0,037$), а у пациентов старше 18 мес. терапевтически-индуцированное созревание определяется изменением активности эпигенетических регуляторов (*EZH2*, $p < 0,001$; *DNMT3A*, $p = 0,016$; *HDAC10*, $p = 0,001$; компонентов комплекса SWI/SNF, $p < 0,003$) и транскрипционных факторов (*GLI1/3*, $p < 0,007$, *KLF4*, $p = 0,002$). Для первичных опухолей ЦНС были характерны оба механизма.

6. При таргетном NGS опухолевой ДНК, позволяющем выявлять как нуклеотидные варианты, так и аномалии числа копий генов, в образцах агрессивных НБ преобладали aberrации в генах *ATM* ($n = 55$, 20,4%), *ALK* ($n = 50$, 18,5%), *ATRX* ($n = 48$, 17,8%), *PTEN* ($n = 44$, 16,3%), *BRCA2* ($n = 38$, 14,1%). Несмотря на высокую частоту выявления онкогенных вариантов в генах *ATM* и *BRCA2* ни в одном случае не было отмечено их биаллельной инактивации. Также не было отмечено реализации феномена HRD.

7. Активирующие миссенс-мутации в гене *ALK* распределены по всей кодирующей последовательности протеинкиназного домена, что оправдывает выбор NGS в качестве метода их выявления. Онкогенные нуклеотидные варианты и амплификация гена *ALK* являются основанием для назначения соответствующих ингибиторов (в первую очередь лорлатиниба), который при сочетании с химиотерапией позволяет достичь объективного ответа в 66,7% и длительной стабилизации заболевания в 16,7% случаев рецидивов НБ и опухолей группы высокого риска.

8. Онкогенные варианты и делеции гена *ATRX* сопровождаются потерей экспрессии белка и определяют второй возрастной период смены биологии и клинического течения НБ. На основании выявления данных aberrаций был определён пороговый уровень возраста манифестации заболевания в 6,58 лет, после которого aberrации в гене *ATRX* встречались более часто (в 18 из 35 случаев, $p < 0,001$), а НБ имеет индолентное прогредиентно прогрессирующее течение, что соответствует клиническому феномену «подростковая НБ».

9. В отдельных редких случаях ($n=9$) в клетках НБ возможна реализация таких агностических предиктивных феноменов, как микросателлитная нестабильность и высокая мутационная нагрузка, что может быть использовано для прогнозирования эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа.

10. На основании ИКД опухоли, определяемого при проведении количественной МРТ, возможна эффективная неинвазивная дифференциальная диагностика нейрогенных опухолей, богатых шванновской стромой (ГН и ГНБ) и НБ (пороговый уровень $1,25 \text{ мм}^2/\text{с}$, $p < 0,001$). Это наиболее важно для выявления прогностически неблагоприятной нодулярной ГНБ в условиях невозможности или травматичности стандартной биопсии. Также пороговый уровень ИКД в $0,78 \text{ мм}^2/\text{с}$ позволяет достоверно разделять случаи НБ с наличием и отсутствием амплификации гена *MYCN* ($p < 0,001$). Введение данных пороговых значений ассоциировано с различиями в БСВ пациентов с нейрогенными опухолями ($p = 0,009$). Среди пациентов с нормальным количеством копий гена *MYCN* величина ИКД и геномный тип опухоли, определённый на основании профиля несбалансированных aberrаций, обладают независимым прогностическим значением.

Практические рекомендации

1. Рекомендуется сохранять гистологический материал пациента и направлять его в референс-лаборатории для выполнения молекулярно-генетического исследования ткани опухоли, которое позволяет выявлять прогностические признаки, а также маркёры чувствительности к препаратам МНТ.

2. Выявленное прогностическое значение экспрессионного классификатора НБ позволяет рекомендовать его для внедрения с целью прецизионного разделения пациентов на группы риска. Ограниченный перечень транскриптов, использованных для создания классификатора, позволяет реализовать его на платформах NanoString или ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией, предъявляющих меньшие требования к качеству РНК по сравнению с высокопроизводительными технологиями.

3. ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией для количественной оценки экспрессии генов *TERT* и *miR-128-3p* является общедоступной и воспроизводимой технологией, позволяющей получать значимую информацию о биологической агрессивности НБ, и рекомендуется для внедрения в практику.

4. Для выявления клинически-значимых нуклеотидных вариантов и аномалий числа копий генов пациентам группы высокого риска и больным с рецидивами заболевания рекомендуется проведение таргетного NGS ДНК, выделенной из ткани опухоли. Обнаруженные aberrации гена *ALK* могут служить основанием для интенсификации лечения прогностически неблагоприятной НБ за счёт применения МНТ.

5. Интерпретация выявленных генетических вариантов и установление их клинической значимости должно производиться специалистами молекулярно-генетической лаборатории, тогда как принятие клинических решений на основании результатов NGS и других методов молекулярной диагностики (рекомендации о назначении ТТ и включении пациента в клинические исследования, интенсификация или де-эскалация терапии) составляет сферу ответственности онколога и, в оптимальном варианте, требует совместного мультидисциплинарного обсуждения с участием детских онкологов и специалистов молекулярно-генетической лаборатории в формате междисциплинарного консилиума.

6. Выявление aberrаций гена *ATRX*, особенно у пациентов подросткового возраста, требует междисциплинарного обсуждения с целью выработки оптимальной тактики лечения и возможной интенсификации терапии, в том числе за счёт ингибиторов ALK, в случае выявления aberrаций соответствующего гена.

7. Сочетание рекуррентной при НБ цитогенетической aberrации – делеции 3p22.2 с инактивирующими нуклеотидными вариантами в гене *MLH1* в редких случаях может привести к MSI, выявление которой с помощью ИГХ или NGS может быть полезно с точки зрения планирования терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа.

8. Пациентам с впервые выявленной опухолью паравертебральной локализации или надпочечника рекомендуется проведение МРТ с построением карт диффузии и расчётом ИКД до хирургического вмешательства и проведения специфического лечения. Это позволит не только оценить распространённость опухоли и наличие хирургических факторов риска, но также неинвазивно предположить гистологический тип и биологические характеристики нейрогенной опухоли.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Druy, A.** Lack of micro-RNA 128A expression as a novel prognostic marker in neuroblastoma patients and combination with TERT hyperexpression to define patient outcomes / A. Druy, G. Tsaur, E. Shorikov, A. Zaychikov, Y. Olshanskaya, L. Saveliev, L. Fechina // *Journal of Clinical Oncology*. –2017. – Vol. 35. – N 15_suppl. – P. e22014.

2. **Друй, А.** Определение молекулярно-генетических подгрупп медуллобластомы на основании анализа уровня экспрессии генов / А. Друй, Л. Ясько, Д. Коновалов, А. Эктова, Э. Валиахметова, Ю. Ольшанская, А. Масчан, Г. Новичкова, Л. Папуша // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2017. – Т. 16. - № 4. – С. 85-89.

3. **Друй, А.Е.** Молекулярно-биологические характеристики медуллобластомы и их прогностическое значение / А.Е. Друй, Л.И. Папуша, Е.А. Сальникова, Ю.В. Ольшанская, А.А. Масчан // Вопросы онкологии. – 2017. – Т. 63. – № 4. – С. 536-544.
4. **Друй, А.Е.** Неблагоприятное прогностическое значение сочетания сниженной экспрессии микро-РНК 128А с гиперэкспрессией гена теломеразы (TERT) у пациентов с нейробластомой / А.Е. Друй, Г.А. Цаур, Е.В. Шориков, А.Н. Зайчиков, Ю.В. Ольшанская, Л.И. Савельев, Л.Г. Фечина // Сборник научных работ III Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2017». – 2017. – С. 172-173.
5. **Druy, A.** Combination of Micro-RNA 128A Downregulation and TERT Overexpression Predicts Unfavorable Outcome in Neuroblastoma Patients / A. Druy, G. Tsaur, E. Shorikov, A. Zaychikov, Y. Olshanskaya, L. Saveliev, L. Fechina // Pediatric blood & cancer. – 2017. – Vol. 64. – N. Suppl 3. – P. e26772.
6. **Druy, A. E.** Prospective investigation of applicability and the prognostic significance of bone marrow involvement in patients with neuroblastoma detected by quantitative reverse transcription PCR / А.Е. Друй, Е.В. Шориков, G.A Tsaur, А.М. Попов, А.Н. Зайчиков, S.N. Tuponogov, L.I. Saveliev, G.A.M Tytgat, L.G. Fechina // Pediatric blood & cancer. – 2018. – Vol. 65. – N 11. – P. e27354.
7. **Druy, A.** Expression Signature Developed on Consensus Gene List Predicts Outcome in Patients with Neuroblastoma Independently from Clinical Risk Group / A. Druy, L. Yasko, Y. Olshanskaya, T. Shamanskaya, D. Kachanov, S. Varfolomeeva, A. Rumyantsev // Pediatric blood & cancer. – 2018. – Vol. 65. – N Suppl 2. – P. e27455.
8. Андреева, Н.А. ALK и нейробластома: от молекулярной генетики до клиники / Н.А. Андреева, **А.Е. Друй**, Т.В. Шаманская, Д.Ю. Качанов, С.Р. Варфоломеева // Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГиО). – 2019. – Т. 6. - № 2. – С. 54-60.
9. **Друй, А.** Иммуноterapia нейробластомы / А. Друй, С. Кулева // Вопросы онкологии. – 2019. – Т. 65. - № 2. – С. 181–187.
10. Ясько, Л.А. Использование технологии NGS для анализа генов, связанных с синдромами предрасположенности к опухолевым заболеваниям / Л.А. Ясько, **А.Е. Друй**, А.В. Павлова, С.Г. Манн, В.В. Бриллиантова, Р.Х. Абасов, Е.В. Райкина, М.А. Курникова // Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГиО). – 2019. – Т. 6. - № S1. – С. 78.
11. Андреева, Н.А. Анализ aberrаций гена ALK при нейробластоме / Н.А. Андреева, **А.Е. Друй**, Т.В. Шаманская, Д.Ю. Качанов, Ю.В. Ольшанская, С.Р. Варфоломеева // Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГиО). – 2019. – Т. 6. - № S1. – С. 154-155.
12. **Druy, A.** Downregulation of MIR128A Expression Reveals a Novel Subgroup of Unfavorable Neuroblastoma and Together with Tert Overexpression Predicts Adverse Outcome / A. Druy, G. Tsaur, A. Chervova, E. Shorikov, A. Zaychikov, L. Saveliev, L. Fechina // Pediatric blood & cancer. – 2019. – Vol. 66. – N Suppl 4. – P. e27989.

13. Yasko, L. Germline Mutations of TP53 Gene Among Children with Cancer from Russia / L. Yasko, M. Kurnikova, I. Mersiyanova, V. Brilliantova, E. Raikina, **A. Druy** // *Pediatric blood & cancer*. – 2019. – Vol. 66. – N Suppl 4. – P. e27989.
14. Андреева, Н.А. Билатеральная адренальная нейробластома: клиническая картина, подходы к диагностике, терапии и результаты лечения. / Н.А. Андреева, Д.Ю. Качанов, Е.Ю. Ильина, А.П. Щербаков, Г.В. Терещенко, Ю.Н. Ликарь, **А.Е. Друй**, В.Ю. Рошин, М.Я. Ядгаров, Т.В. Шаманская // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2020. – Т. 19. - № 4. – С. 66-81.
15. Бабаханова, С.Б. Ганглионейрома как феномен дозревания нейробластомы / С.Б. Бабаханова, Д.Ю. Качанов, А.П. Щербаков, В.Ю. Рошин, **А.Е. Друй**, Ю.Н. Ликарь, Т.В. Шаманская // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2020. – Т.19. - № 4. – С. 133-142.
16. Shamanskaya, T. Results of High-Dose Treosulfan-Containing Regimen in Patients With High-Risk Neuroblastoma / T. Shamanskaya, D. Kachanov, L. Hachatryan, R. Khismatullina, R. Moiseenko, M. Teleshova, E. Skorobogatova, **A. Druy**, L. Zemcova, E. Kurnikova, G. Tereschenko, A. Nechesnyuk, D. Akhaladze, D. Fomin, D. Konovalov, N. Grachev, Y. Likar, M. Maschan, S. Varfolomeeva, G. Novichkova // *Pediatric blood & cancer*. – 2020. – Vol. 67. – N S4. – P. e28742.
17. Andreeva, N. Bilateral Adrenal Neuroblastoma: Clinical and Biological Characteristics / N. Andreeva, D. Kachanov, A. Scherbakov, L. Zemcova, **A. Druy**, Y. Likar, K. Kailash, D. Utaliev, V. Roshchin, E. Ilyina, T. Shamanskaya // *Pediatric blood & cancer*. – 2020. – Vol. 67. – N S4. – P. e28742.
18. **Druy, A.** Immunology of Neuroblastoma. Beyond the Immunotherapy / A. Druy, N. Andreeva, T. Shamanskaya, D. Kachanov // *Pediatric blood & cancer*. – 2020. – Vol. 67. – N S4. – P. e28742.
19. Yasko, L. Multigene Panel Sequencing of Pediatric Patients From Russia With Solid Tumors and Susceptibility for Genetic Predisposition / L. Yasko, M. Kurnikova, **A. Druy**, E. Raikina // *Pediatric blood & cancer*. – 2020. – Vol. 67. – N S4. – P. e28742.
20. Чернышева, О.О. Основные генетические нарушения в патогенезе нейробластомы / О.О. Чернышева, **А.Е. Друй**, Д.Ю. Качанов, Т.В. Шаманская // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2021. – Т. 20. - № 4. – С. 178-184.
21. Спектор, М.А. Интерпретация соматических генетических вариантов, выявленных методом высокопроизводительного секвенирования опухолевой ДНК, на примере онкологических заболеваний детского возраста / М.А. Спектор, Л.А. Ясько, **А.Е. Друй** // *Медицинская генетика*. – 2021. – Т. 20. - № 3. – С. 3-25.
22. Тесаков, И.П. Анализ тромбоцитарной РНК: неинвазивный метод изучения экспрессии опухолевых генов / И.П. Тесаков, А.А. Мартьянов, **А.Е. Друй**, А.Н. Свешникова // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2021. – Т. 20. - № 1. – С. 207-217.

23. Andreeva, N. Pathogenic Variants in The NF1 Gene in Neuroblastoma / N. Andreeva, L. Yasko, T. Shamanskaya, D. Kachanov, M. Kurnikova, **A. Druy** // *Pediatric blood & cancer*. – 2021. – Vol. 68. – N S5. – P. e29349.

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

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

26. Саломатина, А.С. Врожденная нейробластома: обзор литературы и собственный опыт НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева по пренатальной диагностике, клиническому течению и тактике ведения пациентов / А.С. Саломатина, Д.Ю. Качанов, О.Ю. Изотова, А.А. Пухова, В.А. Лопатина, Г.В. Терещенко, Д.М. Коновалов, В.Ю. Рошин, **А.Е. Друй**, Н.А. Андреева, Д.Т. Уталиева, Ю.Н. Ликарь, Г.С. Рабаев, С.Р. Варфоломеева, Т.В. Шаманская // *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. – 2022. – Т. 101. – № 3. – С. 122-133.

27. **Druy, A.E.** Suppressed miR-128-3p combined with TERT overexpression predicts dismal outcomes for neuroblastoma / A.E. Druy, G.A.Tsaur, E.V. Shorikov, G.A.M. Tytgat, L.G. Fechina // *Cancer biomarkers: section A of Disease markers*. – 2022. – Vol. 34. – N 4. – P. 661–671.

28. Тараканова, А.В. Нейробластомы очень высокого прогностического риска: гистологические, иммунофенотипические и генетические характеристики. Обзор литературы и собственные наблюдения / А.В. Тараканова, А.С. Шарлай, **А.Е. Друй**, Д.М. Коновалов // *Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГиО)*. – 2023. – Т. 10. - № 3. – С. 63-69.

29. Шаманская, Т.В. Результаты терапии пациентов с нейробластомой группы высокого риска: опыт НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева / Т.В. Шаманская, С.Р. Варфоломеева, Д.Ю. Качанов, Р.А. Моисеенко, М.В. Телешова, Д.М. Коновалов, В.Ю. Рошин, А.Н. Казакова, Л.В. Земцова, **А.Е. Друй**, М.Я. Ядгаров, Г.В. Терещенко, А.П. Щербаков, Ю.Н. Ликарь, М.Н. Сухов, Н.С. Грачев, Д.Г. Ахаладзе, М.А. Масчан, А.В. Нечеснюк, А.В. Пшонкин, Е.Е. Курникова, Е.В. Скоробогатова, Л.А. Хачатрян, Д.К. Фомин, А.А. Масчан, А.Г. Румянцев, Г.А. Новичкова // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2023. – Т. 22. – №2. – С. 65-91.

30. Шарлай, А.С. Злокачественная строма? Альтернативная локализация классических генетических аберраций в нейробластоме / А.С. Шарлай, Н.В. Гегелия, **А.Е. Друй**, Д.М. Коновалов // *Архив патологии*. – 2023. – Т. 85. – № 4. – С. 47-53.

31. Andreeva, N. MicroRNAs as prospective biomarkers, therapeutic targets and pharmaceuticals in neuroblastoma / N. Andreeva, N. Usman, **A. Druy** // Molecular biology reports. – 2023. – Vol. 50. – N 2. – P. 1895–1912.

32. Андреева, Н.А. Молекулярно-генетические особенности нейробластомы у пациентов подросткового возраста / Н.А. Андреева, Т.В. Шаманская, Д.Ю. Качанов, Р.Х. Абасов, Н.В. Гегелия, **А.Е. Друй** // Успехи молекулярной онкологии. – 2024. – Т. 11. – № 2. – С. 106-115.

33. Уталиева, Д.Т. Вторичные злокачественные опухоли у пациентов после терапии нейробластомы: опыт одного Центра / Д.Т. Уталиева, Д.Ю. Качанов, М.Я. Ядгаров, А.С. Саломатина, **А.Е. Друй**, Н.С. Грачев, Р.А. Моисеенко, Н.В. Бабаскина, Г.А. Новичкова, Т.В. Шаманская // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2024. – Т. 23. – № 3. – С. 59-67.

34. Зверев, И.А. Возможные механизмы созревания нейрогенных опухолей / И.А. Зверев, **А.Е. Друй** // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2024. – Т. 23. – № 3. – С. 76-197.

35. Терещенко, Г.В. Радиогеномика нейрогенных опухолей у детей: ретроспективное исследование / Г.В. Терещенко, В.А. Лопатина, Л.В. Земцова, Д.М. Коновалов, Н.А. Андреева, Т.В. Шаманская, Г.А. Новичкова, Д.Ю. Качанов, **А.Е. Друй** // Лучевая диагностика и терапия. – 2024. – Т. 15. – № 2. – С. 25-34.

36. Шаманская, Т.В. Нейробластома у детей и подростков: эпидемиология, клиническая презентация и диагностика / Т.В. Шаманская, Д.Ю. Качанов, Ю.Н. Ликарь, Д.М. Коновалов, М.Э. Дубровина, А.П. Щербаков, **А.Е. Друй**, Н.А. Андреева, А.С. Шарлай. – М.: Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, 2024. – 104 с. – ISBN 978-5-6049854-2-7.

Список сокращений

БДУ	Без дополнительного уточнения
БСВ	Бессобытийная выживаемость
ГН	Ганглионейрома
ГНБ	Ганглионейробластома
ДИ	Доверительный интервал
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИГХ	Иммуногистохимия
ИКД	Измеряемый коэффициент диффузии
МБ	Медуллобластома
МНТ	Молекулярно-направленная терапия
МРТ	Магнитно-резонансная томография
НБ	Нейробластома
ОВ	Общая выживаемость
ОМС	Синдром опсклонус-миоклонус
ОО	Отношение опасностей
ПЦР	Полимеразная цепная реакция

РНК	Рибонуклеиновая кислота
ТТ	Таргетная терапия
ФАА	Фракция альтернативного аллеля
ХТ	Химиотерапия
ЦНС	Центральная нервная система
DWI	Diffusion-Weighted Image, Диффузионно-взвешенное изображение
ETMR	Embryonal Tumor with Multilayered Rosettes, Эмбриональная опухоль ЦНС с многослойными розетками
FDR	False discovery rate – Значение p с поправкой на множественные сравнения
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization, Флуоресцентная <i>in situ</i> гибридизация
HRD	Homologous Recombination Deficiency, Дефицит гомологичной рекомбинации ДНК
IL	Interleukin, Интерлейкин
INSS	International Neuroblastoma Staging System, Международная система стадирования НБ
MLPA	Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification, Множественная лигазно-зависимая амплификация зондов
MSI	Microsatellite Instability, Микросателлитная нестабильность
NGS	Next Generation Sequencing, Высокопроизводительное секвенирование
ROC	Receiver Operating Characteristic, характеристическая кривая
TMB	Tumor Mutation Burden, Мутационная нагрузка в опухоли