

© 2022 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 07.11.2022
Принята к печати 23.11.2022

DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-4-18-30

Сравнительный анализ генетического профиля нейробластомы в дебюте, рецидиве или прогрессии заболевания и определение прогностической роли генетических изменений

Н.А. Андреева¹, Т.В. Шаманская¹, Н.В. Гегелия¹, Р.Х. Абасов¹, Н.Ю. Усман¹,
Д.Ю. Качанов¹, А.Е. Друй^{1, 2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург

Контактная информация:

Андреева Наталья Александровна,
врач-детский онколог отделения
клинической онкологии, научный
сотрудник лаборатории молекулярной
онкологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: nataliya.andreeva@fccho-moscow.ru

Нейробластома (НБ) – самая частая экстракраниальная солидная эмбриональная опухоль у детей, способная к самостоятельной регрессии или, напротив, крайне агрессивному течению. Наличие клинической гетерогенности способствует неустранимому интересу к изучению молекулярно-генетических особенностей НБ, способных объяснить разное поведение опухоли и потенциальное использование этих данных для индивидуализации противоопухолевого лечения. К настоящему времени по данным многочисленных исследований определена неблагоприятная прогностическая роль активации путей p53 и RAS-MAPK, а также феномена поддержания длины теломер. Показано, что параллельно с повышением мутационной нагрузки в рецидиве заболевания происходит редукция субклональной гетерогенности, что характеризует различный генетический профиль в дебюте заболевания и при развитии неблагоприятного события. Таким образом, целью данной работы явился анализ изменений генетического профиля НБ во временном интервале от первичной верификации диагноза до рецидива или прогрессии заболевания и анализ прогностической значимости данных изменений. В ретроспективно-проспективное исследование были включены 46 пациентов с морфологически верифицированной периферической нейrogenной опухолью, получавших лечение или отдельные его этапы в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева за период с июля 2013 г. по декабрь 2021 г. согласно модифицированному протоколу NB-2004. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Группа наблюдения была представлена 25 пациентами, промежуточного риска – 1, высокого риска – 20. Основным критерием включения в исследование было наличие ткани опухоли, пригодной для исследования, полученной как в дебюте заболевания, так и в рецидиве/прогрессии. В исследовании использованы методы мультиплексной лигазной реакции (MLPA) для оценки сегментарных и количественных хромосомных aberrаций, секвенирования нового поколения (NGS) для анализа нуклеотидных вариантов, полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией для оценки уровня экспрессии гена *TERT*. Статистический анализ проводился по состоянию на 01.04.2022. В исследованной когорте подтвержден прогностический вклад амплификации *MYCN* ($p < 0,001$) при выявлении в дебюте заболевания или при развитии прогрессии, а также делеции *1p* ($p = 0,01$) при выявлении в первичной опухоли. Показано влияние уровня экспрессии *TERT*, измеренной в первичной опухоли, на клиническое течение заболевания у пациентов групп промежуточного риска и наблюдения: группа с локальным рецидивом/прогрессией ($n = 3$; -5 (от $-10,5$ до $-3,5$)), системным рецидивом ($n = 3$; -2 (от $-2,5$ до -1)) и отсутствием второго неблагоприятного события ($n = 20$; -7 (от -9 до $-5,5$)), $p = 0,037$. При сравнении мутационного профиля опухоли в дебюте заболевания и при развитии рецидива было отмечено, что он крайне нестабилен и подвержен значительным вариациям: у 38,5% (10/26) пациентов в парных образцах не было выявлено клинически значимых генетических вариантов в анализируемом геномном регионе интереса, в 19,2% (5/26) случаев в ткани первичной опухоли и в рецидиве обнаруживались идентичные онкогенные варианты с изменением фракции альтернативного аллеля (2/5), утратой одного из выявленных вариантов в первичной опухоли (1/5), приобретением дополнительных мутаций в рецидиве (2/5), у 19,2% (5/26) пациентов в ткани рецидивной опухоли не определялись выявленные в первичной опухоли онкогенные генетические варианты, у 7,7% (2/26) больных были обнаружены утрата онкогенного генетического варианта, выявленного в дебюте заболевания, и появление новых клинически значимых вариантов, в 15,4% (4/26) случаев отмечено появление новых мутаций в ткани опухоли. Варианты, приводящие к активации сигнального пути RAS-MAPK и блокированию пути p53 в первичной опухоли выявлены у 31% (9/29) пациентов и 20,7% (6/29) больных соответственно, в рецидиве/прогрессии – 29% (9/31) и 6,5% (2/31) соответственно. Стратификация на группы риска, учитывающая только цитогенетические aberrации, не может объяснить все случаи агрессивного течения опухоли. Дополнительные подходы молекулярно-генетического исследования с использованием методов MLPA, NGS, оценки экспрессии *TERT* дают более широкое представление о биологии опухоли и степени ее агрессивности. Прогностически значимые факторы, как правило, обнаруживаются в первичной опухоли, однако НБ – это новообразование, характеризующееся крайне

высокой внутриопухолевой гетерогенностью. Факт приобретения или потери прогностически значимых молекулярно-генетических факторов позволяет опираться на них при определении долгосрочного прогноза и выбора мишеней для таргетной терапии.

Ключевые слова: нейробластома, дети, секвенирование нового поколения, мультиплексная лигазная цепная реакция, TERT, парные образцы, рецидив, прогрессия

Андреева Н.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2022; 21 (4): 18–30. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-4-18-30

Comparative genetic profiling of neuroblastoma at the onset vs recurrence or progression of the tumor and determination of the prognostic role of genetic alterations

N.A. Andreeva¹, T.V. Shamanskaya¹, N.V. Gegelia¹, R.Kh. Abasov¹, N.Yu. Usman¹, D.Yu. Kachanov¹, A.E. Druy^{1,2}

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Research Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg

Neuroblastoma (NB) is the most prevalent extracranial solid embryonal tumor in children, capable of both spontaneous regression and extremely aggressive course. The clinical heterogeneity of NB feeds the continual interest in its molecular genetic profiles as a potential key to the variable tumor behaviors and treatment personalization. To date, a number of studies indicate unfavorable prognostic roles of p53 and RAS–MAPK pathway activation, as well as that of telomere maintenance mechanisms. The increase in mutational load observed in recurrent NB has been shown to reduce the degree of subclonal heterogeneity, leading to pronounced distinction between genetic profiles of the tumor as recorded at primary and recurrent manifestations. This study aimed to analyze the alterations in genetic profiles of NB over time from the initial verification of the diagnosis till a disease-related adverse event (relapse or progression), as well as the potential prognostic significance of such alterations. The retrospective-prospective study enrolled 46 patients with morphologically verified peripheral neurogenic tumors, receiving treatment entirely or partially at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology from July 2013 till December 2021 in accordance with the modified NB-2004 protocol. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. The cohort included an observation group of 25 patients, 1 intermediate-risk case and 20 high-risk cases. The main inclusion criterion concerned the availability of tumor tissue suitable for molecular examination, obtained both at the onset of the disease and at relapse/progression. We used the multiplex ligation-dependent probe amplification assay (MLPA) for the assessment of segmental and copy number chromosome aberrations, next-generation sequencing (NGS) to identify nucleotide variants, and reverse transcription polymerase chain reaction to assess the TERT gene expression levels. The statistical analysis used data available by April 01, 2022. In the studied cohort, the analysis confirmed prognostic contribution of MYCN amplifications ($p < 0.001$) detected at the onset of the disease or at its progression, as well as of 1p deletions ($p = 0.01$) detected in primary tumors. The expression of TERT in primary NBs was shown to correlate with the clinical course of the disease in the intermediate-risk and observation group, including local recurrence/progression ($n = 3$; -5 ($-10.5...-3.5$)), systemic relapses ($n = 3$; -2 ($-2.5...-1$)) and the lack of second adverse event ($n = 20$; -7 ($-9...-5.5$)), $p = 0.037$. Pairwise comparison of mutational profiles at the onset of the disease and at relapse revealed extreme degree of instability and significant variations: 38.5% (10/26) of the patients had no clinically significant genetic variants in the analyzed genomic region of interest in paired samples, 19.2% (5/26) of the patients had identical oncogenic variants in primary and relapsed tumor tissues, albeit with altered variant allele fraction (2/5), loss of one of the variants identified in the primary tumor (1/5), or acquisition of additional mutations upon recurrence (2/5), in 19.2% (5/26) of the patients, oncogenic genetic variants detected in primary NB were subsequently lost, in 7.7% (2/26) of patients, a loss of an oncogenic genetic variant identified at the onset of the disease was accompanied by the emergence of new clinically significant variants, and 15.4% (4/26) of the patients presented with new mutations in relapsed tumor tissue. Genetic variants leading to RAS–MAPK pathway activation and p53 pathway inhibition in primary tumors were identified in 31% (9/29) and 20.7% (6/29) of primary tumors and 29% (9/31) and 6.5% (2/31) of relapsed tumors, respectively. Risk group stratification based solely on cytogenetic aberrations fails to account for all cases of aggressive course of NB. Advanced molecular genetic approaches including MLPA and NGS, as well as the TERT mRNA quantitation, provide expanded characterization of the tumor biology and aggressiveness. Although prognostic markers are typically found in primary tumors, for NB, the use of such markers can be hampered by extremely high intratumoral heterogeneity. The data on acquisition or loss of prognostically significant molecular genetic markers in the course of the disease is useful for long-term prognosis and selection of targets for specific therapies.

Key words: neuroblastoma, children, next-generation sequencing, multiplex ligation-dependent probe amplification assay, TERT, paired samples, relapse, progression

Andreeva N.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2022; 21 (4): 18–30.
DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-4-18-30

Нейробластома (НБ) – самая частая экстракраниальная солидная эмбриональная опухоль у детей [1], обладающая выраженной клинической и биологической гетерогенностью [2]. Клиническая гетерогенность НБ заключается в разнообразии манифестации новообразования: от опухолей, способных к самостоятельной регрессии до крайне агрессивных форм заболевания, характеризующихся развитием рецидивов и прогрессии в значительной доле случаев [3]. Как правило, лечение рецидива/прогрессии НБ осложняется развитием химиорезистентности опухоли, что ограничивает возможности лекарственной терапии [4]. Разнообразие клинического течения и идентификация неблагоприятных

форм заболевания способствуют неугасаемому интересу к изучению молекулярно-генетических особенностей НБ, способных объяснить дивергентное поведение опухоли, а также внедрению этих данных для индивидуализации противоопухолевого лечения.

НБ, как и другие типичные детские новообразования, характеризуется низким количеством соматических мутаций в геноме опухолевой клетки [5]. Закономерно мутационная нагрузка увеличивается в рецидиве заболевания, что является проявлением нарастающей генетической нестабильности клеток НБ и сопровождается появлением новых генетических вариантов [6]. Однако показано, что параллельно с повышением мутационной нагрузки происходит

© 2022 by «D. Rogachev NMRCPhOI»

Received 07.11.2022

Accepted 23.11.2022

Correspondence:

Natalia A. Andreeva, a pediatric oncologist of the Department of Clinical Oncology, a researcher of the Laboratory of Molecular Oncology at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation Address: 1 Samoy Mashela St., Moscow 117997, Russia E-mail: nataliya.andreeva@fccho-moscow.ru

редукция субклональной гетерогенности [6]. Увеличение мутационной нагрузки и приобретение химио-резистентности опухоли характеризуют различный генетический профиль в дебюте заболевания и при развитии рецидива или прогрессии. Учитывая тот факт, что биопсия НБ при развитии рецидива не является стандартной практикой, количество исследовательских работ, посвященных сравнению мутационного профиля первичной и рецидивной НБ, ограничено.

В 2010 г. было изучено влияние aberrаций ключевого опухолевого супрессора *TP53* при НБ. В исследование был включен 41 пациент, у 38 из них были доступны парные опухоли, полученные на различных стадиях терапии. В 49% (20/41) случаев были выявлены значимые варианты в генах, кодирующих компоненты пути *p53*, а в 15% (6/41) – миссенс-мутации *TP53*, что указывает на обогащение неблагоприятных опухолей мутациями в компонентах пути *p53* и доказывает их прогностическую роль [7].

В 2015 г. T.E. Eleveld и соавт. опубликовали результаты анализа 23 парных образцов НБ различных групп риска. В 18 из 23 образцов авторы обнаружили активацию пути *RAS-MAPK*, что характеризовало данное событие как один из неблагоприятных факторов развития рецидива. Семь из 18 событий в пути *RAS-MAPK* были выявлены только в рецидиве заболевания, что подчеркивает прогностическую, и в то же время возможную патогенетическую значимость активации данного пути в развитии НБ [8].

Одновременно с неблагоприятным прогностическим значением мутаций в компонентах путей *RAS-MAPK* и *p53* S. Ackerman и соавт. обсуждали роль влияния феномена поддержания длины теломера на прогноз при НБ и определили крайне неблагоприятную роль сочетания данных генетических событий. Полученные результаты позволяют выделять пациентов с НБ группы ультравысокого риска и использовать у них наиболее интенсивную или экспериментальную терапию в первой линии [9].

В целом рецидив/прогрессия НБ характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом, учитывая ограниченные возможности химиотерапии второй и последующих линий. Развитие неблагоприятных событий у пациентов группы высокого риска приводит к наихудшим показателям выживаемости, чем в группах больных промежуточного риска и наблюдения [10]. Изучение изменений генетического профиля НБ при развитии рецидива/прогрессии заболевания может быть полезно для прогнозирования исхода после наступления неблагоприятного события (анализ вторичной бессобытийной выживаемости (БСВ)), а также поиска мишеней для молекулярно-направленной терапии рецидивной опухоли в условиях ограниченной эффективности стандартной химиотерапии второй и последующих линий.

Цель данной работы – провести анализ изменений генетического профиля НБ во временном интервале от первичной верификации диагноза до рецидива или прогрессии заболевания и анализ прогностической значимости данных изменений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ретроспективно-проспективное исследование за период с июля 2013 г. по декабрь 2021 г. были включены 46 пациентов с морфологически верифицированной периферической нейрогенной опухолью, получавших лечение или отдельные его этапы в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева согласно модифицированному протоколу NB-2004. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Основным критерием включения в исследование было наличие ткани опухоли, пригодной для исследования, полученной как в дебюте заболевания, так и в рецидиве/прогрессии.

Всем пациентам гистологически был верифицирован диагноз злокачественной нейрогенной опухоли: 45 (97,8%) – НБ, 1 (2,2%) – ганглионейробластома. Соотношение мальчики:девочки составило 1,2:1, медиана возраста на момент постановки диагноза – 18 (разброс 0–113) месяцев. Среди проанализированных случаев преобладали пациенты с 4-й стадией заболевания по системе INSS – 19 (41,3%). Остальным больным установлены стадии 4S – 5 (10,9%), 3-я – 9 (19,6%), 2-я – 11 (23,9%), 1-я – 2 (4,3%). Большая часть пациентов были отнесены в группу наблюдения – 25 (54,3%). Группа промежуточного риска была представлена 1 (2,2%) больным, высокого – 20 (43,5%). Амплификация гена *MYCN* методом FISH была обнаружена у 15 (32,6%) пациентов, не выявлена у 31 (67,4%). Делеция или хромосомный дисбаланс локуса *1p36* методом FISH выявлены у 12 (26,1%) пациентов, не выявлены у 33 (71,7%). У 1 (2,2%) больного статус *1p* не установлен.

У всех проанализированных пациентов наблюдалось развитие неблагоприятного события: рецидив в 11 (23,9%) и прогрессия в 35 (76,1%) случаях. Локальная прогрессия/рецидив заболевания наблюдалась у 27/46 (58,7%) пациентов, системная (метастатическая или комбинированная) – у 18/46 (39,1%), у 1 больного характер первого события неизвестен.

Развитие второго неблагоприятного события наблюдалось у 23/46 (50%) пациентов, из них локальный характер прогрессии/рецидива заболевания отмечен у 3/46 (6,5%), системный – у 10/46 (21,7%), летальный исход ввиду основного заболевания зафиксирован в 10/46 (21,7%) случаях. У всех пациентов, у которых констатировано второе событие в виде локального рецидива/прогрессии, инициально

была диагностирована локализованная опухоль (рисунок 1).

На момент проведения анализа из 46 пациентов 30 (65%) живы, у 16 (35%) зафиксирован летальный исход. Во всех случаях причиной смерти являлось основное заболевание, при этом летальный исход рассматривался как второе событие у 10 пациентов и как исход второго события у 6.

Метод мультиплексной лигазной цепной реакции

Сегментарные и количественные хромосомные aberrации в ткани опухоли выявлялись с помощью технологии мультиплексной лигазной цепной реакции (MLPA) с использованием наборов SALSA P251, P252, P253, содержащих олигонуклеотидные зонды, специфичные к различным регионам 1–4, 7, 9, 11, 12, 14, 17-й хромосом. Для детекции результатов применялся капиллярный электрофорез с помощью генетического анализатора SeqStudio (Thermo Fischer Scientific, США). Обработка и анализ полученных результатов проводились с использованием программы Coffalyser (MRC-Holland, Нидерланды). Интерпретация результатов осуществлялась в соответствии с критериями Европейской группы по исследованию НБ SIOPEN [11]. Данные MLPA дополнялись результатами исследования FISH при анализе статуса *MYCN* и короткого плеча 1-й хромосомы, учитывая специфичность и чувствительность методов.

Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

Уровень экспрессии *TERT* оценивался при помощи количественной обратной транскриптазной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Для получения комплементарной ДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора MINT (Евроген, Россия) со случайным гексануклеотидным праймером. В качестве референсного использовали ген *ACTB*, нормализованный уровень экспрессии *TERT* рассчитывали по формуле:

$$Cq_{TERT} - Cq_{ACTB}$$

где Cq – это значение порогового цикла соответствующей ПЦР. Результат представлен в виде величины нормализованной экспрессии *TERT* и границ межквартильных 25-го и 75-го интервалов. Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентных зондов, использованных для проведения ПЦР с обратной транскрипцией, представлены в таблице 1.

Метод высокопроизводительного секвенирования

В целях обнаружения нуклеотидных замен, а также небольших инсерций и делеций был применен метод целевого высокопроизводительного секвенирования (NGS) с использованием кастомизированной панели QIASeq (Qiagen, Германия), включающей

56 генов (*ATM, ALK, APC, ATRX, BRAF, BCOR, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, CDKN2B, CIC, CREBBP, CTNNB1, DICER1, DROSHA, EGFR, FBXW7, FGFR1, H3F3A, HISTH3B, HRAS, IDH1, IDH2, KDR, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MYOD1, MET, MSH6, MSH2, MLH1, NF1, NOTCH1, NRAS, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, POLD, POLE, PTCH1, PTEN, PTPN11, RB1, ROS1, RET, SMARCA4, SMARCB1, SUFU, SMO, TSC1, TERT, TP53, TSC2, WT1*), генетические варианты в которых значимы в этиопатогенезе детских солидных опухолей. Секвенирование проводилось путем парно-концевого прочтения на приборе MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq sequencing kit v.2 300x (Illumina, США) со средней глубиной прочтения региона интереса более 500x. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы специализированные базы данных соматических (VarSome, COSMIC, OncoKB) и герминальных (VarSome, HGMD, OMIM) мутаций, а также литературные данные.

Статистический анализ

Для оценки различий между независимыми выборками по количественным и качественным признакам использовались критерии Крускала–Уоллиса и χ^2 с поправкой Йетса соответственно. Оценка выживаемости пациентов осуществлялась с помощью метода Каплана–Мейера, достоверность различий в уровнях выживаемости между группами анализировалась с использованием критерия log-rank. Оценка выживаемости проводилась по состоянию на 01.04.2022. Медиана наблюдения за пациентами составила 46 (разброс 1–105) месяцев.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

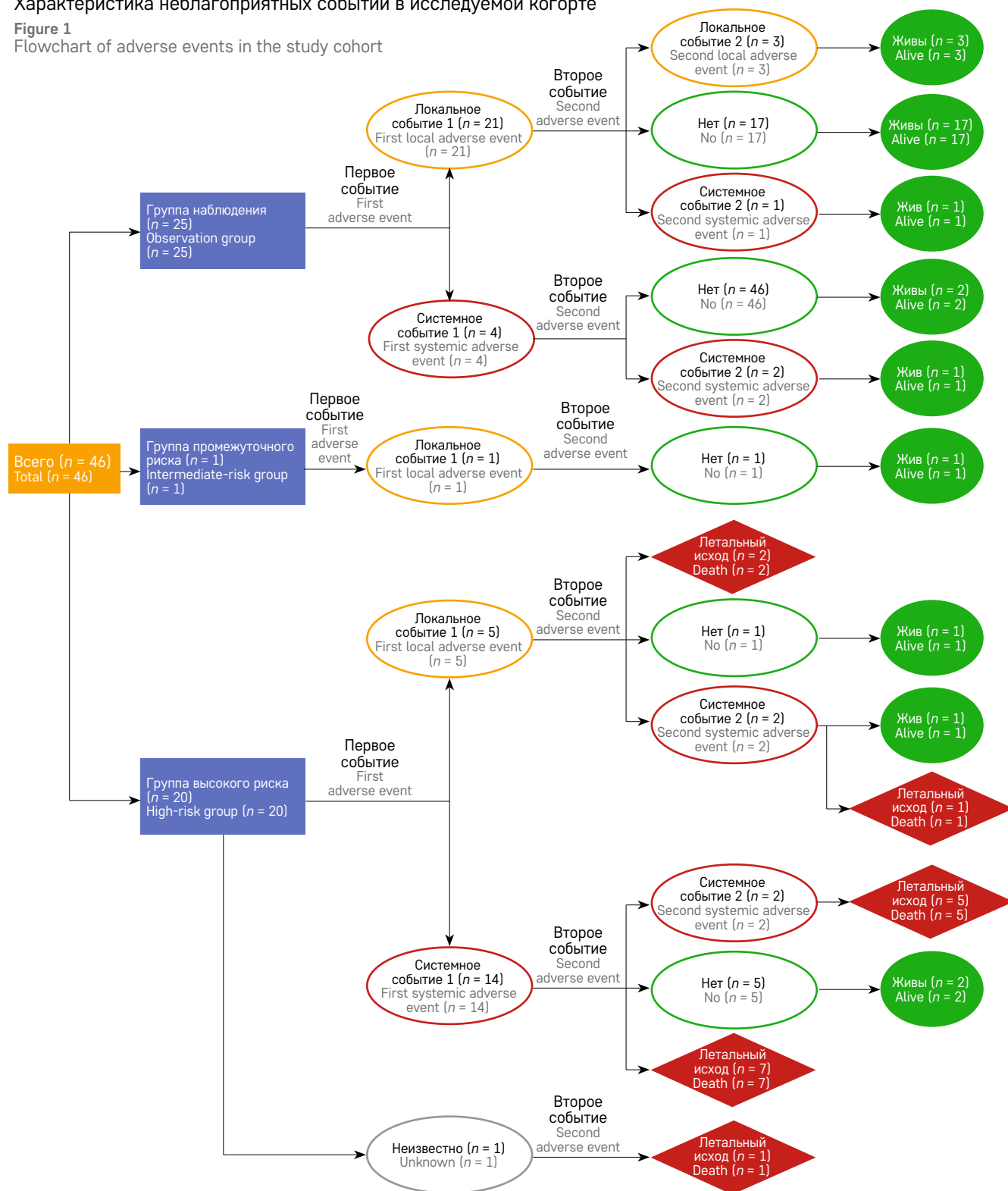
В исследуемой группе пациентов общая выживаемость (ОВ) значительно зависела от группы риска (рисунок 2), определенной в соответствии с критериями протокола NB-2004, являясь наименьшей у больных, отнесенных к группе высокого риска (3-летняя ОВ 30% (15,4–58,6%), где и наблюдались все случаи летального исхода. Во всех остальных случаях ОВ была 100%. Так как у всех пациентов в данной когорте наблюдалось развитие хотя бы одного неблагоприятного события, рассчитывалась вторичная БСВ, которая определялась как время от первого события до развития второго события (прогрессия/рецидив/смерть) или до даты последнего наблюдения. Вторичная БСВ также статистически значимо отличалась в зависимости от группы риска ($p < 0,001$), являясь наиболее неблагоприятной у пациентов группы высокого риска (3-летняя вторичная БСВ 17,5% (95% доверительный интервал (ДИ) 6,4–47,5)). Группа промежуточного риска представлена одним пациентом, выжившим после

Рисунок 1

Характеристика неблагоприятных событий в исследуемой когорте

Figure 1

Flowchart of adverse events in the study cohort



события. Для группы наблюдения 3-летняя вторичная БСВ составила 79,5% (95% ДИ 64,9–97,3).

Сравнение статуса сегментарных хромосомных aberrаций

При проведении анализа сегментарных нарушений в ткани первичной опухоли (n = 44) и ткани,

полученной при рецидиве или прогрессии заболевания (n = 45), наиболее часто выявлялись следующие воспроизводящиеся aberrации:

– делеция 1p различной протяженности (1p13.3–1p36.33) в 14/44 (31,8%) случаях в первичной опухоли и в 17/45 (37,8%) случаях в рецидиве;

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентных зондов, использованных для количественного определения экспрессии генов *TERT* и *ACTB*

Table 1

Nucleotide sequences of primers and probes used in RT-PCR for *TERT* and *ACTB* expression quantification

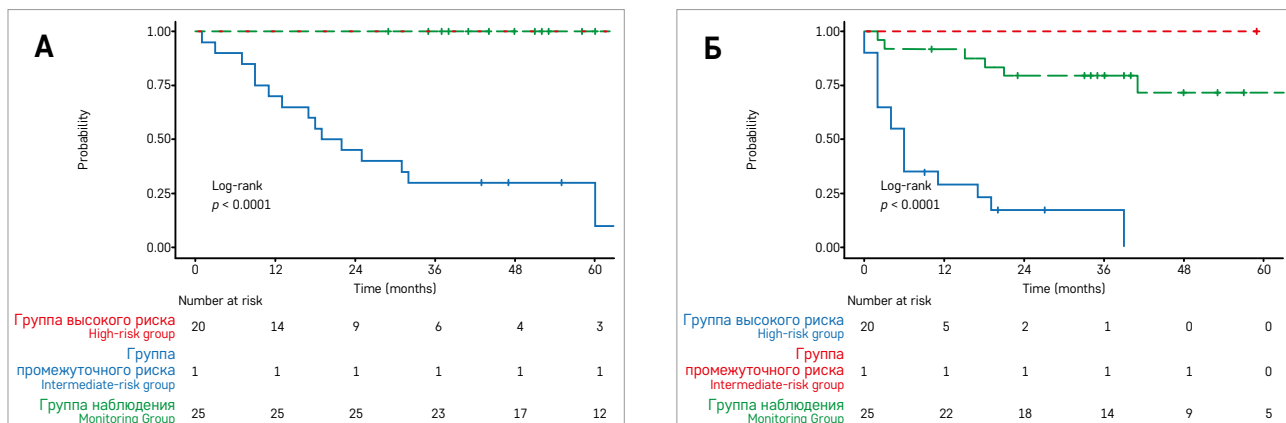
Ген, транскрипт Gene, transcript	Наименование олигонуклеотида Oligonucleotide name	Нуклеотидная последовательность 5'–3' Nucleotide sequence 5'–3'
<i>TERT</i> , NM_198253.3	<i>TERT</i> forward primer	ACC-GTC-TGC-GTG-AGG-AGA-TC
	<i>TERT</i> reverse primer	TTG-CTC-CAG-ACA-CTC-TTC-CG
	<i>TERT</i> probe	ROX-tgt-acg-tcg-tcg-agc-tgc-tca-ggt-ctt-t-BHQ2
<i>ACTB</i> , NM_001101.5	<i>ACTB</i> forward primer	CTG-GCA-CCA-CAC-CTT-CTA-CA
	<i>ACTB</i> reverse primer	TAG-CAA-CGT-ACA-TGG-CTG-GG
	<i>ACTB</i> probe	FAM-CAA-GGC-CAA-CCG-CGA-GAA-GAT-GAC-C-BHQ1

Рисунок 2

ОВ (А) и вторичная БСВ (Б) пациентов в зависимости от группы риска

Figure 2

Overall (A) and secondary event-free (Б) survival of patients depending on NB-2004 risk group



- делеция 11q (11q13.2–11q23.3) в 26/44 (59,1%) и 23/45 (51,1%) случаях соответственно;
- делеция 3p (3p12.3–3p25.3) в 10/44 (22,7%) и 6/45 (13,3%) случаях соответственно;
- делеция 9p (9p21.3–9p24.1) в 6/44 (13,6%) и 6/45 (13,3%) случаях соответственно;
- увеличение числа копий 17q (17q11–17q25.3) в 26/44 (59,1%) и 24/45 (53,3%) случаях соответственно;
- амплификация и/или коамплификация *MYCN* с генами регионов 2p23–2p24 в 14/44 (31,8%) и 18/45 (40,0%) случаях соответственно.

Делеция 4p (4p12–4p35.2) встречалась лишь в первичной опухоли в 10/44 (22,7%) случаях. Количественные нарушения (моносомии и трисомии) выявлялись в единичных случаях.

При этом идентичная картина сегментарных и хромосомных aberrаций не наблюдалась ни в одном парном случае, кроме 2 пар, где методом MLPA не были обнаружены несбалансированные хромосомные нарушения.

Амплификация *MYCN* (изолированная или в сочетании с коамплификацией смежных генов) негативно влияла на показатели выживаемости вне зависимости от выявления в первичной опухоли или в рецидиве. Делеция 1p оказывала прогностическое влияние только при обнаружении в дебюте заболевания

(таблица 2). Остальные сегментарные и хромосомные aberrации не влияли на риск развития неблагоприятного события. Описанные в литературе прогностические маркеры – увеличение числа копий 17q ($n = 26$) и делеция 11q ($n = 26$) также не повышали риск наступления неблагоприятного события в настоящем исследовании.

При проведении сравнительного анализа сегментарных aberrаций в дебюте заболевания и в рецидиве/прогрессии выявлено 67 случаев приобретения различных aberrаций и 64 – утраты. Приобретение хромосомных aberrаций наиболее часто происходило в локусе 1p – 10/67 (14,9%), из них в 9 (13,4%) случаях появление делеции 1p; в локусе 2p – 13/67 (19,4%), из них в 4 (6%) случаях появление амплификации *MYCN*; в локусе 11q – 10/67 (14,9%). Утрата хромосомных дефектов наиболее часто затрагивала локус 1p – 7/64 (10,9%), из них делеция 1p утрачивалась в 6 (9,4%) случаях; локус 2p – 6/64 (9,4%); локус 11q – 6/64 (9,4%); локус 3p – 8/64 (12,5%); локус 17q – 7/64 (10,9%); локус 4p – 9/64 (14,1%). Амплификация *MYCN* не была утеряна ни в одном случае. Количественные aberrации также могли как приобретаться в рецидивном материале – 8/67 (11,9%), так и утрачиваться – 6/64 (10%). У 1 пациента произошли одновременные приобретение и утрата сразу нескольких прогностически значимых цитогенети-

ческих факторов. Происходящие изменения в ткани опухоли в анализируемой когорте не оказывали статистически значимого влияния на риск развития второго неблагоприятного события и/или летального исхода (таблица 3).

Сравнение величины экспрессии гена *TERT*

Уровень экспрессии *TERT* в ткани первичной опухоли и при развитии рецидива/прогрессии определен у 43 пациентов. Для проведения сравнительного анализа уровня экспрессии *TERT* в дебюте заболевания и при развитии рецидива/прогрессии было доступно 40 парных образцов ввиду различного качества полученных нуклеиновых кислот.

При сравнении уровня экспрессии *TERT* в первичной опухоли (TERT1) и в рецидиве (TERT2) статистически значимой разницы выявлено не было ($p = 0,494$). Медиана TERT1 составила $-5,5$ (от $-7,3$ до $-3,0$), медиана TERT2 – $-6,0$ (от $-8,0$ до $-3,0$). Статистически значимая разница в уровне экспрессии гена *TERT* в различные временные точки (TERT1 и TERT2) была отмечена между паци-

ентами группы высокого риска и больными групп промежуточного риска и наблюдения: TERT1 $-5,0$ (от $-6,0$ до $2,0$), $n = 17$ и $-7,0$ (от $-9,0$ до $-3,0$), $n = 26$ соответственно, $p = 0,022$. Уровень TERT2 также отличался между группами, $-5,0$ (от $-7,0$ до $-3,0$), $n = 19$ и $-6,5$ (от $-9,25$ до $-3,0$), $n = 24$ соответственно, однако статистической разницы выявлено не было ($p = 0,075$).

Учитывая данные о прямой активации экспрессии *TERT* при наличии амплификации *MYCN*, мы измерили экспрессию *TERT* в образцах опухолей с различным статусом гена *MYCN*. В ткани первичной опухоли зафиксирована статистически значимая разница уровня экспрессии *TERT* между группами пациентов, имеющих амплификацию *MYCN*: $-5,0$ (от $-6,0$ до $-1,0$), $n = 13$, и не имеющих ее: $-6,5$ (от $-8,75$ до -4), $n = 30$, $p = 0,023$.

Не было установлено зависимости между уровнем экспрессии *TERT* в материале первичной опухоли (TERT1) и характером первого события (системное или локальное прогрессирование опухоли), а также риском последующих неблагоприятных событий. Однако у пациентов, не относящихся к группе

Таблица 2

Риск развития летального исхода и второго неблагоприятного события в зависимости от наличия амплификации *MYCN* и делеции 1p

Table 2

Risk of death or second adverse event depending on *MYCN* amplification and 1p deletion

Ткань Tissue	Фактор Factor	Число, n (%) Number, n (%)	ОВ, ОО (95% ДИ), величина p OS, HR (95% CI), p -value	Вторичная БСВ, ОО (95% ДИ), величина p Secondary EFS, HR (95% CI), p -value
Первичная опухоль Primary tumor	Делеция 1p 1p deletion	14 (31,8)	3,92 (1,39–11,05), $p = 0,01^*$	2,93 (1,26–6,82), $p = 0,013^*$
	MNA	14 (31,8)	13,49 (4,2–43,37), $p < 0,001^*$	8,27 (3,17–21,59), $p < 0,001^*$
	Делеция 11q 11q deletion	26 (59,1)	1,01 (0,36–2,80), $p = 0,985$	0,85 (0,36–1,98), $p = 0,705$
	Увеличение числа копий 17q Gain 17q	26 (59,1)	1,9 (0,61–5,89), $p = 0,269$	1,36 (0,56–3,3), $p = 0,502$
Опухоль в рецидиве Relapsed tumor	Делеция 1p 1p deletion	17 (37,8)	1,51 (0,56–4,10), $p = 0,414$	1,34 (0,58–3,06), $p = 0,491$
	MNA	18 (40,0)	36,08 (4,68–278,26), $p = 0,001^*$	12,88 (4,18–39,66), $p < 0,001^*$
	Делеция 11q 11q deletion	23 (51,1)	0,87 (0,32–2,31), $p = 0,775$	0,76 (0,34–1,73), $p = 0,513$
	Увеличение числа копий 17q Gain 17q	24 (53,3)	0,98 (0,36–2,62), $p = 0,960$	1,30 (0,55–3,11), $p = 0,552$

Примечание. Здесь и в таблице 3: ОО – отношение опасностей; MNA – амплификация *MYCN*.

Note. Here and in table 3: OS – overall survival; EFS – event-free survival; HR – hazard ratio; CI – confidence interval; MNA – *MYCN* amplification.

Таблица 3

Определение рисков развития летального исхода и второго неблагоприятного события в зависимости от приобретения или утраты сегментарных хромосомных нарушений

Table 3

Risk of death or second adverse event depending on acquisition or loss of segmental chromosomal aberrations

Молекулярное событие, Molecular event	n	ОВ, ОО (95% ДИ) OS, HR (95% CI)	Вторичная БСВ, ОО (95% ДИ) Secondary EFS, HR (95% CI)
Приобретение делеции 1p 1p deletion acquisition	9	0,6 (0,14–2,66), $p = 0,502$	0,81 (0,27–2,38), $p = 0,696$
Приобретение MNA MNA acquisition	4	1,63 (0,37–7,17), $p = 0,502$	2,29 (0,78–6,76), $p = 0,133$
Приобретение делеции 1p и MNA 1p deletion and MNA acquisition	2	2,26 (0,29–17,35), $p = 0,433$	2,38 (0,55–10,26), $p = 0,245$
Приобретение 1 aberrации, кроме делеции 1p и MNA Acquisition of one aberration, except for 1p deletion and MNA	9	1,68 (0,54–5,23), $p = 0,370$	1,62 (0,64–4,12), $p = 0,309$
Утрата делеции 1p 1p deletion loss	6	2,36 (0,76–7,32), $p = 0,138$	2,62 (0,97–7,12), $p = 0,059$

высокого риска, полученные данные свидетельствуют о более низком уровне TERT1 при локальном характере первого неблагоприятного события (-7 (от -9 до $-4,25$), $n = 22$ против -3 (от -4 до $-2,75$), $n = 4$, $p = 0,102$). При анализе уровня TERT1 в зависимости от наличия второго события и его характера получено статистически значимое различие между группами с локальным рецидивом/прогрессией ($n = 3$, -5 (от $-10,5$ до $-3,5$)), системным ($n = 3$, от -2 ($-2,5$ до -1)) и отсутствием второго неблагоприятного события ($n = 20$, -7 (от -9 до $-5,5$)), $p = 0,037$.

Сравнение статуса нуклеотидных вариантов (мутационного профиля)

Анализ нуклеотидных вариантов методом таргетного NGS проведен 29 пациентам на ткани первичного новообразования и 31 больному на материале опухоли в рецидиве или прогрессии заболевания. Для сравнения были доступны 26 пар.

В таблице 4 представлены все выявленные генетические варианты. У большинства пациентов онкогенных нуклеотидных вариантов при секвенировании выявлено не было: в первичной опухоли у 13/29 (44,8%), в рецидиве у 18/31 (58%). У 16/29 (55,2%) пациентов были обнаружены клинически значимые генетические варианты в 19 различных генах с фракцией альтернативного (мутантного) аллеля (ФАА) от 5 до 43% в первичной опухоли (у 3 больных выявлено по 2 варианта и более). При развитии рецидива у 13/31 (42%) пациентов было обнаружено 19 клинически значимых вариантов с ФАА от 5 до 99% (у 4 пациентов по 2 варианта и более).

При сравнении мутационного профиля опухоли в дебюте заболевания и при развитии рецидива было отмечено, что он крайне нестабилен и подвержен значительным вариациям. У 10/26 (38,5%) пациентов в ткани опухоли в дебюте заболевания и в рецидиве не было выявлено клинически значимых генетических вариантов в анализируемом геномном регионе интереса. Только в 5/26 (19,2%) случаях в ткани первичной опухоли и в рецидиве обнаруживались идентичные онкогенные варианты. В 2 случаях в рецидиве заболевания было отмечено изменение ФАА (*HRAS* p.Q61R с 9 до 5%, *CREBBP* p.Q2235K с 24 до 55%), ранее выявленных в первичной опухоли. В 1 случае при сохранении варианта с неясным клиническим значением в гене *SMARCA4* p.E465K изначально выявленный онкогенный вариант *PBRM1* с.3617-1G>A с ФАА 25% был утрачен в рецидиве НБ. Также у 2 пациентов отмечено появление в рецидиве онкогенных вариантов в *HRAS* p.Q61K и *TP53* p.V158G с ФАА 65% и 99% соответственно.

Примечательно, что у 5 (19,2%) пациентов в ткани рецидивной опухоли не определялись выявленные в первичной опухоли онкогенные генетические вари-

анты. Данные варианты изначально обнаруживались с различной ФАА (от 5 до 43%) и затрагивали различные гены, в том числе значимые в патогенезе НБ: *ATR*X, *NRAS*, *ALK*. В 4 (15,4%) случаях, напротив, отмечено появление новых мутаций в ткани в опухоли, полученной при прогрессии заболевания, с ФАА от 5 до 26%. У 2 больных были обнаружены утрата онкогенного генетического варианта, выявленного в дебюте заболевания, и появление новых клинически значимых вариантов (таблица 4).

В первичной опухоли у 15/29 (57,1%) пациентов были выявлены варианты, приводящие к активации сигнального пути RAS–MAPK (9/29, 31%) и блокированию пути p53 (6/29, 20,7%). Также у 2 (6,9%) пациентов были обнаружены инактивирующие мутации в гене *ATR*X, являющиеся маркером активации альтернативного (*TERT*-независимого) пути поддержания длины теломерных повторов. При прогрессии/рецидиве заболевания генетические варианты в компонентах сигнальных путей RAS–MAPK (9/31, 29%) и p53 (2/31, 6,5%) наблюдались у 10/31 (32,3%) пациентов. Необходимо отметить, что у 1 больного были обнаружены онкогенные варианты, затрагивающие последовательности генов, кодирующих компоненты обоих сигнальных каскадов, у 1 – два онкогенных варианта в пути RAS–MAPK.

Из групп наблюдения и промежуточного риска проанализировано 14 парных образцов, из которых 2 пациента развили системную прогрессию заболевания, 12 – локальный рецидив/прогрессию. У одного больного, развившего системную прогрессию заболевания (пациент №17), отмечено появление в опухоли при прогрессии онкогенных вариантов в генах *SMARCA4* p.Q356* и *NF1* p.G312*. У второго пациента с системной прогрессией заболевания не было выявлено вариантов в ткани опухоли в дебюте заболевания и при прогрессировании (пациент №16).

Пациенты (№№1–3, 5, 19), у которых наблюдалась локальная прогрессия/рецидив заболевания, характеризовались утратой значимых генетических вариантов. У 1 больного (№13) отмечено сохранение онкогенного варианта в гене *HRAS* p.Q61R. У 1 пациента (№11) отмечены утрата варианта в сигнальном пути RAS–MAPK и приобретение варианта в пути p53. Пациент №15, имея в первичной опухоли и при первой локальной прогрессии вариант в гене *ALK*, приобрел мутацию *TP53* p.V158G, и в последующем развил системную прогрессию заболевания.

В группе высокого риска 3/12 пациента развили локальную прогрессию/рецидив, 9/12 – системную прогрессию/рецидив. Из развивших первое неблагоприятное событие локального характера у 2 пациентов (№7 и №12) отмечена утрата вариантов в генах, белки которых являются компонентами путей RAS–MAPK и p53. Однако, несмотря на это, заболевание

Таблица 4
Клиническая и генетическая характеристика пациентов, исследованных с помощью NGS

Table 4
Clinical and genetic features of patients studied by NGS

Паци- ент Pa- tient	Ста- дия INSS stage	Груп- па риска Risk group	MNA	Собы- тие 1 First event	Собы- тие 2 Second event	Первичный материал Primary tumor tissue			Материал в рецидиве/прогрессии Relapsed tumor tissue		
						Ген Gene	Вариант Variant	ФАА, % VAF, %	Ген Gene	Вариант Variant	ФАА, % VAF, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	4S	Obs	-	ЛП LP	-	TP53	c.682C>T;p.R228W	8	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants		
2	3	IR	-	ЛП LP	-	PBRM1	c.3617-1G>A	25	SMARCA4	c.1393G>A;p.E465K	17
3	2	Obs	-	ЛП LP	-	SMARCA4	c.1393G>A;p.E465K	1			
						MSH2	c.366+1G>A	5			
						MLH1	c.142C>T;p.Q48*	7,5			
						TSC1	c.2041+1G>A	8			
						ATM	c.549G+1G>A	11			
4	4	HR	-	КП CP	-	PDGFRA	c.2515_2516insTGA;p.L839_A840insM	9	HRAS	c.97G>A;p.D33N	11
5	3	Obs	-	ЛП LP	-	NRAS	c.181C>A;p.Q61K	35	Нет нуклеотидных вариантов (ГН) No nucleotide variants (GN)		
6	3	Obs	-	ЛП LP	-	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants			Нет нуклеотидных вариантов (ГН) No nucleotide variants (GN)		
7	4	HR	+	ЛП LP	СП SP	ALK	c.3522C>A;p.F1174L	20	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants		
8	4	HR	+	СП SP	CO3 DOD	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants			NF1	c.3796G>T;p.E1266*	26
9	4	HR	+	СП SP	СП SP	CREBBP	c.6703C>A;p.Q2235K	24	CREBBP	c.6703C>A;p.Q2235K	55
10	4	HR	+	СП SP	CO3 DOD	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants			Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants		
11	2	Obs	-	ЛП LP	ЛП LP	ATM	c.3339G>T;p.L1113F	21	ALK	c.3824G>A;p.R1275Q	25
12	4	HR	+	ЛП LP	CO3 DOD	TP53	c.605C>T;p.S202F	17	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants		
13	3	Obs	-	ЛП LP	ЛП LP	HRAS	c.182A>G;p.Q61R	9	HRAS	c.182A>G;p.Q61R	5
14	4	HR	-	КП CP	CO3 DOD	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants			Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants		
15	1	Obs	-	ЛР LR	CP SR	ALK	c.3522C>G;p.F1174L	13	ALK	c.3522C>G;p.F1174L	46
									TP53	c.473T>G;p.V158G	90
16	4S	Obs	-	СП SP	СП SP	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants			Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants		
17	4S	Obs	-	СП SP	СП SP	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants			SMARCA4	c.1066C>T;p.Q356*	5
									NF1	c.934G>T;p.G312*	17

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
18	4	HR	+	СП SP	CO3 DOD	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants			MSH2	c.1510G>A.p.G504S	12
									WT1	c.937C>T.p.Q313*	9
									PtCH1	c.3054G>A.p.W1018*	8
									BCOR	c.2373G>A.p.W791*	5
19	2	Obs	-	ЛР LR	-	ATRX	c.6824G>A.p.W2275*	43	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants		
						SMARCB1	c.1118+1G>A	15			
						MSH6	c.394C>T.p.Q132*	7			
						PtPN11	c.181G>A.p.D61N	15			
20	4	HR	+	СП SP	CO3 DOD	NF1	c.346G>T.p.E116*	1	HRAS	c.181C>A.p.Q61K	65
21	4	Obs	-	ЛП LP	-	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants			NF1	c.346G>T.p.E116*	15
22	2	Obs	-	ЛР LR	-				Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants		
23	4	HR	-	СП SP	СП SP						
24	1	Obs	-	ЛР LR	-						
25	4	HR	+	ЛР LR	CP SP	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants			Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants		
26	4	HR	+	КР CR	СП SP						
27	2	HR	+	ЛР LR	-						
28	4	HR	-	СП SP	-						
29	4	HR	+	СП SP	СП SP	Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants			Нет нуклеотидных вариантов No nucleotide variants		
30	4S	HR	+	ЛР LR	CO3 DOD						
31	3	Obs	-	ЛП LP	-						
32	3	Obs	-	ЛП LP	ЛП LP	ATM	c.3292C>T.p.Q1098*	19			
						BRCA1	c.1116G>A.p.W372*	6	Нет данных No data		
						APC	c.1960C>T.p.Q654*	19			
33	3	Obs	-	ЛП LP	-	ALK	c.3824G>A.p.R1275Q	17			
						ATRX	c.4153C>T.p.Q1385*	12			
						ROS1	c.5884G>A.p.G1962R	7	Нет данных No data		
34	2	Obs	-	ЛП LP	-	BRAF	c.1789_1790delCTinsTC.p.Leu597Ser	18			

Примечание. HR – группа высокого риска; IR – группа промежуточного риска; Obs – группа наблюдений; «+» – наличие; «-» – отсутствие; ЛП – локальная прогрессия; КП – комбинированная прогрессия; СП – системная прогрессия; ЛР – локальный рецидив; КР – комбинированный рецидив; CP – системный рецидив; CO3 – смерть от заболелания; ГН – ганглионедрома.
 Note. HR – high-risk group; IR – intermediate-risk group; Obs – observation group; «+» – presence; «-» – absence; LP – local progression; CP – combined progression; SP – systemic progression; KR – local relapse; CR – combined relapse; SR – systemic relapse; DOD – death of disease; GN – ganglioneuroma; VAF – variant (mutant) allele fraction.

имело рефрактерное течение в последующем с летальным исходом. У 4 пациентов (№№8, 18, 20, 26) отмечено появление новых онкогенных вариантов (у 2 больных в генах-участниках путей RAS–MAPK и p53). У пациента №9 отмечено нарастание ФАА в гене *CREBBP* p.Q2235K в прогрессии заболевания. У пациента №4 отмечена утрата мутации в гене *PDGFRA* p.L839_A840insM с появлением нового онкогенного варианта в гене *HRAS* p.D33N.

Таким образом, можно проследить закономерность между появлением мутаций, активирующих путь RAS–MAPK и блокирующих путь p53, и развитием распространенной прогрессии/рецидива как у пациентов, относящихся к группе высокого риска, так и у больных более благоприятных групп. В то же время отмечается связь между утратой онкогенных вариантов и более благоприятным течением заболевания.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе анализа был продемонстрирован абсолютно различный генетический профиль опухоли в дебюте заболевания и при развитии рецидива или прогрессии опухоли. При этом в нашем исследовании идентичная картина в дебюте заболевания и в рецидиве получена только для пациентов без каких-либо выявленных сегментарных или нуклеотидных аберраций.

Временная генетическая гетерогенность (ВГГ) обозначает изменчивость генома опухолевой клетки в ходе прогрессирования заболевания и наблюдается при сравнении ранее не леченных опухолей и ткани новообразования, полученной в рецидиве [12]. Аберрации могут развиваться с течением времени, являясь следствием прогрессивно нарастающей генетической нестабильности новообразования, что приводит к клональной эволюции и внутриопухолевой гетерогенности. Приобретение соматических изменений в известных онкогенных путях в некоторых случаях создает основу для проведения молекулярно-направленной терапии рецидива опухоли. Несбалансированные сегментарные нарушения в рецидиве НБ могут как появляться, так и переставать определяться, причем эта закономерность характерна как для стратифицирующих цитогенетических аберраций (амплификация гена *MYCN*, делеции 1p, 11q), так и для всех других, за исключением случаев утраты амплификации *MYCN* при рецидиве/прогрессии. Появление сегментарных нарушений в опухоли может быть результатом ВГГ. Следует отметить наличие гетерогенной амплификации *MYCN*, которая является очевидным неблагоприятным фактором агрессивного локального роста и развития метастазов у пациентов в возрасте 18 месяцев и старше на момент постановки диагноза, по литературным данным [13].

В нашей когорте пациентов случаев с гетерогенной амплификацией выявлено не было.

Молекулярно-генетические изменения в опухоли в дебюте и в рецидиве/прогрессии заболевания также подвержены значительной вариабельности. Результаты полноэкзомного, а также таргетного NGS показали, что мутации в гене *ALK* можно ожидать в 8–10% случаев первичной НБ [14–16], в то время как их частота увеличивается при рецидивирующей НБ [17]. При анализе частоты выявленных генетических вариантов в парах первичная опухоль–рецидив ($n = 16$) было показано, что большинство специфичных для рецидивов мутаций возникают *de novo* либо из минорной субпопуляции, присутствующей в первичной опухоли [6]. В ходе нашего исследования частота выявления мутаций в гене *ALK* составила 10%, причем у одного пациента она была обнаружена только в рецидиве заболевания, а у другого, напротив, в рецидиве была утрачена.

Наиболее часто нуклеотидные варианты при НБ определялись в генах, кодирующих компоненты сигнальных путей RAS–MAPK и p53. В рецидиве НБ описано обогащение и приобретение *de novo* мутаций в генах, связанных с каскадом RAS–MAPK [8]. В нашей когорте в ткани первичной опухоли онкогенные варианты, приводящие к активации каскада RAS–MAPK и блокированию p53, обнаруживаются в 57,1% случаев, а в рецидиве/прогрессии – в 32,3%. Полученные нами результаты выявили более низкую частоту мутаций, активирующих путь RAS–MAPK в рецидиве заболевания, однако подтвердили негативное прогностическое значение данных аберраций. Аналогично опубликованным результатам [6, 17], в нашем исследовании также наблюдается появление генетических неблагоприятных событий в ходе терапии. Природа данных вариантов заключается в возникновении аберрации *de novo* либо в экспансии клона клеток с данной аномалией, присутствовавшего в первичной опухоли с низкой ФАА, находящейся за пределами чувствительности метода детекции. М. Chicard и соавт., проведя полноэкзомное секвенирование 17 случаев рецидивной НБ, выявили аналогичные нуклеотидные варианты в первичной опухоли, но с крайне низкой ФАА [18]. Мы также проанализировали встречаемость выявленных в рецидиве/прогрессии субклональных вариантов при анализе первичной опухоли с глубиной прочтения более 800×, однако только в 1 случае смогли обнаружить субклональный вариант в гене *SMARCA4* p.E465K с ФАА 1% в первичной опухоли. Однако стоит отметить, что условие высокой глубины прочтений не всегда выполнялось.

В нашем исследовании наиболее яркие примеры наличия субклональных патогенных вариантов, приобретающих большую ФАА в рецидиве/прогрессии заболевания (*CREBBP* p.Q2235K у пациента №9, *ALK*

p.F1174L у пациента №15), подтверждают наличие субклонов НБ, способных пережить химиотерапию. Это может быть результатом клональной эволюции из-за дарвиновского отбора среди опухолевых клеток [19]. Он также может возникнуть в отсутствие отбора через механизм генетического дрейфа [20]. Так или иначе выявлено, что ВГГ связана с прогрессирующим заболеванием и устойчивостью к лечению, вероятно, из-за отбора химиорезистентных клонов [21]. Таким образом, результаты исследований указывают на существование генетической ВГГ при НБ и требуют исследования ткани опухоли, максимально приближенной к неблагоприятному событию для подбора противорецидивной терапии оптимальной интенсивности и молекулярно-направленной терапии. Однако маловероятно, что мишень для таргетной терапии, обнаруженная только при рецидиве заболевания и не обнаруженная в соответствующей первичной опухоли, будет присутствовать во всех опухолевых клетках в организме пациента, так как выявленная мутация при этом не будет частью «ствола» филогенетического дерева новообразования. Следовательно, таргетирование аберрантного белка, специфичного для рецидива, может обеспечить только временный контроль за заболеванием, приводя к элиминации отдельного (отдельных) субклона (субклонов) опухоли.

Продemonстрированная негативная прогностическая роль достижения репликативного бессмертия клетками НБ за счет поддержания длины теломер осуществляется за счет множества путей активации фермента теломеразы, а также запуска альтернативных путей удлинения теломер [22, 23]. В настоящей работе был произведен анализ экспрессии гена *TERT*, кодирующего каталитическую субъединицу теломеразы, а также инактивирующие мутации в гене *ATRX*, являющиеся наиболее частым пусковым фактором альтернативного (*TERT*-независимого) пути поддержания длины теломерных повторов. Был подтвержден факт повышения уровня экспрессии *TERT* при наличии амплификации *MYCN*, объясняющийся прямым активирующим влиянием транскрипционного фактора N-тус на промотор *TERT*. Учитывая тот факт, что пациенты с амплификацией *MYCN* относятся к группе высокого риска, прогностическая ценность экспрессии *TERT* в данной группе нивелируется. Однако прогностическая роль уровня экспрессии *TERT* в первичной опухоли строго коррелировала с развитием неблагоприятного

события, а также системного характера рецидива или прогрессии заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существующая в настоящее время практика оценки генетических маркеров, таких как амплификация *MYCN* и делеция 1p, неоспоримо является важной для определения прогноза у пациентов с НБ. Однако стратификация на группы риска, учитывающая только данные цитогенетические аберрации, неидеальна и не может объяснить все случаи агрессивного течения опухоли. Дополнительные подходы молекулярно-генетического исследования с использованием методов MLPA, NGS, оценки экспрессии *TERT* дают более обширное представление о биологии опухоли и степени ее агрессивности. Прогностически значимые факторы, как правило, обнаруживаются в первичной опухоли. Однако НБ – это опухоль, характеризующаяся крайне высокой внутриопухолевой гетерогенностью, реализующейся как в пространственном, так и во временном аспектах. Исследование неопластической ткани в рецидиве заболевания приближает к пониманию механизмов метастазирования и химиорезистентности опухоли и, напротив, дифференцировки нейробластов, сопровождающейся снижением их биологической агрессивности. Факт приобретения или утраты прогностически значимых молекулярно-генетических факторов позволяет опираться на них при определении долгосрочного прогноза и выбора оптимальной интенсивности терапии второй и последующих линий. Необходимость интенсификации химиотерапии метастатических рецидивов НБ и поиска мишеней для таргетной терапии также требует проведения биопсии опухоли в рецидиве или прогрессии заболевания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Andreeva N.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5626-218X>

Shamanskaya T.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3767-4477>

Kachanov D.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3704-8783>

Druy A.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1308-8622>

Литература

1. Brodeur G., Hogarty M., Bagatell R., Mosse Y., Maris J. Neuroblastoma. In: Pizzo P., Poplack D. (eds.). Principles and Practice of Pediatric Oncology. 7th ed. Wolters Kluwer; Philadelphia, PA, USA: 2016. Pp. 772–798.
2. Brodeur G.M. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Cell Tissue Res* 2018; 372 (2): 277–86. DOI: 10.1007/s00441-017-2761-2
3. Maris J.M. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010; 362: 2202–11.
4. Berthold F., Faldum A., Ernst A., Boos J., Dilloo D., Eggert A., et al. Extended induction chemotherapy does not improve the outcome for high-risk neuroblastoma patients: results of the randomized open-label GPOH trial NB2004-HR. *Ann Oncol* 2020; 31 (3): 422–9. DOI: 10.1016/j.annonc.2019.11.011
5. Alexandrov L., Nik-Zainal S., Wedge D., Aparicio S.A.J.R., Behjati S., Biankin A.V., et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; 500: 415–21. DOI: 10.1038/nature12477
6. Schramm A., Köster J., Assenov Y., Althoff K., Peifer M., Mahlow E., et al. Mutational dynamics between primary and relapse neuroblastomas. *Nat Genet* 2015; 47 (8): 872–7. DOI: 10.1038/ng.3349
7. Carr-Wilkinson J., O'Toole K., Wood K.M., Challen C.C., Baker A.G., Board J.R., et al. High Frequency of p53/MDM2/p14ARF Pathway Abnormalities in Relapsed Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16 (4): 1108–18. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1865
8. Eleveld T.F., Oldridge D.A., Bernard V., Koster J., Colmet Daage L., Diskin S.J., et al. Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations. *Nat Genet* 2015; 47 (8): 864–71. DOI: 10.1038/ng.3333
9. Ackermann S., Cartolano M., Hero B., Welte A., Kahlert Y., Roderwieser A., et al. A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science* 2018; 362 (6419): 1165–70. DOI: 10.1126/science.aat6768
10. Basta N.O., Halliday G.C., Makin G., Birch J., Feltbower R., Bown N., et al. Factors associated with recurrence and survival length following relapse in patients with neuroblastoma. *Br J Cancer* 2016; 115 (9): 1048–57. DOI: 10.1038/bjc.2016.302
11. Ambros I.M., Brunner B., Aigner G., Bedwell C., Beiske K., Bénard J., et al. A Multilocus technique for risk evaluation of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 792–804. Ambros P.F., Ambros I.M., Brodeur G.M., Haber M., Khan J., Nakagawara A., et al. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer* 2009; 100: 1471–82.
12. Von Stedingk K., Gisselsson D., Bexell D. Multidimensional intratumour heterogeneity in neuroblastoma. *Oncotarget* 2019; 10 (1): 3–5. DOI: 10.18632/oncotarget.26524
13. Berbegall A.P., Bogen D., Pötschger U., Beiske K., Bown N., Combaret V., et al. Heterogeneous MYCN amplification in neuroblastoma: a SIOP Europe Neuroblastoma Study. *Br J Cancer* 2018; 118 (11): 1502–12. DOI: 10.1038/s41416-018-0098-6
14. Janoueix-Lerosey I., Lequin D., Brugières L., Ribeiro A., de Pontual L., Combaret V., et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 2008; 455 (7215): 967–70. DOI: 10.1038/nature07398
15. Mossé Y.P., Laudenslager M., Longo L., Cole K.A., Wood A., Attiyeh E.F., et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008; 455 (7215): 930–5. DOI: 10.1038/nature07261
16. Sausen M., Leary R.J., Jones S., Wu J., Reynolds C.P., Liu X., et al. Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nat Genet* 2013; 45 (1): 12–7. DOI: 10.1038/ng.2493
17. Schleiermacher G., Janoueix-Lerosey I., Delattre O. Recent insights into the biology of neuroblastoma. *Int J Cancer* 2014; 135 (10): 2249–61. DOI: 10.1002/ijc.29077
18. Chicard M., Colmet-Daage L., Clement N., Danzon A., Bohec M., Bernard V., et al. Whole-Exome Sequencing of Cell-Free DNA Reveals Temporo-spatial Heterogeneity and Identifies Treatment-Resistant Clones in Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2018; 24 (4): 939–49. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1586
19. Abbasi M.R., Rifatbegovic F., Brunner C., Mann G., Ziegler A., Pötschger U., et al. Impact of Disseminated Neuroblastoma Cells on the Identification of the Relapse-Seeding Clone. *Clin Cancer Res* 2017; 23 (15): 4224–32. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2082
20. Parsons D.W., Roy A., Yang Y., Wang T., Scollon S., Bergstrom K., et al. Diagnostic Yield of Clinical Tumor and Germline Whole-Exome Sequencing for Children With Solid Tumors. *JAMA Oncol* 2016; 2 (5): 616–24. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.5699
21. Mengelbier L., Karlsson J., Lindgren D., Valind A., Lilljebjörn H., Jansson C., et al. Intratumoral genome diversity parallels progression and predicts outcome in pediatric cancer. *Nat Commun* 2015; 6: 6125. DOI: 10.1038/ncomms7125
22. Hiyama E., Hiyama K., Nishiyama M., Reynolds C.P., Shay J.W., Yokoyama T. Differential gene expression profiles between neuroblastomas with high telomerase activity and low telomerase activity. *J Pediatr Surg* 2003; 38 (12): 1730–4. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2003.08.042
23. Ohali A., Avigad S., Ash S., Goshen Y., Luria D., Feinmesser M., et al. Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer* 2006; 107 (6): 1391–9. DOI: 10.1002/cncr.22132