

На правах рукописи

Синиченкова Ксения Юрьевна

Особенности молекулярной диагностики, клинические и прогностические характеристики недифференцированных сарком у детей и подростков

3.1.6. – Онкология, лучевая терапия

3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Москва – 2026

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

Научные руководители:

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

Литвинов Дмитрий Витальевич – доктор медицинских наук, главный врач ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Кулева Светлана Александровна – доктор медицинских наук, заведующая отделением химиотерапии и комбинированного лечения злокачественных опухолей у детей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, главный внештатный детский специалист онколог комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга.

Цуканов Алексей Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник отдела лабораторной генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России.

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.

Защита состоится « __ » _____ 2026 г. в « ____ » часов на заседании диссертационного совета 21.1.025.01 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д.1.

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

Автореферат разослан « __ » _____ 2026 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук.

Жуков Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Расширение возможностей изучения биологии злокачественных опухолей с использованием высокопроизводительных технологий молекулярного анализа привело к выделению новых нозологических единиц на основании описания специфических молекулярных aberrаций и значительному пересмотру классификации Всемирной организации здравоохранения опухолей костей и мягких тканей (WHO, 2021). Радикальные изменения в классификации затронули группу «юингоподобных» сарком, имеющих схожие морфологические и иммуногистохимические (ИГХ) характеристики с саркомой Юинга (СЮ), однако не имеющие классической перестройки гена *EWSR1* с генами-партнерами семейства транскрипционных факторов ETS. При наблюдении за большим количеством пациентов с подобными опухолями обнаружилось не только молекулярно-генетические различия, но и отличные от СЮ особенности их клинического течения, а также ответа на проводимое лечение (С.Р. Antonescu et al., 2017) (У.С. Kao et al., 2016). Наличие различных специфичных молекулярных маркеров и разница в клиническом поведении данных опухолей привела к выделению их в отдельные нозологические единицы, объединённые в раздел недифференцированных мелкокруглоклеточных сарком костей и мягких тканей (НМКкС), куда наряду с СЮ включены саркома с перестройкой гена *CIC*, саркома с альтерацией гена *BCOR*, а также круглоклеточная саркома с non-ETS перестройкой.

В настоящее время диагностика опухолей костей и мягких тканей представляет собой комплексный процесс, состоящий из неотъемлемых этапов морфологической, ИГХ и молекулярно-генетической диагностики. Однако несмотря на мультимодальный подход к морфологической и цитогенетической верификации опухолей, остаются сложные с точки зрения диагностики случаи, к которым относится большинство недифференцированных сарком (НС). НС представляют собой злокачественные опухоли, линейную принадлежность которых невозможно идентифицировать при помощи известных в настоящее время методов (С.Д. Steele et al., 2019). Под это широкое понятие попадает истинно недифференцированная саркома, ключевой диагностической особенностью которой является отсутствие специфических молекулярно-генетических маркеров, NTRK-перестроенная веретенноклеточная опухоль / опухоль с aberrацией генов тирозинкиназного комплекса (NTRK-ПВО), а также представители группы НМКкС – саркома с перестройкой гена *CIC*, саркома с aberrацией гена *BCOR*, мелкоклеточная саркома с перестройкой гена *EWSR1*-non-ETS и СЮ.

Принимая во внимание сложность морфологической диагностики НС, в частности НМКкС, без молекулярно-генетического анализа установление окончательного корректного диагноза невозможно. Однако стандартного

алгоритма молекулярной диагностики с поэтапным применением различных методик в зависимости от морфологического диагноза в настоящее время не разработано, что замедляет процесс верификации окончательного гистомолекулярного диагноза и выбора подходящей тактики ведения пациента.

Несмотря на существенные различия в показателях выживаемости и в биологическом поведении выделенных представителей группы НМКкС, до настоящего времени не разработаны клинические рекомендации по терапии пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIC*, саркомой с аберрацией гена *BCOR*, в связи с чем пациенты продолжают получать лечение, согласно протоколам для лечения СЮ и мягкотканых сарком – Ewing и CWS, соответственно. Данные о сравнении эффективности вышеперечисленных терапевтических схем в научной литературе ограничены в связи с редкостью данной патологии, в особенности в детской популяции, что требует накопления клинического опыта и проведения многоцентровых исследований.

Верификация истинно НС невозможна без комплексной морфологической и молекулярно-генетической диагностики, поскольку данные опухоли могут быть схожи с широким спектром сарком костей и мягких тканей. Пациенты данной группы встречаются крайне редко, зачастую имеют неблагоприятное течение заболевания и требуют поиска альтернативных подходов к терапии.

Новая нозологическая единица – NTRK-ПВО представляет собой редкую опухоль, встречающуюся в разных возрастных группах и характеризующуюся чрезвычайно гетерогенным морфологическим, молекулярно-генетическим и клиническим профилем (J.L. Davis et al., 2022). Успешное применение молекулярно-направленной терапии (МНТ) с использованием ингибиторов белков семейства NTRK существенно улучшило прогноз у этих пациентов (A.V. Desai et al., 2025). Однако, МНТ не всегда приводит к излечению пациента, в связи с чем необходимо наблюдение за большим количеством больных и изучение факторов, влияющих на успех таргетной терапии.

Степень разработанности темы исследования

Доступность методов молекулярно-генетического анализа улучшила понимание биологии НС, что впоследствии привело к выделению новых групп опухолей, характеризующихся вариабельностью клинического течения и прогноза. Саркома с перестройкой гена *CIC* является наиболее сложной не только с точки зрения морфологической диагностики, но и с точки зрения выявления специфического маркера с использованием молекулярно-генетического тестирования. Сложность молекулярной диагностики обусловлена вариабельностью точки разрыва в гене *CIC*, что затрудняет обнаружение химерного транскрипта, а также особенностями наиболее частого гена-партнера – гена *DUX4*, который расположен в нетранслируемой области хромосомы 4q35 и имеет большое количество высокомолекулярных псевдогенов.

Выделение новых нозологических единиц диктует необходимость разработки специализированных протоколов лечения для пациентов с саркомами группы НМКкС с учётом их биологических особенностей и клинического течения заболевания. В настоящее время пациенты с саркомой с перестройкой гена *CIC* и саркомой с абберрацией гена *BCOR* получают лечение, аналогичное СЮ. При этом показатели выживаемости пациентов с саркомой с абберрацией гена *BCOR* схожи с таковыми при СЮ, в то время как саркома с перестройкой гена *CIC* характеризуется агрессивным течением заболевания, зачастую рефрактерным течением на фоне стандартной полихимиотерапии (ПХТ) первой линии и неблагоприятным прогнозом.

Применение таргетной терапии сарком крайне ограничено в связи с редкостью обнаружения предиктивных маркеров при мезенхимальных опухолях, встречающихся преимущественно при таких нозологиях как инфантильная фибросаркома (ИФС), NTRK-ПВО, воспалительная миофибробластическая опухоль (ВМО). ИФС и ВМО представлены в детской популяции, что определяет более частое применение МНТ для лечения мезенхимальных опухолей у детей. NTRK-ПВО описана как у взрослых, так и у детей, однако опыт применения МНТ данной опухоли резко ограничен ввиду её редкой встречаемости. Кроме того, в силу новизны и редкости нозологии, клинические особенности и прогноз у пациентов с NTRK-ПВО мало изучены. Точная и своевременная диагностика данных пациентов важна для обнаружения предиктивного маркера и назначения МНТ с целью улучшения прогноза в неблагоприятных группах, к которым относятся пациенты с первично метастатической формой заболевания, нерезектабельной опухолью или пациенты с плохим ответом на ПХТ. Заподозрить принадлежность опухоли к группе NTRK-ПВО можно по веретеночеточной морфологии, низкой морфологической степени злокачественности опухоли, а также по иммунофенотипу с отсутствием однозначной линейной принадлежности и экспрессией *panTRK*. Диагноз NTRK-ПВО должен быть финализирован с помощью молекулярно-генетической диагностики с определением прямого маркера.

Цель исследования

Разработка алгоритма диагностики и практических рекомендаций для лечения недифференцированных сарком на основании изучения их молекулярно-генетических и клинических характеристик.

Задачи исследования

1. Провести анализ специфических диагностических маркеров НС, выявляемых с помощью молекулярно-генетических методов исследования;
2. Оценить вклад высокопроизводительных методов молекулярной диагностики в уточнение морфологического диагноза;

3. Оценить различия в клиническом течении, ответе на проводимую терапию и исходе заболевания между пациентами с различными видами НС;

4. Оценить выживаемость пациентов с НС¹ в зависимости от локализации, паттерна метастатического распространения опухоли, а также различных протоколов лечения;

5. Изучить эффективность и безопасность использования молекулярно-направленной терапии мягкотканых опухолей при наличии предиктивных биологических маркеров;

Научная новизна исследования

- Впервые проанализирована объединенная когорта, включающая пациентов детского возраста с различными морфологическими и молекулярными вариантами НС (круглоклеточный, плеоморфный, эпителиодноклеточный, веретенчатый варианты, НМКкС, NTRK-ПВО).

- Предложена диагностическая панель, позволяющая эффективно верифицировать случаи саркомы с перестройкой гена *CIC* с помощью технологии таргетного высокопроизводительного секвенирования РНК;

- Разработан классификатор, основанный на анализе дифференциальной экспрессии генов с помощью технологии NanoString, позволяющий различать отдельные типы НМКкС при невозможности выявления прямого диагностического маркера;

- Впервые в педиатрической практике проведено сравнение эффективности различных терапевтических протоколов для лечения больных с НМКкС;

- Впервые в РФ оценена эффективность и безопасность молекулярно-направленной терапии НС с наличием активирующих aberrаций в генах *ALK*, *BRAF*, *MET*, *NTRK1/3*, *RAF1*, *RET*, *ROS1*;

Теоретическая и практическая значимость

Результаты диссертационной работы демонстрируют молекулярно-генетическую и клиническую гетерогенность НС и позволяют усовершенствовать алгоритм их диагностики и подход к терапии. В результате исследования была продемонстрирована значительная частота смены морфологического диагноза после проведения молекулярного тестирования, в результате чего был разработан оптимальный диагностический алгоритм, включающий последовательное применение методов морфологической и молекулярно-генетической диагностики, позволяющий окончательно верифицировать диагноз. Была показана практическая польза использования методики цифрового баркодирования NanoString для

¹ Исследование проведено совместно с Сидоровым И.В. при использовании единого регистра по опухолям костей

определения профиля экспрессии генов в качестве вспомогательного метода диагностики при пограничной степени деградации РНК.

В результате анализа клинического течения и показателей выживаемости при различных типах НС была выделена группа опухолей, характеризующаяся наихудшим прогнозом, к которым относится саркома с перестройкой гена *CIC*, требующая поиска альтернативного подхода к терапии. Была продемонстрирована схожесть молекулярно-генетического профиля пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIC* и истинно НС. Истинно НС представляют собой гетерогенную группу опухолей с точки зрения клинического течения заболевания, характеризующуюся высокой частотой прогрессий на фоне терапии первой линии, как и при саркоме с перестройкой гена *CIC*. В результате сравнения эффективности протоколов CWS и Euro Ewing было продемонстрировано преимущество при использовании юинг-ориентированного подхода терапии в лечении саркомы с перестройкой гена *CIC*, а также отсутствие разницы в показателях выживаемости пациентов с саркомой с абберацией гена *BCOR* вне зависимости от выбранного протокола лечения.

Применение таргетной терапии при NTRK-ПВО имеет высокую частоту наступления ответа и его значительную глубину, однако, возможно развитие резистентности опухоли к препаратам МНТ, что может быть обусловлено молекулярно-генетическими абберациями в неопластической ткани.

Методология и методы диссертационного исследования

Целевой группой исследования стали пациенты с недифференцированными саркомами, а именно, истинно НС, НМКкС, за исключением СЮ и NTRK-ПВО, которые были подвергнуты различным методам молекулярно-генетической диагностики для однозначной верификации диагноза:

1. Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) для выявления перестроек генов *CIC*, *EWSR1*, *BCOR*.

2. Полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для выявления рекуррентных химерных транскриптов с *EWSR1* (NM_005243.4 экзон 7)::*FLII* (NM_002017.5 экзоны 5,6), *EWSR1* (NM_005243.4 экзон 7)::*ERG* (NM_182918.4 экзон 7), *BCOR* (NM_001123385.2 экзон 15)::*CCNB3* (NM_033031.3 экзон 5), *BCOR* (NM_001123385.2 экзон 15)::*MAML3* (NM_018717.5 экзон 2).

3. ПЦР с детекцией методом капиллярного электрофореза для выявления внутренней тандемной дупликации (Internal Tandem Duplication, ITD) в 15 экзоне гена *BCOR* (NM_001123385.2).

4. Таргетное и полнотранскриптомное высокопроизводительное секвенирование РНК для поиска химерных транскриптов, обладающих диагностической значимостью.

5. Таргетное высокопроизводительное секвенирование ДНК для выявления нуклеотидных вариантов в генах, значимых в этиопатогенезе солидных опухолей у детей.

6. Анализ экспрессии генов с помощью технологии NanoString.

Все пациенты были подвергнуты оценке клинических и инструментальных данных. В результате проведения комплексной диагностики пациенты были разделены на группы в соответствии с гистомолекулярным диагнозом: саркома с перестройкой гена *CIC*, саркома с аберрацией гена *BCOR*, NTRK-ПВО, истинно НС. В этих группах были исследованы клинические особенности течения заболевания, общая (ОВ) и бессобытийная (БСВ) выживаемость пациентов. Для пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIC* и саркомой с аберрацией гена *BCOR* проведено сравнение показателей выживаемости в зависимости от протокола лечения. У пациентов с NTRK-ПВО проведена оценка ответа и профиля токсичности на фоне проведения МНТ.

Личный вклад соискателя

Дизайн исследования был разработан лично автором, проведён анализ данных литературы, клинической информации, результатов морфологического, ИГХ и молекулярно-генетических исследований для всех пациентов с НС, включённых в работу. Исследователь принимала участие в интерпретации данных высокопроизводительного секвенирования и других методов молекулярно-генетической диагностики, а также обсуждении тактики ведения и лечения пациентов.

Положения, выносимые на защиту:

1) Результаты молекулярно-генетических исследований позволяют однозначно верифицировать диагноз у пациентов с НС, и в ряде случаев приводят к изменению или уточнению первоначального морфологического диагноза.

2) Показатели ОВ и БСВ пациентов при различных типах НМКкС значительно различаются. У пациентов с саркомой с аберрацией гена *BCOR* 2-летняя ОВ составила – 100,0%, БСВ – 82,1%, в то время как у пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIC* прогноз был значительно хуже – 2-летняя ОВ составила – 70,0%, БСВ – 23,5%. Для пациентов с саркомой с аберрацией гена *BCOR* показатели выживаемости идентичны при использовании терапевтических протоколов группы Euro Ewing и CWS.

3) Несмотря на различную степень морфологической злокачественности, NTRK-ПВО могут характеризоваться агрессивным клиническим течением, низкой чувствительностью к цитостатической ПХТ и требовать проведения МНТ.

4) Истинно НС обладают слабой химиочувствительностью и высокой частотой развития прогрессии заболевания на фоне ПХТ первой линии. Данные опухоли, не имея специфического молекулярного маркера, характеризуются

экспрессионной гетерогенностью, что может послужить основой для их дальнейшей классификации.

Степень достоверности результатов

Для достижения достоверности результатов исследования был проведен анализ актуальных литературных источников, использование современных высокотехнологичных методов морфологической и молекулярной диагностики, включающих FISH, ПЦР, NanoString, высокопроизводительное секвенирование. В исследование вошло 106 пациентов с НС; для обработки данных использовались современные методы биомедицинской статистики и биоинформатики.

Апробация результатов работы

Результаты диссертационной работы доложены на всероссийском конгрессе с международным участием «Инновации в детской гематологии, онкологии и иммунологии: от науки к практике» (1 – 3 июня 2023 г., Москва); IX Международном онкологическом форуме «Белые ночи» (3 – 7 июля 2023 г., Санкт-Петербург); XXVII Российском онкологическом конгрессе RUSSCO (12 – 14 ноября 2024 г., Москва); 37-м Европейском конгрессе патологов (7 – 12 сентября 2024 г., Флоренция); четвертой ежегодной конференции Московского общества медицинских генетиков, (22-23 мая 2025 г., Москва); VII Международном форуме онкологии и радиотерапии «FORLIFE» (15 – 19 сентября 2025 г., Москва); II Российском конгрессе «Актуальные вопросы онкологии и хирургии в педиатрии» (2 – 4 октября 2025 г., Москва); 57-м Конгрессе международного общества детской онкологии (SIOP, International Society of Paediatric Oncology), (20 – 23 октября 2025 г., Амстердам).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования применяются в практической работе для диагностики и лечения пациентов с опухолями костей и мягких тканей у детей в лаборатории молекулярной онкологии, отделении онкологии и гематологии старшего возраста, клинической онкологии, патологоанатомическом отделении ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачёва, а также в практике патологоанатомических отделений ГБУЗ «Морозовская детская клиническая больница» ДЗМ, Российской детской клинической больницы филиала РНИМУ им. Н.И. Пирогова, ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, лаборатории молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница» (г. Екатеринбург), центра лабораторной медицины ООО ЛДЦ МИБС (г. Санкт-Петербург). Полученные результаты работы используются в процессе обучения ординаторов и аспирантов, при профессиональной переподготовке врачей-детских онкологов, врачей

клинической лабораторной диагностики на базе кафедр детской онкологии, клинической онкологии и радиологии, патологической анатомии и клинической лабораторной диагностики ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 5 – в изданиях, 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. Также опубликовано учебное пособие «Саркома Юинга и «юингоподобные саркомы». Диагностика, дифференциальная диагностика» (ISBN 978-5-6048339).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 153 страницах и состоит из глав: «Общая характеристика работы», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследования», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Практические рекомендации». Дополнительно представлен список сокращений и условных обозначений и список используемой литературы, включающий 183 публикаций (13 отечественных и 170 зарубежные). Работа содержит 32 иллюстрации и 18 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика пациентов и проводимой терапии

Данное исследование носило ретроспективный характер и было утверждено решением Учёного Совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России и одобрено Независимым этическим комитетом. Всего за период с сентября 2014 по декабрь 2024 года зарегистрировано 106 пациентов с НС.

В рамках данного исследования к НС были отнесены следующие нозологические единицы: истинно НС (включая плеоморфный (НПС), эпителиоидный (НЭС), веретенноклеточный (НВС) и мелкоклеточный (НМС) морфологические типы), NTRK-ПВО и НМКкС (за исключением СЮ): саркома с перестройкой гена *CIC*, саркома с аберрацией гена *BCOR* и саркома с перестройкой *EWSR1-non-ETS*.

Все случаи были диагностированы на основании гистологического исследования фиксированной и залитой в парафиновый блок ткани первичной опухоли. Во всех случаях проводилась референс-диагностика в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва».

Для проведения лабораторной части исследования и оценки вклада высокопроизводительных методов молекулярной диагностики в уточнение морфологического диагноза и разработки алгоритма диагностики, что соответствует цели и задачам настоящего исследования, были выделены следующие критерии включения в исследование:

- пациенты с доступными образцами ткани опухоли до проведения специфического лечения для проведения морфологической и молекулярно-генетической диагностики в условиях «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»;
- пациенты с экстракраниальной, экстраренальной локализацией опухоли старше 18 лет на момент первичной диагностики.

В клиническую часть исследования, в рамках которой осуществлялся расчёт выживаемости пациентов, сравнение эффективности терапевтических протоколов, разработка практических клинических рекомендаций, включались пациенты с финальным (гистомолекулярным) диагнозом истинно НС, NTRK-ПВО, НМКкС, кроме СЮ, а именно саркома с перестройкой гена *CIC*, саркома с абберацией гена *BCOR*, верифицированным по результатам лабораторной части исследования. Больные были зарегистрированы в регистре по изучению опухолей костей с доступной информацией о клиническом течении заболевания и катамнестическом наблюдении. Данным критериям включения в клиническую часть исследования удовлетворяло 80 из 106 (75,5%). Для подсчётов результатов лечения все опухоли классифицировались по принципу наличия или отсутствия отдалённых метастазов. Оценка ответа на противоопухолевое лечение осуществлялась по критериям RECIST1.1 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors). Для оценки токсичности на фоне проведения МНТ использовалась шкала СТСАЕ (Common Terminology Criteria for Adverse Events). Оценка степени лекарственного патоморфоза проводилась с использованием шкалы Huvos (M.E. Rosen, et al., 1982). Характеристики пациентов, вошедших в исследование, представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика пациентов с НС, включённых в исследование

Фактор		<i>n</i>	%
Входящий морфологический диагноз	НМКкС	10	9,4
	НС	12	11,3
	НКС	17	16,0
	НВС, в том числе с нарушением генов тирозинкиназного комплекса	22	20,8
	НПС	7	6,7
	НЭС	5	4,7
	Саркома с перестройкой гена <i>CIC</i>	14	13,2
	Саркома с абберацией гена <i>BCOR</i>	17	16,0
	Круглоклеточная саркома с перестройкой <i>EWSR1</i> -non-ETS	2	1,9
	Всего	106	100,0
Соотношение мальчики : девочки		2,1:1,1	

Возраст на момент постановка диагноза, месяцы (разброс)		132 (0–213)	
Форма заболевания	Локализованная	72	68,6
	Метастатическая	34	31,4
Первичная локализация	Внутрикостная	36	34,3
	Мягкие ткани	70	65,7
Время наблюдения, месяцы (разброс)		31 (4–125)	

Большинству пациентов, включённых в лабораторную часть исследования ($n=99$, 93,4%), проводилась системная риск-адаптированная терапия согласно протоколам CWS 2014 ($n=36$) и Euro Ewing (версии 2008 и 2012 года) ($n=38$). Тактика локального контроля выбиралась исходя из размеров и расположения первичной опухоли: 37 пациентов получали только хирургическое лечение, 11 пациентов получили только лучевую терапию (дефинитивная лучевая терапия), 40 пациентов получали комбинированный подход, сочетающий хирургическое лечение и лучевую терапию, 11 пациентам локальный контроль не проводился.

В 8 (7,5%) случаях при выявлении молекулярно-генетического маркера чувствительности к МНТ применялась таргетная терапия (исключительно в группе пациентов с NTRK-ПВО). К предиктивным генетическим маркерам относились перестройки генов *NTRK1/3*, *ROS1*, а также мутация *BRAF* p.V600E. В качестве препаратов для МНТ применялись энтректиниб ($n=4$), лорлатиниб ($n=1$), траметиниб ($n=1$), кризотиниб ($n=1$), а также комбинация препаратов дабрафениб и траметиниб ($n=1$).

Молекулярно-генетическая диагностика недифференцированных сарком

В зависимости от входящего морфологического диагноза использовался различный набор и последовательность молекулярно-генетических технологий для верификации финального гистомолекулярного диагноза НС. Метод FISH применялся с использованием локус-специфичных зондов ZytoLight SPEC CIC Dual Color Break Apart (ZytoVision, Германия), ZytoLight SPEC EWSR1 Dual Color Break Apart (ZytoVision, Германия), CytoTest BCOR Break Apart (CytoTest, США).

Все образцы пациентов с входящими морфологическими диагнозами «юингоподобная» саркома, различные варианты НМКкС, НМК, НС проходили исследование методом ОТ-ПЦР (для исключения перестроек *EWSR1::FLI1*, *EWSR1::ERG*, характерных для СЮ). Образцам с входным морфологическим диагнозом саркома с абберацией гена *BCOR* проводилась ОТ-ПЦР для выявления наиболее часто встречающихся аббераций в данной группе: химерных генов *BCOR::CCNB3*, *BCOR::MAML3* и внутренней тандемной дупликации в 15 экзоне *BCOR* с использованием олигонуклеотидов, опубликованных ранее (Y.C. Kao et al., 2018) (T.L. Peters et al., 2015). При достаточном качестве выделенной РНК ($DV_{200}>30$) и отсутствии обнаружения диагностического маркера при ОТ-ПЦР, образцы подвергались секвенированию РНК либо в формате полного транскрипта с помощью набора VANTS Universal V8 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina, $n=16$ (Vazyme, Китай), либо в формате таргетного секвенирования

РНК с использованием панелей TruSight RNA exome, n=7 (Illumina, США), OncoFu Elite, n=12 (Nanodigmbio, Китай). Высокопроизводительное секвенирование осуществлялось на приборах MiSeq и NexSeq500 (Illumina, США) в режиме парно-концевого прочтения (2×75 циклов).

При выявлении экспрессии химерных конструкций с участием генов *EWSR1* с генами семейства ETS, а также перестроек *HEY1::NCOA2* и *EWSR1::POU5F1* диагноз формулировался как СЮ, мезенхимальная хондросаркома и миоэпителиальная карцинома, соответственно, или при обнаружении других диагност-образующих aberrаций пациент исключался из дальнейшего анализа. У 50 образцов, в том числе при пограничном качестве выделенной РНК, ($10 < DV_{200} < 30$), был исследован профиль экспрессии генов, вовлечённых в основные онкогенные сигнальные пути, методом цифрового баркодирования NanoString с использованием таргетной панели nCounter PanCancer Pathways Panel (Nanostring, США).

Образцы пациентов с входящим морфологическим диагнозом NTRK-ПВО, НВС изначально подвергались секвенированию РНК для одновременного выявления диагностических маркеров и мишеней для МНТ. Все образцы, где методами анализа РНК (ОТ-ПЦР, секвенирование РНК) не было выявлено специфических диагностических маркеров, подвергались анализу нуклеотидных вариантов с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования ДНК. Кастомизированная панель (ParSeq Lab, Россия) включала гены, задействованные в молекулярном патогенезе солидных новообразований у детей (приложение 1). В регион интереса входили кодирующие последовательности генов и канонические сайты сплайсинга (как минимум 10 bp интронной последовательности). Секвенирование проводилось на приборе NexSeq550 (Illumina, США) со средней глубиной прочтения региона интереса $>500\times$.

Методы обработки полученных данных

Анализ данных высокопроизводительного секвенирования включал очистку входных данных в формате fastq; картирование последовательностей на референсную последовательность генома человека (GRCh38); маркировку оптических и ПЦР дубликатов; поиск и аннотацию генетических вариантов. Выявление химерных транскриптов проводилось с использованием программы Arriba. Интерпретация клинической значимости выявленных соматических генетических вариантов и химерных конструкций осуществлялась на основании рекомендаций AMP/ASCO/CAP (М.М. Li et al., 2017). Обработка данных экспрессионного анализа проводилась с проведением неконтролируемой иерархической кластеризации образцов, построением «тепловых карт», графиков-вулканов и расчётом дифференциальной экспрессии генов при помощи программы nSolver Analysis Software 4.0 (США).

Первичная обработка данных проводилась в программе Excel Microsoft Office 2020. При статистическом анализе ОВ и БСВ использовался пакет R. БСВ

рассчитывалась от даты появления первых признаков заболевания до развития неблагоприятного события или даты последнего наблюдения. Оценка выживаемости осуществлялась по состоянию на 24 июня 2025 года при помощи метода Каплана-Майера. Сравнение кумулятивной выживаемости осуществлялось с использованием log-rank критерия. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$ (двусторонний тест). Распределение количественных данных оценивалось с помощью критериев Шапиро-Уилка и Лилиефорса. Величины, имеющие нормальное распределение, описывались в виде среднего арифметического и стандартных отклонений, границ 95 % ДИ. Графическое представление наблюдения за пациентами, получающими МНТ, с указанием ответа на проводимую терапию и неблагоприятных событий осуществлялось с использованием «swimmer plot», процент лучшего сокращения опухоли в ответ на проводимую терапию визуализировался в виде «waterfall plot».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярная диагностика недифференцированных сарком и модификация морфологического диагноза

В 7 из 106 образцов (6,6%) был выявлен значительный уровень деградации РНК с $DV_{200} < 10$, что сделало невозможным выполнение любых молекулярно-генетических тестов, в связи с чем данные пациенты не вошли в анализ.

В результате проведения ОТ-ПЦР химерный транскрипт *BCOR::CCNB3* был выявлен в 18 случаях. Специфичные для саркомы с абберацией гена *BCOR* маркеры, выявленные методом высокопроизводительного секвенирования, включали: два случая – *BCOR* ITD, по одному случаю перестроек *BCOR::MAML3* и *YWHAЕ::NUTM2B*. Перестройка гена *CIC* была обнаружена в 15 случаях: *CIC::DUX4* в 7 случаях; *CIC::DUX4L28* в 3 случаях; *CIC::DUX4L9* в 3 случаях, *CIC::NUTM2B* в 1 случае.

Использование нескольких наборов для секвенирования РНК различных производителей, показало различную их эффективность в обнаружении химерных транскриптов с участием генов *CIC* и *DUX4* или его гомологов: панель TruSight RNA exome (Illumina, США) не выявила ни одного случая перестройки из 7 исследованных позитивных образцов, набор VAHTS Universal V8 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina (Vazyme, Китай) позволил обнаружить наличие химерного транскрипта в 6 из 14 исследованных образцов, с помощью панели OncoFu Elite (Nanodigmbio, Китай) было выявлено 11 образцов с наличием химерных конструкций *CIC::DUX4* и *CIC::DUX4Lx* из 12 исследованных позитивных образцов, что делает данную панель предпочтительной для выявления перестроек гена *CIC*.

В качестве вспомогательного метода молекулярной диагностики НМКкС был применён метод NanoString для оценки дифференциальной экспрессии генов. В качестве референсных образцов были отобраны 18 случаев сарком с абберацией

гена *BCOR* (группа «BCOR-сарком») и с перестройкой гена *CIC* (группа «CIC-сарком») с выявленными прямыми маркерами. Всего 32 (32,3%) из 99 образцов без выявленного прямого молекулярного маркера, в том числе с пограничным качеством выделенной РНК ($n=4$, 4,0%), недостаточной для проведения секвенирования РНК ($10 < DV_{200} < 30$), были исследованы на принадлежность к одному из выявленных экспрессионных кластеров. Один образец имел профиль экспрессии генов, соответствующий кластеру «CIC-сарком», и два – «BCOR-сарком», что позволило верифицировать диагноз в данных случаях – Рисунок 1.

Критерием постановки диагноза истинно НС являлось сочетание низкодифференцированной морфологии с отсутствием специфических для других групп опухолей молекулярно-генетических маркеров, которые были исключены при проведении секвенирования ДНК и РНК в 29 образцах. В результате исследования был обнаружен спектр генетических перестроек, имеющих неочевидное диагностическое и клиническое значение, а именно единичные случаи перестроек *ZNF586::ZNF776*, *RIMKLB::RASSF3*, *CTDSP2::CLEC6A*, *RASA1::USP8*, не описанных в литературе, а также по одному случаю выявлены перестройки *PCMTD1::PLAG1* и *CRTC1::SS18*, которые были описаны в единичных наблюдениях в мировой литературе, что в настоящее время не позволяет классифицировать данные опухоли в какую-либо нозологическую единицу, в связи с чем данные пациенты были также отнесены группе истинно НС (А. Tomás-Velázquez et al., 2021) (А. Alholle et al., 2018).

Экспрессионный профиль истинно НС значительно отличался от паттернов, соответствующих группам «CIC-сарком» и «BCOR-сарком», при этом демонстрировал значительную гетерогенность. Неконтролируемая иерархическая кластеризация образцов позволила выделить группу из 11 случаев (37,9%), экспрессионно сходных с саркомами с перестройкой гена *CIC* (кластер «CIC-like»), а также отдельную группу, представленную пятью образцами (кластер «Intermediate»), филогенетически занимающую промежуточное положение между кластерами «CIC-сарком» и «BCOR-сарком». Четыре образца имели совершенно отличный (в том числе, друг от друга) профиль экспрессии генов – Рисунок 1.

Так, группа «BCOR-сарком» характеризовалась повышенной экспрессией генов *NFATC1*, *FZD10*, *HSPA2*, *BCOR*, *DLL1*, *LEF1*, *AR*, *INHBB*, *WNT5B*, *HOXA11*, *WNT11*, *LTBP1*, *SACNA2D3*, *PPP2R2C*, *AXIN2*, *NKDI*, *NOG*, *SOCS2*, *BMP7*, *FGF9* (кратное изменение экспрессии $> 4\times$, значение p с поправкой на множественные сравнения (False Discovery Rate, FDR) $< 0,001$). В группе «CIC-сарком» было выделено 6 наиболее гиперэкспрессированных генов: *SHC4*, *WT1*, *ETV4*, *SHC3*, *CREB3L1*, *ETV1* (кратное изменение экспрессии $> 2,5\times$, FDR $< 0,001$). Анализ дифференциальной экспрессии генов кластера «CIC-like» выявил значимое (FDR $< 0,010$) снижение (кратное изменение экспрессии $< -1,5\times$) генов *DUSP4*, *AMH*, *SHC4*, *CCND2*, *CIC*, *TCF7L1*, *ERCC2*, *ETV1*, *PPP3CA*, *CCNE1*, *HDAC5*, *ETV4*, *PTPN5*, *BMP2*, *H2AFX*, *CDC25C*, *BID*, *SHC3*, *HMGA2*, *FANCE*, *CDC14B*, *PTCH1*, *SIN3A*, *SPRY4*, *RAD51* и, напротив, повышение экспрессии (кратное изменение $>$

3,0×) генов *HOXA10*, *HOXA9*, *HSPA2* по сравнению с группой «CIC-сарком». Кластер «Intermediate» характеризовался значительным увеличением экспрессии (FDR < 0,05, кратное изменение > 2,0×) генов *HDAC4*, *DTX3*, *DDIT3*, *CDK4*, *RASGRP2*, *PTCH1* и *MDM2* в сравнении с группой «CIC-like».

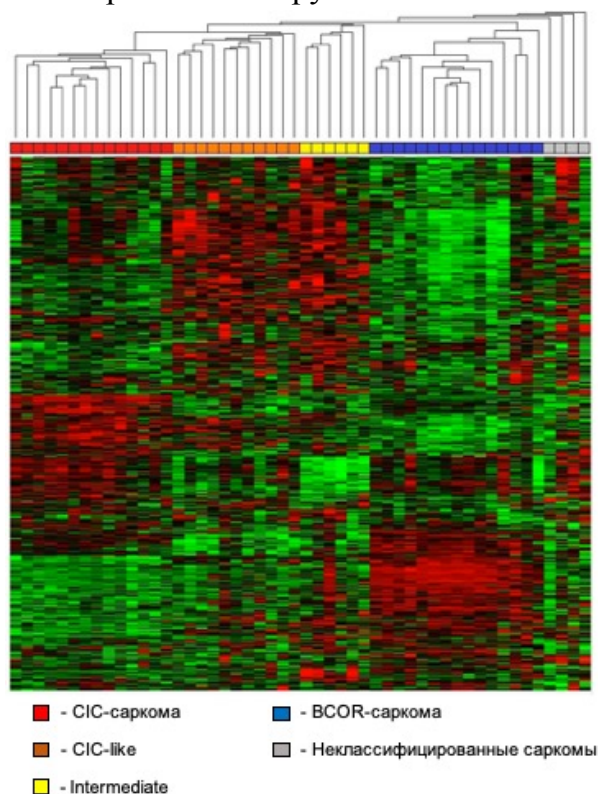


Рисунок 1 – Неконтролируемая иерархическая кластеризация образцов НС с выделением кластеров «CIC-саркома», «BCOR-саркома», «CIC-like» «Intermediate»

У 10 (66,7%) из 15 пациентов с NTRK-ПВО входящий морфологический диагноз соответствовал молекулярно-генетическому, а в остальных четырех случаях направительным диагнозом являлась истинно НС (веретенноклеточный тип) и в 1 случае – НМКкС. В результате секвенирования РНК в 6 (40,0%) случаев выявлена перестройка гена *NTRK1* (*NTRK1::TPR*, $n=2$, *NTRK1::TPM3*, $n=2$, *NTRK1::MYH10*, $n=1$, *NTRK1::LMNA*, $n=1$), реже гена *NTRK3* (*NTRK3::DIP2C*, $n=1$, *NTRK3::KHDRBS1*, $n=1$) и *BRAF* (*BRAF::NRF1*, $n=1$, *BRAF::MTAP*, $n=1$), в индивидуальных случаях обнаруживалась экспрессия химерных генов с участием *ALK* (*ALK::TPM3*), *ROS1* (*ROS1::TFG*), *MET* (*MET::TFG*), *RET* (*RET::MYH10*). При ИГХ-исследовании опухолей с использованием антитела к panTRK ложноотрицательный результат при наличии перестройки генов *NTRK1/3* был выявлен в трёх из шести случаев, также в одном случае была обнаружена экспрессия panTRK в опухоли с наличием химерного гена *MTAP::BRAF*.

Таким образом, верифицированный гистомолекулярный диагноз являлся основанием для разделения пациентов на соответствующие анализируемые подгруппы, в которых в дальнейшем проводился анализ клинических данных и показателей выживаемости:

- 1) НМКкС (саркома с перестройкой гена *CIC*, саркома с абберацией гена *BCOR*);
- 2) NTRK-ПВО;
- 3) Истинно недифференцированные саркомы (НПС, НКС, НЭС, НВС);

В 14 (14,1%) случаях из 99 в результате поэтапной молекулярной диагностики произошла смена морфологического диагноза с выявлением 4 случаев мезенхимальной хондросаркомы (на основании определения перестройки *HEY1::NCOA2*), трех случаев СЮ (*EWSR1::FLI1*, $n=2$ *EWSR1::ERG*, $n=1$), двух пациентов с эпителиоидной саркомой (*SMARCB1* с.520del, р.Аla174Leufs*2 и с.132C>G р.Тyr44*), злокачественной эпителиоидной опухоли с перестройкой гена *GLI1* (*ACTB::GLI1*), 1 случай миоэпителиальной карциномы (*EWSR1::POU5F1*), 1 случай *DICER1*-ассоциированной саркомы (*DICER1* с.5425G>C, р.G1809R и *DICER1* с.3157dupT, р.C1053Lfs*38), *NUT*-перестроенной саркомы (*ZNF532::NUTMI*), в связи с чем вышеперечисленные пациенты не вошли в анализ клинических данных. Процесс преобразования исходного морфологического диагноза в окончательный гистомолекулярный отображен на Рисунке 2.

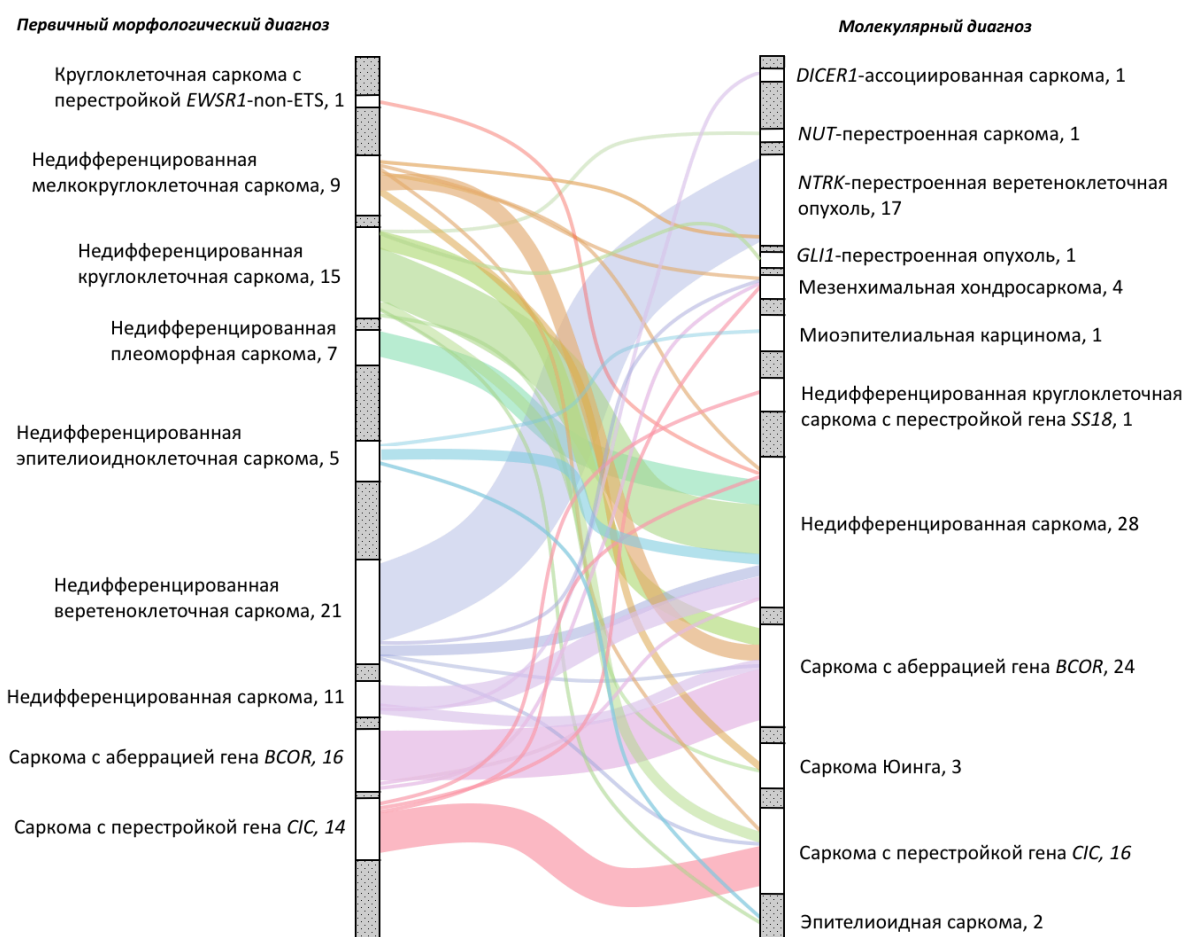


Рисунок 2 – Диаграмма, иллюстрирующая смену первичного морфологического диагноза в результате молекулярно-генетического тестирования в 14,1% случаев (14 из 99 образцов). Слева – первичный морфологический диагноз и количество случаев; справа –

окончательный гистомолекулярный диагноз, сформулированный на основании выявления патогномоничных геномных aberrаций

Анализ клинических данных и выживаемости пациентов группы НМКкС

Медиана возраста на момент заболевания у 24 пациентов с интегрированным диагнозом саркома с aberrацией гена *BCOR* составила 127 месяцев (разброс 4–197 месяцев), а медиана времени наблюдения 37,5 месяцев (разброс 9–125 месяцев), соотношение м:д – 7:1. Локализованная форма встречалась в 79,2% случаев, среди 5 случаев метастатической формы заболевания превалировало поражение лёгких ($n=4$), реже костей скелета ($n=2$), отдалённых лимфатических узлов ($n=2$) и костного мозга ($n=1$). Первичный очаг располагался внутрикостно в 79,2%, реже – в мягких тканях (20,8%). В 41,7% случаев первичный очаг локализовался в костях осевого скелета, реже в костях нижних конечностей (20,8%), в единичных случаях наблюдалось первичное поражение грудной стенки, костей верхних конечностей, мошонки, мягких тканей шеи и брюшной полости – Таблица 1.

Таблица 1 – Общие характеристики пациентов, вошедших в анализ клинических данных

<i>Гистомолекулярный диагноз</i>	Саркома с перестройкой гена <i>CIC</i>	Саркома с aberrацией гена <i>BCOR</i>	Истинно НС	NTRK-ПВО
Общее число пациентов, <i>n</i>	16	24	25	15
Возраст, месяцы (разброс)	172,5 (34–199)	127 (4–197)	164,5 (5–211)	79 (0–197)
Соотношение м:д	2,2:1	7:1	1,9:1	1:2
Наличие отдалённых метастазов, <i>n</i> (%)	10 (57,0)	5 (20,8)	7 (28,0)	1 (6,7)
<i>Расположение первичного очага</i>				
Внутрикостно, <i>n</i> (%)	2 (12,5)	19 (79,2)	7 (28,0)	0 (0,0)
Мягкие ткани, <i>n</i> (%)	14 (87,5)	5 (20,8)	18 (72,0)	15 (100,0)
<i>Неблагоприятное событие</i>				
Прогрессия на терапии, <i>n</i> (%)	5 (31,2)	0 (0,0)	9 (36,0)	1 (6,7)
Рецидив, <i>n</i> (%)	4 (25,0)	10 (41,6)	2 (8,0)	2 (13,3)
Летальный исход	8 (50,0)	2 (8,3)	4 (16,0)	2 (13,3)
<i>Выживаемость</i>				
2-летняя БСВ, % (95%ДИ)	23,5 (7,4–74,2)	82,1 (68,0–99,7)	55,0 (37,0–81,0)	79,0 (61,0–100,0)

2-летняя ОВ, % (95%ДИ)	70,0 (49,1–99,7)	100,0	86,0 (72,0–100,0)	93,0 (82,0–100,0)
Время наблюдения, месяцы (разброс)	15 (4–55)	37,5 (9–125)	15 (3–117)	40 (20–108)

Медиана времени до наступления неблагоприятного события у пациентов с саркомой с абберацией гена *BCOR* составила 27 месяцев. Двухлетняя БСВ составила 82,1% (95% ДИ 68,0–99,7%), а 2-летняя ОВ – 100,0%. Четырёхлетняя БСВ составила 58,7% (95% ДИ 40,0–86,1%), а 4-летняя ОВ – 88,2% (95% ДИ 74,2–100,0%), полученные данные свидетельствует о склонности опухоли к позднему рецидивированию – Рисунок 3 А. Рецидив заболевания развился в 41,6% случаев, у 8 пациентов имел локальный характер, а у 2 – комбинированный. Среди 8 пациентов, у которых произошел локальный рецидив, в 4 (50,0%) случаях методом локального контроля являлось только оперативное лечение, у 3 (37,5%) пациентов – дефинитивная ЛТ и у 1 пациента комбинированный метод локального контроля в виде оперативного лечения и лучевой терапии. Высокая частота рецидивов у пациентов с локализованной формой саркомы с абберацией гена *BCOR* может быть объяснена тропностью заболевания к костям осевого скелета, где чаще всего применяется только дефинитивная лучевая терапия. Среди 5 пациентов с отдалёнными метастазами рецидив развился у 3 пациентов: 1 системный, 1 локальный и 1 комбинированный.

Медиана возраста на момент постановки диагноза у 16 пациентов с интегрированным диагнозом саркома с перестройкой гена *CIS* составила 172,5 месяцев (разброс 34–199 месяцев), медиана времени наблюдения – 17 месяцев (разброс 6–53 месяца), соотношение м:д = 2,2:1. Превалировала метастатическая форма заболевания (57,0%), наиболее частой зоной отдалённых метастазов являлись лёгкие ($n = 10$), реже регионарные лимфатические узлы ($n=2$). Первичный очаг локализовался преимущественно в мягких тканях (87,5% случаев) –Таблица 1.

Медиана времени до наступления неблагоприятного события у пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIS* составила 14 месяцев. Двухлетняя БСВ составила 23,5% (95% ДИ 7,4–74,2%), а ОВ – 70,0% (95% ДИ 49,0–100%) – Рисунок 3 Б. При анализе влияния распространённости заболевания на показатели выживаемости у пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIS* достоверных различий получено не было: при локализованной форме заболевания 18-месячная БСВ – 40,0% (95% ДИ 13,7–100%), а при метастатической – 38,1% (95% ДИ 14,3–100%) ($p=0,957$); Аналогично, показатели 2-летней ОВ составили 80,0% (95% ДИ 51,6–100%) при локализованной форме заболевания и 47,6% (95% ДИ 22,0–100%) при метастатической ($p=0,822$). Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что локализованная стадия заболевания не является однозначным предиктором благоприятного прогноза у пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIS*, что соответствует высокой биологической агрессивности опухоли.

У пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIC* отмечалась высокая частота развития прогрессии на терапии – 31,3%, чаще в виде локальной прогрессии (25,0%). Развитие рецидива наблюдалось в 25,0% случаев – у троих пациентов отмечался системный рецидив и у одного – локальный. Все пациенты с развитием неблагоприятного события погибли от прогрессии заболевания.

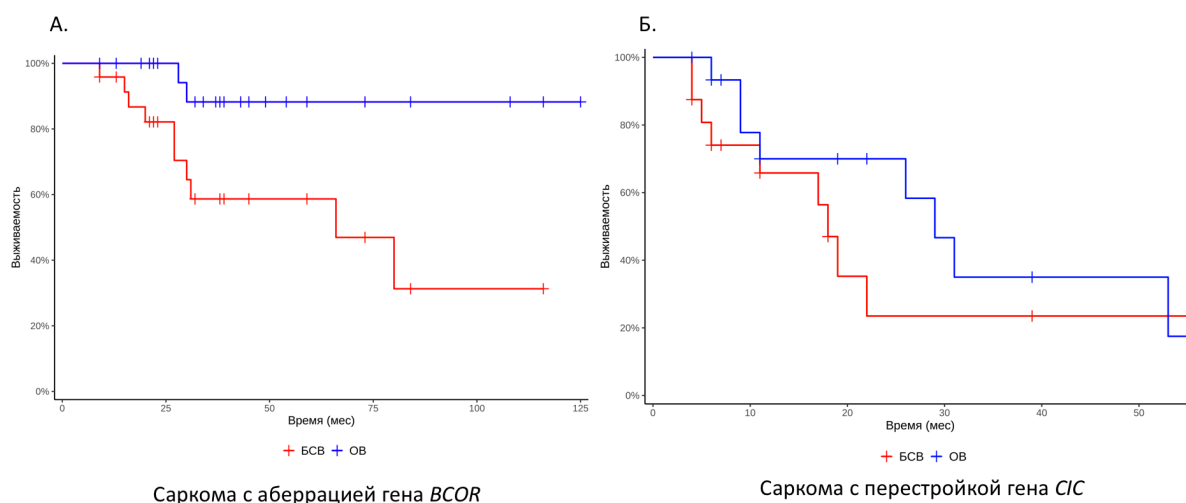


Рисунок 3 – Показатели БСВ и ОВ пациентов с саркомой с абберацией гена *BCOR* (А) и саркомой с перестройкой гена *CIC* (Б)

Сравнение эффективности протоколов лечения у пациентов с НМКкС

При анализе влияния протоколов лечения на выживаемость пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIC* отмечалось тенденция к более высоким показателям при использовании юинг-ориентированного протокола лечения только в группе пациентов с отдалёнными метастазами: показатель 2-летней БСВ достиг 75,0% (95% ДИ 43,0–100,0%), 2-летней ОВ – 85,7% (95% ДИ 63,4–100%) по сравнению с результатами применения протокола CWS, где 2-летняя БСВ составила 20,0% (95% ДИ 3,5 –100,0%), 2-летняя ОВ – 33,3% (95% ДИ 10,7–100,0%) ($p=0,453$) Рисунок 3 Б. Полученные данные свидетельствуют о потенциальной пользе более интенсивного режима ПХТ в рамках юинг-ориентированного протокола лечения для пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIC* с наличием отдалённых метастазов, что подтверждает международные данные, полученные на взрослой популяции пациентов.

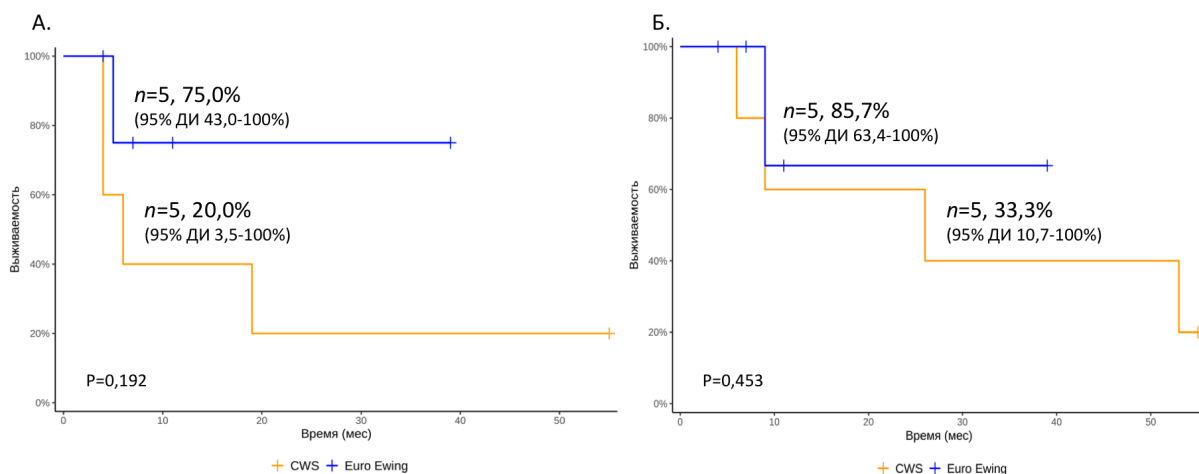


Рисунок 3 – БОВ (А) и ОБ (Б) пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIC* с наличием отдалённых метастазов в зависимости от протокола лечения CWS ($n=5$) и Euro Ewing ($n=5$)

При анализе эффективности протоколов CWS и Euro Ewing у пациентов с саркомой с абберацией гена *BCOR* достоверной разницы в выживаемости получено не было ($p=0,953$ при сравнении БОВ и $p=0,896$ для ОБ). Анализ выживаемости в зависимости от формы заболевания был невозможен в связи с немногочисленностью пациентов с наличием отдалённых метастазов ($n=5$). Таким образом, использование более интенсивного протокола лечения Euro Ewing у пациентов с саркомой с абберацией гена *BCOR* не приводило к улучшению показатели выживаемости – Рисунок 4.

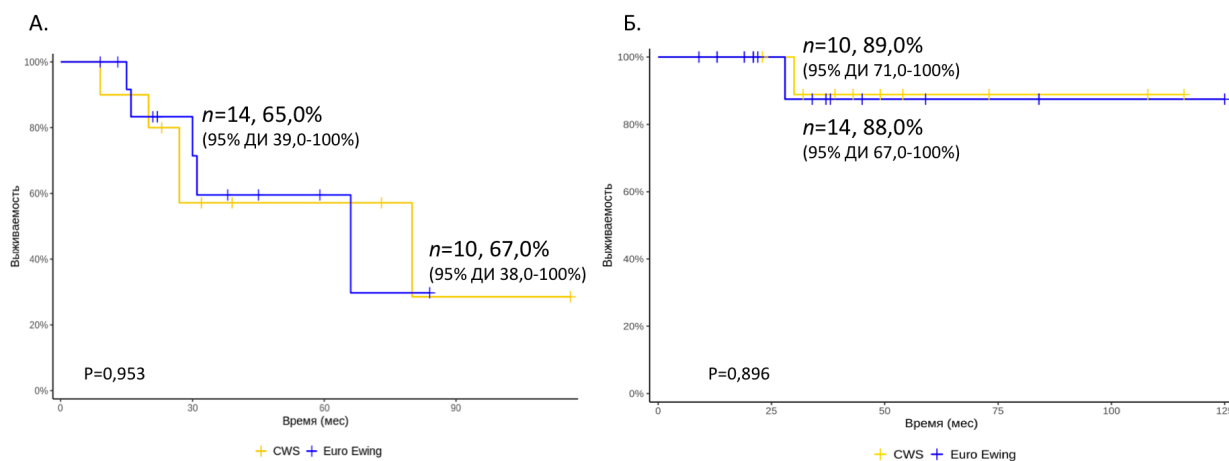


Рисунок 4 – БОВ (А) и ОБ (Б) пациентов с саркомой с абберацией гена *BCOR* в зависимости от протокола лечения CWS ($n=10$) и Euro Ewing ($n=14$)

Анализ клинических данных и результатов лечения пациентов с истинно недифференцированными саркомами

Среди 25 пациентов с истинно НС, вошедших в анализ клинических данных, медиана возраста составила 164,5 месяцев (разброс 5-117 месяцев), отмечалось преобладание у лиц мужского пола с соотношением м:д – 1,9:1.

Локализованная форма была преобладающей ($n=18$, 69,2%), а первичный очаг преимущественно находился в мягких тканях ($n=19$, 73,1%) – Таблица 1. Плеоморфная морфология была преобладающей ($n=11$, 44,0%), реже встречалась – НКС ($n=7$, 28,0%), НВС ($n=4$, 16,0%), НЭС ($n=3$, 12,0%). Медиана времени наблюдения за пациентами составила – 15 месяцев (разброс 3 – 117 месяцев).

Большинство пациентов получали ПХТ – 88,0% ($n=22$). У трёх больных (12,0%) единственным методом лечения являлось хирургическое удаление локализованной опухоли; из них у 1 больного возник локальный рецидив, потребовавший ампутации конечности и начала ПХТ. Двое других пациентов находятся в продолжающейся ремиссии на протяжении 15 и 22 месяцев. Наиболее частым протоколом для системного лечения был протокол CWS ($n=12$, 54,6%), юинг-ориентированный протокол лечения (Euro Ewing) использовался у 8 (36,4%) пациентов, один (4,0%) пациент получал терапию согласно протоколу для лечения остеосаркомы (Euramos).

В 11 (44,0%) случаях применялся комбинированный метод локального контроля, сочетающий хирургическое лечение с последующим проведением лучевой терапии; проведение дефинитивной лучевой терапии было у одного (4,0%) пациента с параменингеальной локализацией опухоли, у 11 (42,3%) проводилось только хирургическое лечение.

При проведении анализа ответа на ПХТ отмечалась высокая частота ($n=9$, 36,0%) прогрессии на фоне ПХТ первой линии, что являлось самым частым неблагоприятным событием у пациентов с данной нозологией. Показатель 2-летней БСВ пациентов с истинно НС составил 55,0% (95% ДИ 37,0–81,0%) достигнув медианы событий в 46 месяцев, а 2-летней ОВ – 86,0% (95% ДИ 59,0–100,0%). Рецидив по завершении программного лечения случился лишь у 2 (8,0%) пациентов – среди которых один ранний в виде рецидива по ранее пораженным лёгким и один поздний системный рецидив в виде метастатического поражения лёгких.

Размера первичной опухоли более 200 см³ ухудшал показатели 2-летней выживаемости – 41,0% (95% ДИ 19,0–89,0%) для БСВ и 48,0% (95% ДИ 23,0–98,0%) для ОВ, в сравнении с пациентами, имевшими объем первичной опухоли менее 200 см³, где БСВ достигала 62,0% (95% ДИ 41,0–95,0%), а ОВ 100,0% ($p=0,037$). Наличие отдалённых метастазов ухудшало прогноз пациентов – 2-летняя БСВ составила 19,0% (95% ДИ 3,6–98,0%), при локализованной форме заболевания – 70,0 (95% ДИ 51,0–96,0%) ($p=0,073$). Однако влияния метастатического распространения опухоли на ОВ отмечено не было: при метастатической форме 2-летняя ОВ составила 70,0% (95% ДИ 42,0–100,0%) и 74,0% (95% ДИ 51,0–100,0%) при локализованной форме заболевания ($p=0,797$). Достоверных данных влияния морфологического варианта НС на прогноз заболевания получено не было – развитие прогрессии заболевания отмечалось при всех морфологических вариантах истинно НС, однако ОВ была лучше в группах НВС и НКС, где не было зафиксировано летальных исходов. Стоит отметить, что статистической

значимости различий получено не было, учитывая немногочисленность пациентов данной группы ($p=0,639$).

Принадлежность к определённому экспрессионному кластеру истинно НС показало тенденцию к различию в показателях выживаемости – лучшие значения ОВ были у пациентов кластера «Intermediate» (100,0%), 2-летняя БСВ составила 50,0% (95% ДИ 12,5–100,0%). ОВ пациентов, принадлежащих к экспрессионной группе «CIC-like» была ниже (2-летняя ОВ – 81,8% (95% ДИ 67,1–100,0%), БСВ – 62,3% (95% ДИ 38,9–99,9%) – Рисунок 5).

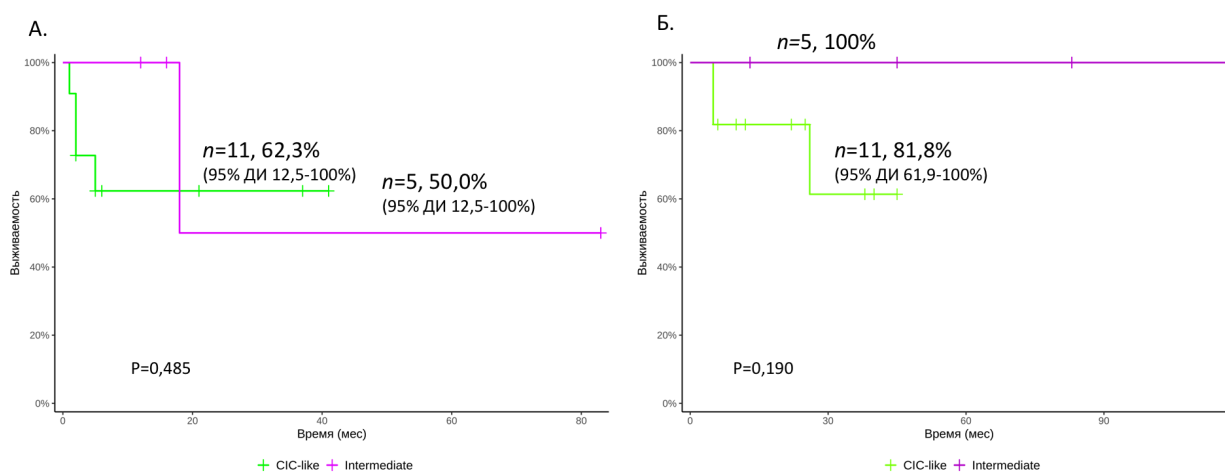


Рисунок 5 – БСВ (А) и ОВ(Б) пациентов в зависимости от профиля экспрессии генов: «CIC-like» и «Intermediate»

Анализ клинических данных и результатов лечения пациентов с NTRK-перестроенными веретеночлеточными опухолями

Среди 15 верифицированных пациентов с NTRK-ПВО медиана возраста составила 79 месяцев (разброс 0–197 месяцев), а медиана времени наблюдения – 40 месяцев (разброс 20–108 месяцев). Соотношение м:д составило 1:2. Преобладающими признаками были низкая степень морфологической злокачественности ($n=12$, 80,0%), локализованная форма заболевания ($n=14$, 93,3%), исключительное первичное поражение мягких тканей ($n=15$, 100,0%). Наиболее частыми локализациями первичной опухоли были мягкие ткани головы ($n=6$, 40%) и туловища / брюшной полости ($n=5$, 33,3%).

Системное лечение получало большинство пациентов ($n=10$, 66,7%), 5 (33,3%) пациентам выполнялось только радикальное удаление опухоли. Большая часть пациентов получала МНТ низкомолекулярными ингибиторами протеинкиназ ($n=8$, 80,0%), 6 из них – параллельно ($n=1$) или последовательно с ПХТ. Оценка динамики опухоли на ПХТ была возможна у 5 пациентов: у 3 отмечался частичный ответ, у 1 – стабилизация заболевания и у 1 – прогрессия заболевания – Рисунок 6.

Исходя из драйверного молекулярного события в качестве препаратов для МНТ использовались: энтректиниб ($n=4$ при перестройках $MYH10::NTRK1$, $TPR::NTRK1$, $TPM3::NTRK1$, $DIP2C::NTRK3$), лорлатиниб ($n=1$ при $TGF::ROS1$),

траметиниб ($n=1$ при $MTAP::BRAF$), кризотиниб ($n=1$ при $TGF::MET$), а также комбинация препаратов дабрафениб и траметиниб ($n=1$ при $BRAF$ p.V600E).

Оценка сокращения опухоли на фоне МНТ была возможна у всех 8 пациентов. В половине случаев в результате применения МНТ был достигнут полный ответ, у трёх пациентов отмечался частичный ответ, и у одного – стабилизация заболевания – Рисунок 7. Медиана времени наступления лучшего ответа составила 11 месяцев (разброс 1–26 месяцев). Медиана длительности МНТ составила 28 месяцев (разброс 6–36 месяцев).

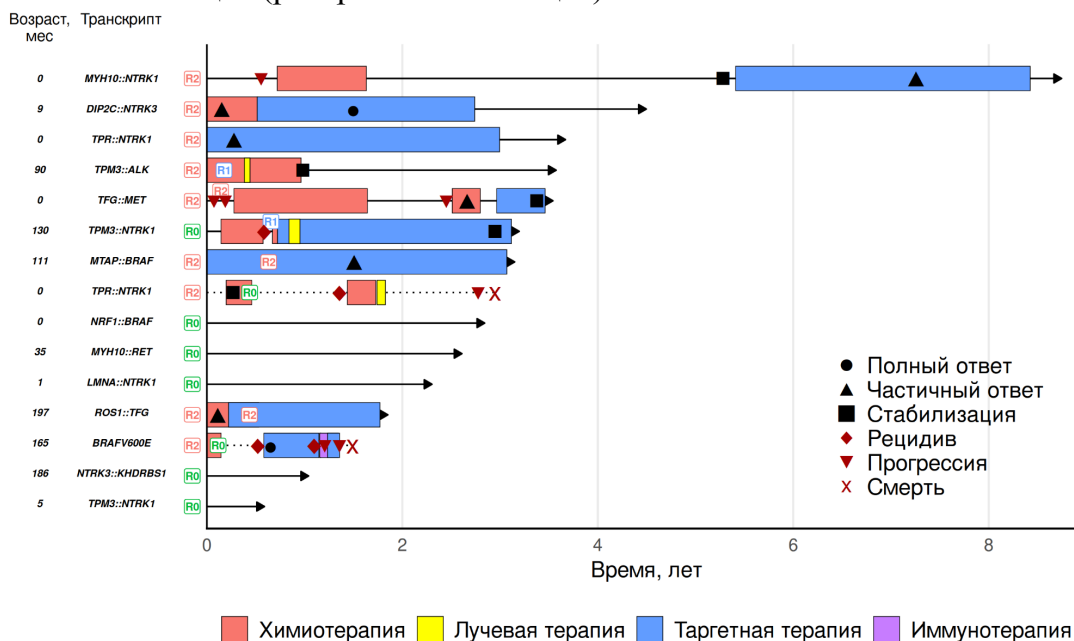


Рисунок 6 – График «Swimmer plot» иллюстрирующий результаты лечения и исход у пациентов с NTRK-ПВО

На момент написания диссертационной работы МНТ продолжается у трех пациентов, прекращена также у пяти больных – у четырёх по прошествии как минимум двух лет терапии с сохранением достигнутого ответа, у одного – по причине прогрессии заболевания.

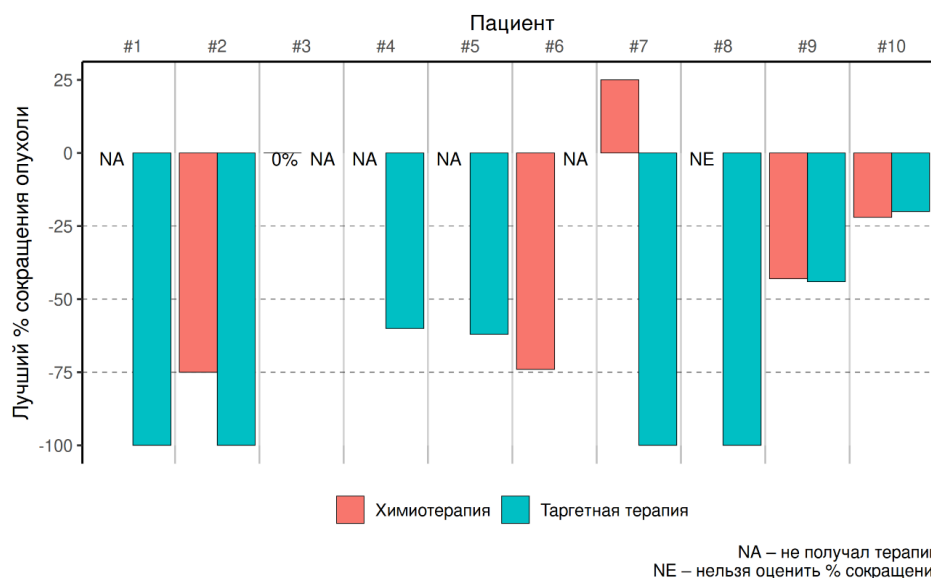


Рисунок 7 – График сравнения сокращения опухоли у пациентов с NTRK-ПВО на фоне ПХТ и МНТ

Среди всей исследуемой когорты у 3 (20,0%) наблюдалось развитие неблагоприятного события: в 2 случаях – локальный рецидив, и в 1 случае – локальная прогрессия заболевания. Медиана наступления неблагоприятного события составила 14 месяцев (разброс 12–22 месяца). Смерть от прогрессии заболевания наступила у двух (13,3%) пациентов, среди которых лишь один пациент получал МНТ препаратами дабрафениб и траметиниб при наличии мутации *BRAF* p.V600E. В данном случае было отмечено быстрое развитие эффекта МНТ с достижением полного ответа опухоли через 1 месяц, который оказался непродолжительным (6 месяцев).

Показатели выживаемости пациентов с различными видами недифференцированных сарком

Анализ значений 2-летней БСВ среди всех типов НС продемонстрировал наихудшие показатели у пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIC* – 23,5% (95% ДИ 7,4–74,2%). У пациентов с саркомой с абберацией гена *BCOR*, 7-летняя БСВ составила 58,7% (ДИ 40,0–86,1%), что подчеркивает более позднее наступление рецидива заболевания в этой группе пациентов. Наилучшими показателями 2-летней БСВ были отмечены в группе пациентов с NTRK-ПВО – 79,0% (95% ДИ 61,0–100,0%) ($p=0,010$), которые оставались такими же при подсчете 4-летней БСВ. В результате анализа ОВ пациентов наилучшие показатели наблюдались у пациентов с саркомой с абберацией гена *BCOR* как при расчёте 2-летней (100,0%), так и 7-летней ОВ – 88,2% (95% ДИ 74,2–100,0%). Наихудшие значения наблюдались в группе сарком с перестройкой гена *CIC*, где 4-летняя ОВ составила 17,5% (95%ДИ 3,4–90,1%) ($p < 0,001$) – Рисунок 8.

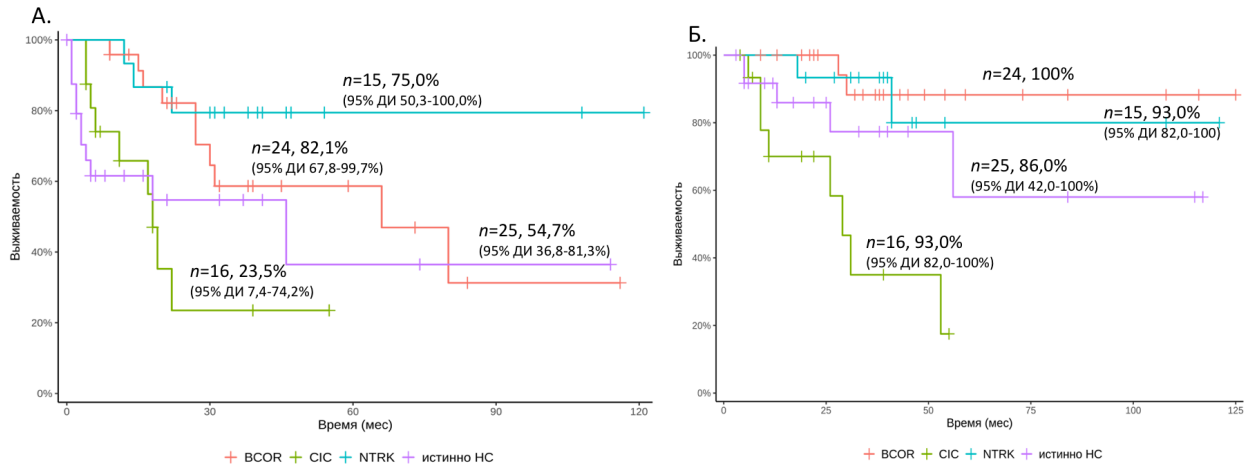


Рисунок 8 – БСВ (А) и ОБ (Б) пациентов с НС, включенных в исследование: больные саркомой с перестройкой гена *CIC* ($n=16$), саркомой с абберацией гена *BCOR* ($n=24$), истинно НС ($n=25$) и NTRK-ПВО ($n=15$)

Алгоритм диагностики недифференцированных сарком

В результате анализа соответствия первичного морфологического диагноза окончательному гистомолекулярному, стало очевидно, что универсального молекулярно-генетического метода и однозначной очерёдности проведения молекулярных тестов для широкого разнообразия различных видов НС нет. На основании проведённого исследования с целью экономии времени и ресурсов был разработан алгоритм маршрутизации пациентов на тот или иной этап молекулярного тестирования в зависимости от морфологического вида НС – Рисунок 9.

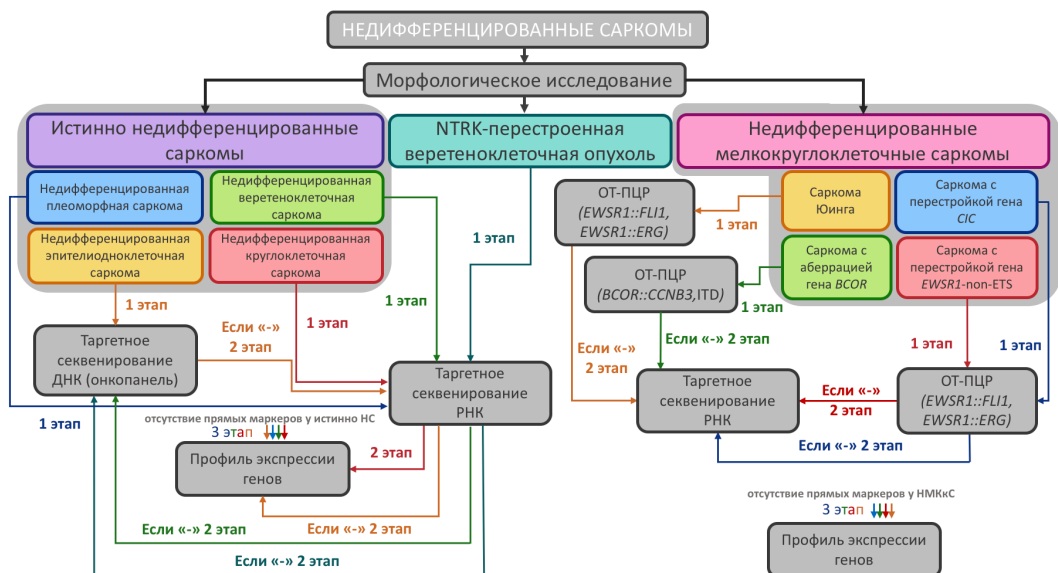


Рисунок 9 – Алгоритм диагностики НС в зависимости от входящего морфологического диагноза

У пациентов с входящим диагнозом истинно НС, при патоморфологической картине недифференцированной саркомы с эпителиоидной морфологией клеток, рекомендовано первым этапом провести анализ делеций/мутаций в гене *SMARCB1* с помощью технологии FISH, MLPA и секвенирования ДНК, после чего, в случае отрицательного результата – секвенирование РНК для исключения известных химерных генов. Для остальных вариантов истинно НС первым этапом молекулярной диагностики рекомендовано выполнение секвенирования РНК. В случае отсутствия патогномичных aberrаций при различных морфологических типах истинно НС, финальным этапом молекулярной диагностики может быть исследование профиля экспрессии генов, который в настоящее время у данных пациентов имеет научное значение (определение принадлежности к кластерам «CIC-like» и «Intermediate»).

Материал пациентов с подозрением на NTRK-ПВО на первом этапе должен быть направлен для проведения секвенирования РНК в связи с наиболее частым выявлением перестроек генов семейства рецепторных или цитоплазматических протеинкиназ, в случае отрицательного результата – таргетное секвенирование ДНК для поиска активирующих мутаций в генах, кодирующих протеинкиназы.

При установлении морфологического диагноза СЮ или саркомы с перестройкой гена *CIC*, рекомендовано на первом этапе молекулярной диагностики провести ОТ-ПЦР (исключение перестроек *EWSR1::FLII* и *EWSR1::ERG*). Рутинный поиск при помощи ОТ-ПЦР редких генов-партнеров *EWSR1*, как *ETV1*, *ETV4*, *FEV*, а также перестроек гена *FUS*, на долю которых приходится 1% случаев СЮ, не целесообразен, и эти случаи могут быть диагностированы при помощи таргетного секвенирования РНК, которое может быть рекомендовано в качестве второго этапа молекулярной диагностики при отрицательном результате ОТ-ПЦР. Отсутствие специфических генетических перестроек будет указывать на соответствие диагнозу истинно НС и, в этом случае, возможно исследование профиля экспрессии генов с использованием классификатора, содержащего образцы с выявленными прямыми молекулярными маркерами.

Образцы с пограничным качеством выделенной РНК ($10 < DV_{200} < 30$), не позволяющим выполнить ОТ-ПЦР или секвенирование РНК, при невозможности получения альтернативного материала удовлетворительного качества, на первом этапе молекулярной диагностики могут подвергаться исследованию профиля экспрессии генов с использованием классификатора, содержащего образцы НС с выявленным прямым молекулярным маркером.

ВЫВОДЫ

1. В результате молекулярно-генетического исследования НС в 76 случаях (71,7%) были выявлены специфические aberrации, позволяющие верифицировать или уточнить диагноз.
2. В 14,1% произошла смена инициального морфологического диагноза, что делает молекулярный этап диагностики неотъемлемым для финализации

диагноза. Определение профиля дифференциальной экспрессии генов методом цифрового баркодирования NanoString может являться вспомогательным методом диагностики при пограничном качестве опухолевой РНК, не позволяющем выполнить ОТ-ПЦР или секвенирование РНК.

3. Саркома с перестройкой гена *CIC* имеет наихудший прогноз среди всех НС: 2-летняя БСВ составила 23,5% (95% ДИ 7,4–74,2%), ОВ – 70,0% (95% ДИ 49,0–100,0%). Локализованная стадия заболевания не является предиктором благоприятного прогноза у пациентов с саркомой с перестройкой гена *CIC*. Применение более интенсивного юинг-ориентированного химиотерапевтического протокола имеет преимущество у пациентов с метастатической формой заболевания, позволяя улучшить показатели 2-летней БСВ до 75,0% (95% ДИ 43,0–100,0%) в сравнении с 20,0% (95% ДИ 3,5–100,0%) ($p=0,192$) при использовании протокола CWS и его версий, однако различия находятся на уровне тенденции.

4. Саркома с аберрацией гена *BCOR* характеризуется более высокими показателями 2-летней ОВ и БСВ: 100% и 82,1% (95% ДИ 68,0–99,7%), соответственно. При этом заболевание склонно к наступлению поздних рецидивов, медиана развития которых составила 66 месяцев (разброс 2–116 месяцев). Высокая частота рецидивов (41,6%) при высокой долгосрочной ОВ свидетельствует о благоприятном течении рецидива заболевания, поддающегося повторному химиотерапевтическому лечению. Применение терапевтических протоколов Euro Ewing или CWS не оказывало влияния на показатели 5-летней БСВ и ОВ (БСВ для протокола CWS – 67,0% (95% ДИ 38,0–100,0%) и 65,0% (95% ДИ 39,0–100,0%) для Euro Ewing, ОВ для протокола CWS – 89,0% (95% ДИ 71,0–100,0) и 88,0% (95% ДИ 67,0–100,0%) для Euro Ewing) в связи с чем проведение более интенсивного юинг-ориентированного подхода не целесообразно у данной группы пациентов.

5. Анализ пациентов с истинно НС свидетельствует об агрессивном течении заболевания с высокой частотой (36,0%) прогрессии на терапии, медиана наступления которой составила 5 месяцев (разброс 4–18 месяцев). Экспрессионное профилирование выявило гетерогенность среди истинно НС без специфического молекулярного маркера, что может явиться основой для дальнейшей классификации данных опухолей.

6. NTRK-ПВО характеризуется облигатным наличием предиктивного молекулярного маркера, определяющего чувствительность к различным вариантам МНТ. Её применение позволяет добиться глубокого и продолжительного ответа опухоли в подавляющем большинстве случаев с частотой наступления объективного ответа в 100% наблюдений. В рамках настоящей работы случаи выявления маркеров чувствительности к МНТ ограничивались исключительно NTRK-ПВО.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Необходимо облигатное поэтапное молекулярно-генетическое тестирование ткани опухоли при выявлении любого типа НС в условиях

оснащённых референс-лабораторий, позволяющее финализировать диагноз и выявить мишени для МНТ.

2. Для верификации саркомы с перестройкой гена *CIC* и выявления прямого молекулярно-генетического маркера предпочтительнее использовать таргетную панель для секвенирования РНК, позволяющую осуществлять эффективную гибридизацию 3' нетранслируемой области гена *CIC*, например, OncoFu Elite.

3. Определение профиля дифференциальной экспрессии генов рекомендуется для внедрения в практику в качестве дополнительного метода диагностики НС при высокой степени деградации РНК ($10 < DV_{200} < 30$) и отсутствии возможности получения альтернативного материала удовлетворительного качества.

4. Пациентам с диагнозом саркома с аберрацией гена *BCOR* в качестве терапии первой линии рекомендовано применение менее интенсивных режимов химиотерапии, лежащих в основе протокола CWS, с целью снижения токсичности от проводимого лечения и сохранения резерва химиотерапевтических агентов в случае рецидива заболевания.

5. При необходимости системной терапии пациентов с NTRK-ПВО рекомендуется рассмотрение вопроса о назначении МНТ в первой линии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Молекулярно-биологические и диагностические особенности саркомы Юинга и группы недифференцированных мелкокруглоклеточных опухолей костей и мягких тканей / **Синиченкова К.Ю.**, Рощин В.Ю., Друй А.Е. // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2021. – Т.13. – №1. – С. 24–31.

2. EWSR1-TFCP2 in an adolescent represents an extremely rare and aggressive form of intraosseous spindle cell rhabdomyosarcomas / Panferova A, **Sinichenkova K.Y.**, Abu Jabal M., Usman N., Sharlai A., Roshchin V., Konovalov D., Друй А. // Cold Spring Harb Mol Case Stud. – 2022. – Vol. 29. – N. 8. – P. a006209.

3. First case of undifferentiated embryonal sarcoma of the liver in a child with neurofibromatosis type 1, treated by hepatic chemoperfusion with transcatheter arterial chemoembolization / **Sinichenkova K.**, Yasko L., Akhaladze D., Petrushin A., Konovalov D., Abasov R., Mareeva Y., Melekhina O., Usman N., Karachunsky A., Novichkova G., Litvinov D., Друй А. // Frontiers oncology. – 2022. – Vol. 24. – N. 12. – P. 981230.

4. Интракраниальные мезенхимальные опухоли со слиянием генов FET–CREB / Дегтярев В.А, Панферова А.В., Зайцева М.А., Друй А.Е., **Синиченкова К.Ю.**, Мареева Ю.М., Рощин В.Ю., Артемов А.В., Папуша Л.И. // Вопросы

гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2023. – Т. 22. – №4. – С. 127–133.

5. Саркома Юинга и «юингоподобные» саркомы. Диагностика, дифференциальная диагностика: учебное пособие / Сидоров И.В., Федорова А.С., Панферова А.В, **Синиченкова К.Ю.**, Друй А.Е. и др. – 2023. – С. 32.

6. Diagnostic challenge and tumor response to target therapy in BRAF ex15 double mutated spindle cell sarcoma / **Sinichenkova K.Yu.**, Sidorov I.V., Krivencova N.A., Konovalov D.M., Abasov R.H., Usman N.Yu., Karachunskiy A.I., Novichkova G.A., Litvinov D.V., Druy A.E. // *Oncotarget*. – 2024. – Vol.15. – P. 493-500.

7. CIC-перестроенная саркома мимикрирующая псевдоопухоль у пациента с гемофилией / Артёмов А.Ю., **Синиченкова К.Ю.**, Ворочай А.М., Панферова А.В. Сидоров И.В., Коновалов Д.М, Грачев Н.С., Большаков Н.А., Друй А.Е. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2024. – Т. 24. – №2. – С.175–180.

8. Особенности молекулярной диагностики и клинические характеристики детей и подростков, больных саркомой с перестроенной гена CIC / **Синиченкова К.Ю.**, Панферова А.В., Абасов Р.Х, Гегелия Н.В., Сидоров И.В., Шарлай А.С., Коновалов Д.М., Литвинов Д.В., Новичкова Г.А., Друй А.Е. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2025. – Т. 24. – №3. – С. 87–95.

9. Молекулярно-генетические и клинические характеристики детей и подростков с саркомой с аберрацией гена BCOR / **Синиченкова К.Ю.**, Панферова А.В., Абасов Р.Х, Гегелия Н.В., Сидоров И.В., Шарлай А.С., Коновалов Д.М., Литвинов Д.В., Новичкова Г.А., Друй А.Е. // *Вопросы онкологии*. – 2025. – Т. 71. – №4. – С. 810–818.

Список использованных сокращений

БСВ – бессобытийная выживаемость

МНТ – молекулярно-направленная терапия

ИГХ – иммуногистохимический

НС – недифференцированная саркома

НПС – недифференцированная плеоморфная саркома

НВС – недифференцированная веретеночлечная саркома

НЭС – недифференцированная эпителиодноклеточная саркома

НКС – недифференцированная круглоклеточная саркома

НМКкС – недифференцированная мелкокруглоклеточная саркома

ОВ – общая выживаемость

ПХТ – полихимиотерапия

РНК – Рибонуклеиновая кислота

СЮ – саркома Юинга

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

DV₂₀₀ – процентное соотношение фрагментов РНК с длиной больше 200 пар оснований.

NTRK – ПВО – NTRK- перестроенная веретеноклеточная опухоль

FISH – флуоресцентная гибридизация in situ

FDA – Food and Drug Administration

ITD – internal tandem duplication