

DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-4-105-110

FOXO1-негативная альвеолярная рабдомиосаркома: описание случая редкой опухоли

В.Д. Белобокова, К.О. Кальченко, Т.М. Михалевская, Д.В. Кочубинский, М.В. Белевцев, Л.П. Киселев

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минский район, д. Боровляны

Ряд актуальных публикаций подтверждают важность точной молекулярно-генетической диагностики опухолей мягких тканей. Метод секвенирования следующего поколения может быть эффективным как для поиска мишеней таргетной терапии, прогнозирования агрессивного поведения новообразования, так и для уточнения диагноза саркомы в нестандартных случаях. В настоящем исследовании представлен случай FOXO1-негативной альвеолярной рабдомиосаркомы у 3-летнего ребенка. Для верификации диагноза был применен метод высокопроизводительного секвенирования. Проведена молекулярно-генетическая диагностика образца опухолевой ткани с использованием панели генов TruSight Tumor 170 (Illumina, США). В результате исследования обнаружена редкая транслокация NZD1-FGFR4, ранее не описанная в литературе при альвеолярных рабдомиосаркомах. Родители пациентки дали согласие на использование информации, в том числе фотографий ребенка, в научных исследованиях и публикациях. **Ключевые слова:** альвеолярная рабдомиосаркома, транслокация NZD1-FGFR4, секвенирование, FOXO1-негативная альвеолярная рабдомиосаркома

Белобокова В.Д. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2022; 21 (4): 105–110. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-4-105-110

FOXO1-negative alveolar rhabdomyosarcoma: a case report of a rare tumor

V.D. Belobokova, K.O. Kalchenko, T.M. Mikhalevskaya, D.V. Kochubinsky, M.V. Belevtsev, L.P. Kiselev

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany, Minsk Region, Belarus

The results of modern research confirm the importance of an accurate assessment of the molecular pathogenesis of soft tissue tumors. The use of next-generation sequencing can be effective both for finding targets for targeted therapy and predicting aggressive behavior of tumors, and for clarifying the diagnosis in non-standard cases. Here, we report a case of FOXO1-negative alveolar rhabdomyosarcoma in a 3-year-old child. To verify the diagnosis of this patient, we used high-throughput sequencing. Using the TruSight Tumor 170 gene panel (Illumina, USA), we carried out molecular genetic testing of the patient's tumor sample and discovered a rare NZD1-FGFR4 translocation that had not been previously reported to occur in alveolar rhabdomyosarcoma. The patient's parents gave their consent to the use of their child's data, including photographs, for research purposes and in publications.

Key words: alveolar rhabdomyosarcoma, NZD1-FGFR4 translocation, sequencing, FOXO1-negative alveolar rhabdomyosarcoma

Belobokova V.D. et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2022; 21 (4): 105–110. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-4-105-110

Рабдомиосаркома (РМС) – наиболее часто встречающаяся опухоль мягких тканей у детей, которая представляет собой быстрорастущее, агрессивное злокачественное новообразование, развивающееся из недифференцированных мезенхимальных клеток. Клинические проявления и течение болезни у пациентов с РМС вариативны и зависят от множества факторов, включающих локализацию опухоли, морфологический вариант, возраст и наличие метастатического распространения онкологического процесса. Необходимым стандартом для верификации диагноза альвеолярной РМС является обнаружение транслокации PAX3-FOXO1 или

PAX7-FOXO1. Выявление одного из указанных вариантов транскрипта является определяющим доказательством альвеолярного варианта РМС, который характеризуется неблагоприятным прогнозом и подразумевает необходимость использования более интенсивных программ терапии [1–3]. На сегодняшний день результаты ряда исследований свидетельствуют об отсутствии неблагоприятного прогноза при альвеолярном варианте РМС в случае отсутствия транслокации PAX3-FOXO1 или PAX7-FOXO1 (FOXO1-негативные варианты) [1–3]. Для таких пациентов (около 20% случаев) рекомендовано использование стандартных неинтенсифицированных подходов в

© 2022 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 18.05.2022
Принята к печати 15.06.2022

Контактная информация:

Белобокова Виктория Дмитриевна, научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43
E-mail: belobokova.victoria@gmail.com

© 2022 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 18.05.2022
Accepted 15.06.2022

Correspondence:

Victoria D. Belobokova, a researcher at the Laboratory of Molecular Genetic Research at the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Belarus Address: 43 Frunzenskaya St., Borovlyany 223053, Minsk Region, Belarus
E-mail: belobokova.victoria@gmail.com

лечения, разработанных для эмбриональной РМС [2, 3]. Таким образом, молекулярно-генетические особенности РМС оказывают непосредственное влияние на выбор стратегии терапии. Обнаружение новых редких транслокаций может внести клиническое преимущество посредством прогнозирования клинических исходов, в первую очередь для пациентов с *FOXO1*-негативными вариантами альвеолярной РМС. В настоящей работе представлен случай обнаружения транслокации *NZD1-FGFR4* у ребенка с альвеолярной *FOXO1*-негативной РМС, не описанный ранее (по нашим данным) в научной литературе. От родителей ребенка было получено информированное согласие об использовании результатов инструментальных методов исследования в научных целях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациентка Л., в возрасте 3 лет мама заметила невыраженный экзофтальм. Девочка была осмотрена офтальмологом и госпитализирована в областную больницу, где получила консультации невролога, офтальмолога и нейрохирурга. На момент осмотра у пациентки отсутствовали болевой синдром и признаки очаговой симптоматики. Была выполнена компьютерная томография (КТ) головного мозга, выявлено образование височной доли. Проведена биопсия образования на базе Республиканского научно-практического центра неврологии и нейрохирургии, после чего для дальнейшей диагностики и

лечения девочка была переведена в Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии. На момент поступления в биохимическом анализе крови инициальный уровень лактатдегидрогеназы – 866 Ед/л. В пунктате костного мозга атипичные клетки не выявлены. В ликворе: белок 0,21 г/л, цитоз $2,67 \times 10^9$ /л, эритроциты – $2-5 \times 10^{12}$ /л, лимфоциты – 12×10^9 /л, нейтрофилы – 1×10^9 /л, моноциты – 4×10^9 /л, эозинофилы – 2×10^9 /л. При осмотре офтальмологом выявлены начальные проявления застоя диска зрительного нерва на стороне поражения.

По данным сцинтиграфии с Тс-99 выявлен участок патологического накопления радиофармпрепарата в проекции костей лицевого черепа, наружной стенки орбиты, подвисочной ямки слева до 230%.

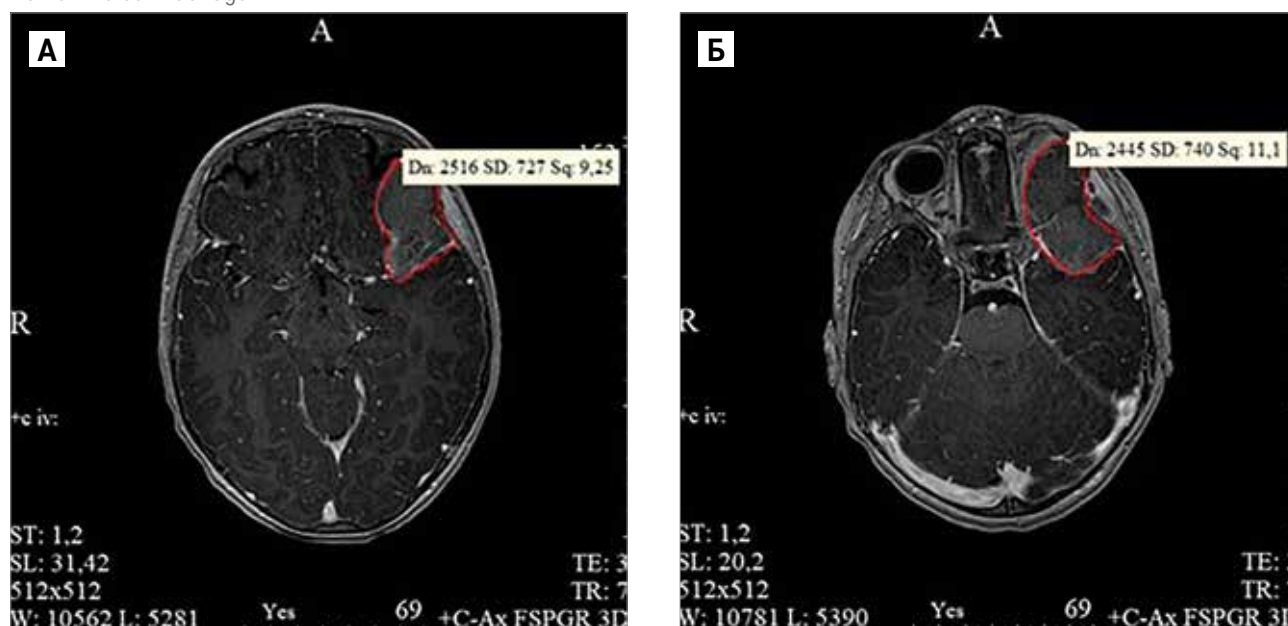
Пациентке проведена магнитно-резонансная томография (МРТ) головного мозга. По результатам МРТ-визуализации в области верхнелатеральной стенки левой глазницы определяется объемное образование с интраорбитальным ($31 \times 18 \times 23$ мм) и интракраниальным ($43 \times 21 \times 38$ мм) распространением, неоднородной структуры в верхних отделах за счет локального жирового вкрапления. Отмечается небольшой экстракраниальный компонент 10×5 мм, параоссальные мягкие ткани левой височной области нерезко утолщены, наблюдается изменение сигнала на Т2-импульсной последовательности, накапливают контрастное вещество. Опухоль оказывает масс-эффект на приле-

Рисунок 1

МРТ головного мозга: А – Т2-взвешенное изображение (TSE), аксиальная проекция; Б – режим FSPGR 3D с контрастным усилением, аксиальная проекция, опухоль мягких тканей глазницы с интракраниальным компонентом с четким краем, умеренно накапливающая контрастное вещество

Figure 1

A magnetic resonance image of the brain: A – an axial T2-weighted image (TSE); Б – an axial contrast-enhanced FSPGR 3D image showing a tumor of the soft tissues of the orbit with intracranial extension, a sharp contour and moderate accumulation of the contrast agent



жащие височную и лобную доли головного мозга (рисунок 1).

При нативном КТ-исследовании в левой глазнице определяется объемное образование, широким основанием прилежащее к костным структурам на данном уровне с местнодеструктирующим ростом. Опухоль гиперденсивная (от +47 до +55 HU) по отношению к мозговой ткани, с четкими неровными наружными контурами. Костные структуры (левая скуловая, большое крыло клиновидной кости и глазничная часть лобной кости слева) неоднородные за счет деструкции и линейной периостальной реакции. Верхние яремные лимфатические узлы слева до 12 × 7 мм. При КТ-исследовании органов грудной полости данных за наличие интрапульмонального метастазирования не получено.

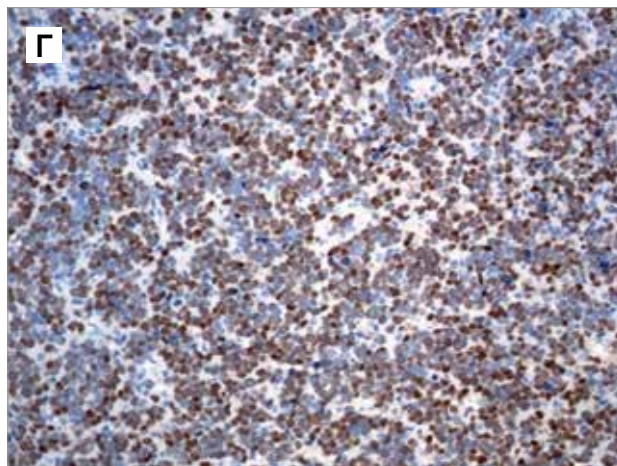
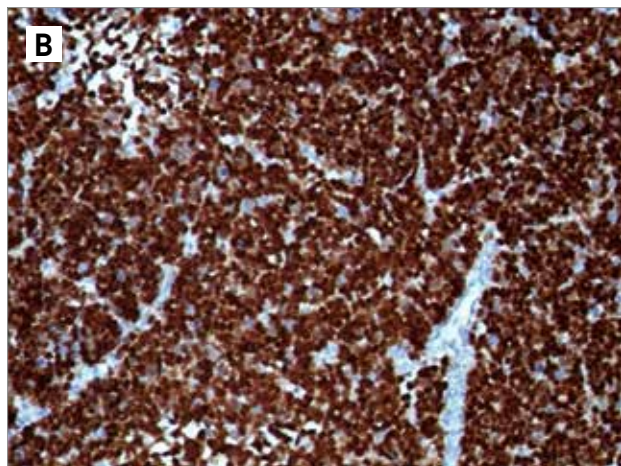
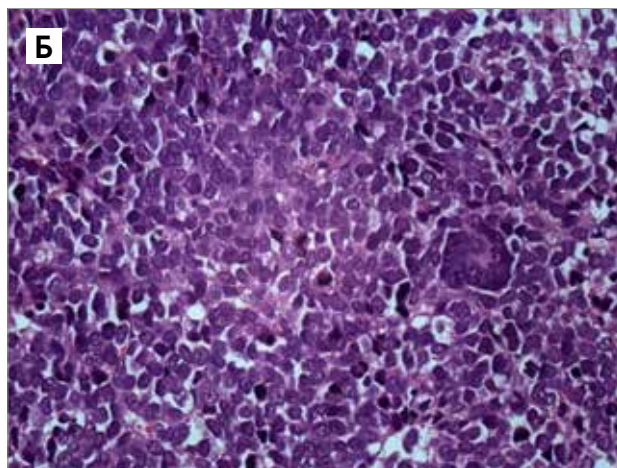
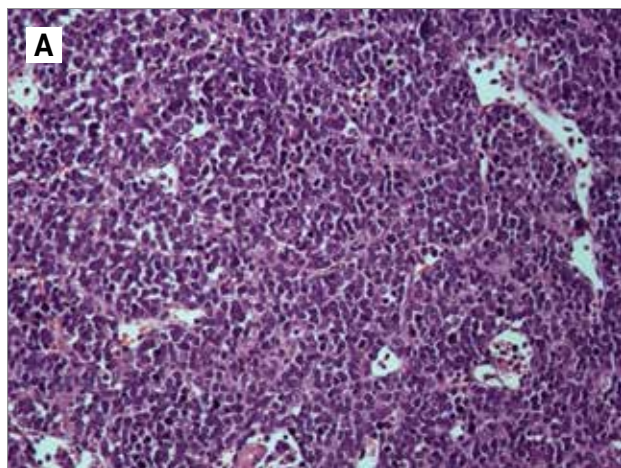
Выполнена открытая биопсия новообразования. По результатам гистологического исследования

Рисунок 2

Гистологическое исследование опухолевой ткани: А – солидные пласты низкодифференцированных клеток, разделенные сосудами синусоидного типа, окраска гематоксилином и эозином, × 100; Б – среди опухолевых клеток встречаются многоядерные симпласты, частые фигуры митозов, окраска гематоксилином и эозином, × 400; В – иммуногистохимическое окрашивание с антителом к myogenin – положительное ядерное окрашивание в 100% опухолевых клеток, × 200; Г – иммуногистохимическое окрашивание с антителом к Olig2 – положительное ядерное окрашивание в 85% опухолевых клеток, × 200

Figure 2

The histological examination of the tumor tissue: А – solid layers of poorly differentiated cells separated by sinusoids, hematoxylin & eosin staining × 100; Б – there are multinucleated symplasts among tumor cells, frequent mitotic figures, hematoxylin & eosin staining × 400; В – immunohistochemistry with antibodies to myogenin – positive nuclear staining in 100% of tumor cells × 200; Г – immunohistochemistry with antibodies to Olig2 – positive nuclear staining in 85% of tumor cells × 200



биопсийного материала выявлена злокачественная низкодифференцированная опухоль с очагово-солидным типом роста. Сосудистая сеть была представлена многочисленными сосудами синусоидного типа, признаки классической сосудистой пролиферации отсутствовали. Очаги некроза также отсутствовали. Опухолевые клетки преимущественно являлись мономорфными, округлыми, с крупным округлым ядром с диспергированным хроматином без ядрышек и с очень тонким ободком цитоплазмы. Встречались единичные гигантские клетки типа симпластов (рисунок 2). Установлена высокая пролиферативная активность – до 8–9 митозов на HPF. При проведении иммуногистохимического исследования с широким спектром антител в опухолевых клетках определялась экспрессия LIN28a, Desmin, Synaptophysin, WT1, Myogenin, CCNB3 и Olig2. При этом экспрессия Myogenin носила диффузный

характер. Экспрессия GFAP, CD99, Vcl2, S100, LCA, EMA, PanCK, Oct4 и HMB45 отсутствовала, ядерная экспрессия INI1 была сохранена. Примечательно, что опухолевые клетки экспрессировали антигены Olig2 и Synaptophysin, характерные для нейроэпителиальных опухолей головного мозга. При проведении полимеразной цепной реакции транскрипты *PAX3-FKHR*, *PAX7-FKHR*, *SYT-SSX* не выявлялись.

По данным первичного диагностического комплекса выставлен диагноз: альвеолярная РМС области верхнелатеральных стенок левой глазницы с интраорбитальным и интракраниальным распространением, местнодеструктурирующим ростом, масс-эффектом на прилежащие отделы головного мозга с поражением верхнеяремного лимфоузла слева рТ3bN1M0 (согласно TNM-классификации 2017 г.), III стадия; T4bN1M0, без установления стадии согласно 8-му изданию TNM-классификации Американского объединенного комитета по раку (American Joint Committee on Cancer). Группа очень высокого риска (на основании гистологического варианта согласно протоколу RMS-2005).

Пациентке выбрана тактика использования системной терапии согласно протоколу RMS-2005 с использованием доксорубина. После 4 блоков полихимиотерапии (IVADo: ифосфамид, винкристин, актиномицин, доксорубин) зафиксирована регрессия интраорбитального компонента до 24 × 3 × 15 мм (регрессия на 52%). Интракраниальный компонент достоверно не определялся.

Выполнена орбитотомия в целях тотального удаления опухоли в объеме R0–1 (край отсечения – костная стенка). Гистологическое исследование показало полный патоморфоз опухоли (IV степень по Huvos).

Продолжена полихимиотерапия согласно протоколу RMS-2005 (5 блоков IVA). Учитывая неблагоприятный морфологический вариант опухоли, принято решение о проведении 6 блоков IVA и дистанционной лучевой терапии на место первичной локализации опухоли и периферические лимфоузлы (суммарная очаговая доза 50 Гр). В качестве завершающего этапа терапии пациентка получила 6 блоков поддерживающей химиотерапии (VNL + CPM). В настоящий момент, спустя 9 мес, девочка находится в ремиссии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения NGS-данных было применено секвенирование таргетной панели онкогенов в образцах биопсийного материала РМС. Из полученных образцов ДНК и РНК были приготовлены библиотеки с применением наборов реагентов TruSight Tumor 170 (Illumina, США) согласно прото-

колу производителя. Пробоподготовка образцов для высокопроизводительного секвенирования генов, ассоциированных с опухолями мягких тканей (170 генов), включала фрагментирование ДНК, синтез комплементарной ДНК, фланкирование целевых регионов, лигирование технических последовательностей, гибридизацию зондов, амплификацию фрагментов библиотеки и нормализацию библиотеки. Далее образцы были эквимольно пулированы. Для достижения необходимого покрытия (более 500 прочтений на 1 нуклеотид) оптимальным количеством на 1 запуск прибора являлось 8 образцов. Денатурация и разведение библиотеки осуществлялись согласно протоколу Illumina: Denature and Dilute Libraries Guide for NextSeq System. Высокопроизводительное секвенирование проводили на приборе NextSeq 500 с использованием реагентов NextSeq Reagent Kit V3 (Illumina, США).

На основе анализа данных высокопроизводительного секвенирования были осуществлены поиск и аннотация однонуклеотидных вариантов, коротких инсерций/делеций и перестроек в геноме опухоли. Обработка полученных данных была выполнена с помощью автоматизированного софта BaseSpace (Illumina). Для оценки патогенности и консервативности выявляемых генетических вариантов использовались данные, которые извлекались из следующих баз данных: COSMIC, Clinvar, OMIM. Информация о частоте мутаций была получена на основе данных GnomAD.

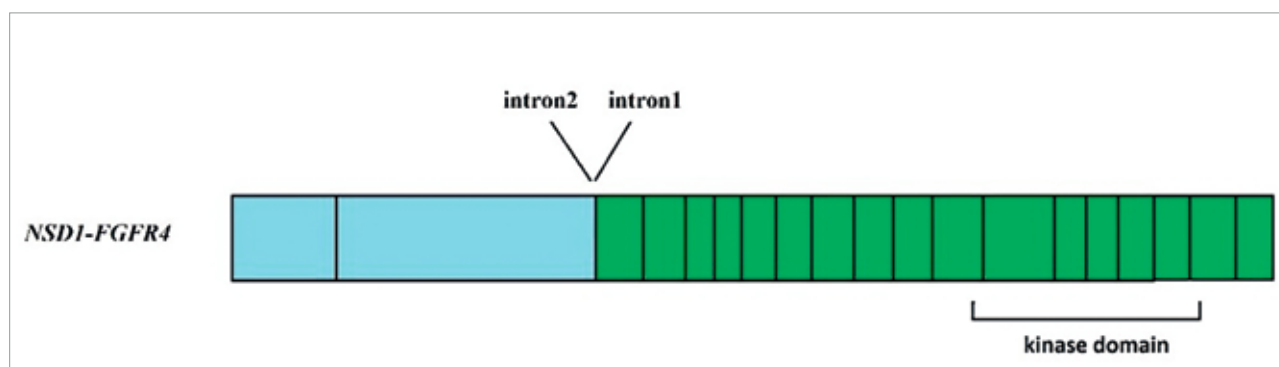
В результате проведенного анализа нами были обнаружены полиморфизмы в таких генах, как *TP53*, *KIT* и *ALK*, которые имеют высокую частоту встречаемости в популяции и не являются патогенными. Также было зафиксировано увеличение числа копий гена *KRAS*, минимально превышающее значение единицы. Диагностически значимые транслокации *PAX3-FOXO1* и *PAX7-FOXO1* отсутствовали, но была обнаружена ранее не описанная транслокация *NSD1-FGFR4*. Для контроля найденных вариантов в опухолевой ткани пациентки был проанализирован образец здоровой ткани (периферическая кровь). Транслокация *NSD1-FGFR4* в здоровой ткани пациентки не была обнаружена. Схематичная визуализация транскрипта *NSD1-FGFR4* представлена на рисунке 3.

Для оценки значимости обнаруженной нами транслокации были проанализированы актуальные данные литературы. Нам не удалось найти ни одной публикации, в которой бы указывалось наличие транскрипта *NSD1-FGFR4* в ткани альвеолярной РМС. Однако данный транскрипт был описан в ткани немелкоклеточного рака легкого [4].

Существует большое количество данных, касающихся участия в патогенезе РМС генов *NSD1* и *FGFR4*. Как известно, одной из характерных особенностей

Рисунок 3
Схематичная визуализация транскрипта *NSD1-FGFR4*

Figure 3
A schematic representation of the *NSD1-FGFR4* transcript



альвеолярной РМС является повышенный уровень экспрессии гена *FGFR4* – мембранного белка, рецептора из семейства факторов роста фибробластов [5]. Согласно данным последних статей, посвященных изучению молекулярного профиля РМС, увеличение экспрессии гена *FGFR4* связано непосредственно со стимулирующим влиянием транслокации *PAX3-FOXO1* или *PAX7-FOXO1* или с наличием амплификации гена *FGFR4* [6, 7]. Анализ данных полноэкзомного секвенирования также показал достаточно высокую частоту встречаемости точечных мутаций гена *FGFR4* [6]. Активирующие мутации в гене *FGFR4* встречаются примерно в 7,5% случаев альвеолярных РМС. Чаще всего значимые мутации находятся в позициях 535 и 550 киназного домена. Согласно данным исследования M. Seki и соавт., эти мутации ассоциированы с более агрессивным течением заболевания и более высокой частотой метастазирования [6]. Экспериментальные исследования также подтверждают значимость генетических нарушений для поддержания опухолевого клона РМС. В экспериментальном исследовании S.Q. Li и соавт. показано, что трансдукция *TEL-FGFR4* позволяет получить культуру клеток РМС. Необходимо отметить большое значение генетических альтераций гена *FGFR4* для лечения РМС, рецептор тирозинкиназы может быть использован в качестве мишени для таргетной терапии [6].

Ген *NSD1* кодирует белки гистоновых метилтрансфераз млекопитающих, участвующих в регуляции транскрипции. Транслокации *NSD1* описаны у пациентов с острым миелобластным лейкозом [8], гепатоцеллюлярным раком, раком молочной железы [9], а также они могут встречаться при синдромах Сотоса и Беквита-Видемана, для которых характерна предрасположенность к развитию РМС [10]. Также X. Chen и соавт. описали транслокацию с участием данного гена с другим партнером *NSD1-ZNF346* в ткани РМС [7].

Несмотря на то, что транслокация *NSD1-FGFR4* не была описана ранее в ткани РМС, приведенные нами данные литературы свидетельствуют о наличии онкогенного потенциала у генов-партнеров и позволяют предположить, что *NSD1-FGFR4* является патогенной драйверной молекулярной поломкой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенный клинический случай представляет интерес вследствие установления новых генетических нарушений у пациентов детского возраста с РМС и расширения наших представлений о разнообразии молекулярных находок, лежащих в основе развития альвеолярной РМС.

По данным первичного диагностического комплекса пациентке был выставлен диагноз: альвеолярная РМС области верхнелатеральных стенок левой глазницы с интраорбитальным и интракраниальным распространением, местнодеструктурирующим ростом, масс-эффектом на прилежащие отделы головного мозга с поражением верхнеяремного лимфоузла слева. При проведении иммуногистохимического исследования с широким спектром антител в опухолевых клетках определялась экспрессия LIN28a, Desmin, Synaptophysin, WT1, Myogenin, CCNB3 и Olig2. При этом экспрессия Myogenin носила диффузный характер. Экспрессия GFAP, CD99, Vcl2, S100, LCA, EMA, PanCK, Oct4 и HMB45 отсутствовала, а ядерная экспрессия INI1 была сохранена. Для получения NGS-данных применяли секвенирование таргетной панели онкогенов в образцах биопсийного материала РМС с применением набора реагентов TruSight Tumor 170 (Illumina, США). В результате проведенного анализа полученных данных нами была обнаружена ранее не описанная транслокация *NSD1-FGFR4*. Несмотря на то, что транслокация *NSD1-FGFR4* редкая и не была описана ранее в ткани РМС, приведенные нами данные литературы свиде-

тельствуют о наличии онкогенного потенциала у генов-партнеров и позволяют предположить, что *NSD1-FGFR4* является патогенной драйверной молекулярной поломкой.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Михалевская Т.М. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7134-8923>

Белевцев М.В. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7134-8923>

Киселев Д.П. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2071-8143>

Литература

1. Qualman S., Lynch J., Bridge J., Parham D., Teot L., Meyer W., Pappo A. Prevalence and clinical impact of anaplasia in childhood rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *Cancer* 2008; 113 (11): 3242–7.
2. Arnold M.A., Anderson J.R., Gastier-Foster J.M., Barr F.G., Skapek S.X., Hawkins D.S., et al. Histology, Fusion Status, and Outcome in Alveolar Rhabdomyosarcoma With Low-Risk Clinical Features: A Report From the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2016; 63 (4): 634–9.
3. Parham D.M., Qualman S.J., Teot L., Barr F.G., Morotti R., Sorensen P.H.B., et al. Correlation between histology and PAX/FKHR fusion status in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Am J Surg Pathol* 2007; 31 (6): 895–901.
4. Qin A., Johnson A., Ross J., Miller V.A., Ali S.M., Schrock A.B., Gadgeel S.M. Detection of known and novel FGFR fusions in non-small cell lung cancer by comprehensive genomic profiling. *J Thorac Oncol* 2018; 14 (1): 54–62.
5. Seki M., Nishimura R., Yoshida K., Shimamura T., Shiraishi Y., Sato Y., et al. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nat Commun* 2015; 6: 7557.
6. Li S.Q., Cheuk A.T., Shern J.F., Song Y.K., Hurd L., Liao H., et al. Targeting Wild-Type and Mutationally Activated FGFR4 in Rhabdomyosarcoma with the Inhibitor Ponatinib. *PLoS One* 2013; 8 (10): e76551.
7. Chen X., Stewart E., Shelat A., Qu C., Bahrami A., Hatley M., et al. Targeting Oxidative Stress in Embryonal Rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* 2013; 24 (6): 710–24.
8. Wang G.G., Cai L., Pasillas M.P., Kamps M.P. NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 804–12.
9. Zhao Q., Caballero O.L., Levy S., Stevenson B.J., Iseli C., de Souza S.J., et al. Transcriptome-guided characterization of genomic rearrangements in a breast cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 1886–91.
10. Baujat G., Rio M., Rossignol S., Sanlaville D., Lyonnet S., Le Merrer M., et al. Paradoxical NSD1 Mutations in Beckwith-Wiedemann Syndrome and 11p15 Anomalies in Sotos Syndrome. *Am J Hum Genet* 2004; 74 (4): 715–20.