

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-106-115>

CC BY 4.0

Молекулярно-генетические особенности нейробластомы у пациентов подросткового возраста

Н.А. Андреева, Т.В. Шаманская, Д.Ю. Качанов, Р.Х. Абасов, Н.В. Гегелия, А.Е. Друй

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117198 Москва, ул. Саморы Машела, 1

Контакты: Наталья Александровна Андреева andreeva793@bk.ru

Введение. У подростков и молодых взрослых нейробластома развивается крайне редко, характеризуется индолентным течением, очень плохим отдаленным прогнозом и имеет молекулярно-генетические особенности.

Цель исследования – клиническая и молекулярно-генетическая характеристика нейробластомы в когорте пациентов старше 10 лет.

Материалы и методы. Ретроспективно отобраны пациенты с гистологически верифицированным диагнозом «нейробластома/ганглионейробластома», установленным в возрасте старше 10 лет. Для выявления генетических аберраций в клетках опухоли применялись флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), мультиплексная лигазозависимая амплификация (multiplex ligation-dependent amplification, MLPA) и тагетное высокопроизводительное секвенирование ДНК. В описываемую когорту вошли 11 больных подросткового возраста с медианой возраста на момент постановки диагноза 160 мес (124–173 мес) и 1 больной в возрасте 41 года (клинические данные отсутствуют). Все пациенты подросткового возраста получали лечение в соответствии с протоколом NB-2004. Медиана времени наблюдения за этими больными ($n = 11$) составила 32 мес (8–68 мес).

Результаты. С помощью FISH амплификация гена *MYCN* обнаружена в 17 % случаев, делеции 1p и 11q – в 20 и 22,2 % случаев соответственно. Методом MLPA в опухоли 9 пациентов наиболее часто определялись делеции 1p и 3p (по 80 % случаев), 11q (67 % случаев), 4p (56 % случаев), а также увеличение числа копий 17q (62,5 % случаев). Дефекты в гене *ATRX* обнаружены у 11 (91,6 %) из 12 пациентов. В 90 % случаев (у 10 из 11 больных) выявлены делеции гена *ATRX* различной протяженности. У 3/11 (27,3 %) пациентов обнаружены 2 миссенс-мутации (p.V1678F, p.N2125I) и нонсенс-мутация p.S213*. При этом у 2 больных выявлены онкогенные нуклеотидные замены, сочетающиеся с делецией всего гена *ATRX* и моносомией X. Онкогенные генетические варианты в компонентах путей RAS-RAF-MEK (*BRAF*, *NRAS*, *ALK*) и p53 (*ATM*, *TP53*) определены в 58 % (7/12) случаев. При добавлении к терапии ALK-ингибиторов в 1-й линии при наличии соответствующих активирующих миссенс-мутаций неблагоприятные события не наблюдались.

Заключение. Биологические особенности и клиническая агрессивность нейробластомы у подростков/взрослых могут быть объяснены репликативной иммортализацией клеток за счет альтернативного пути поддержания длины теломера. Для лечения пациентов данной возрастной группы должны быть разработаны специальные терапевтические рекомендации; особое внимание необходимо уделить применению молекулярно-направленной терапии.

Ключевые слова: нейробластома, подростки, *ATRX*, *ALK*

Для цитирования: Андреева Н.А., Шаманская Т.В., Качанов Д.Ю. и др. Молекулярно-генетические особенности нейробластомы у пациентов подросткового возраста. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):106–115.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-106-115>

Molecular genetic features of neuroblastoma in adolescent

N.A. Andreeva, T.V. Shamanskaya, D.Yu. Kachanov, R.Kh. Abasov, N.V. Gegeliya, A.E. Druy

Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia; 1 Samora Mashela St., Moscow 117198, Russia

Contacts: Nataliya Alexandrovna Andreeva andreeva793@bk.ru

Introduction. Neuroblastoma extremely rarely occurs in adolescents and young adults and presents with slowly progressing clinical course with a very poor long-term outcome. Adolescent neuroblastoma are characterized by unique molecular phenotype.

Aim. To determine the clinical and biological features of neuroblastoma in patients over 10 years old.

Materials and methods. Patients with a histologically verified diagnosis of neuroblastoma/ganglioneuroblastoma established over the age of 10 years were retrospectively selected. Molecular genetic tests included fluorescence *in situ* hybridization (FISH), multiplex ligation-dependent amplification (MLPA) and targeted next generation sequencing of tumor-derived DNA. The described cohort included 11 adolescents with histologically verified neuroblastoma/ganglioneuroblastoma with a median age of 160 months (124–173 months) at diagnosis and 1 patient aged 41 years (clinical data is missing). All adolescents were treated according to the neuroblastoma treatment protocol NB-2004. The median follow-up time for patients ($n = 11$) was 32 months (8–68 months).

Results. *MYCN* gene amplification was detected by FISH in 17 %; deletion of 1p and 11q – in 20 and 22.2 % of cases, respectively. Deletions of 1p and 3p (80 % cases each), 11q (67 % cases), 4p (56 % cases), and gain 17q (62.5 % cases) were frequently detected in tumors ($n = 9$) by MLPA. *ATRX* gene aberrations were found in 91.6 % (11/12). In the most cases (10/11; 90 %), *ATRX* gene deletions of varying length were detected. Missense substitutions p.V1678F, p.N2125I and nonsense mutation p.S213* were detected in 3/11 (27.3 %) patients. Moreover, in 2 patients, oncogenic nucleotide substitutions were identified in combination with *ATRX* gene deletion entire and monosomy X. Oncogenic genetic variants in components of the RAS-RAF-MEK (*BRAF*, *NRAS*, *ALK*) and p53 (*ATM*, *TP53*) pathways were detected in 58 % (7/12) of cases. No adverse events were observed when ALK inhibitors were added to first-line therapy in neuroblastomas harboring activating *ALK* mutations.

Conclusion. The clinical aggressiveness of adolescent/adult NB may be explained by the replicative immortalization of cells through alternative lengthening of telomeres, which is highlighted by *ATRX* aberrations. Special therapeutic recommendations should be elaborated for the treatment of patients in this age group, where special attention should be paid to the use of molecularly targeted therapy.

Keywords: neuroblastoma, adolescents, *ATRX*, *ALK*

For citation: Andreeva N.A., Shamanskaya T.V., Kachanov D.Yu. et al. Molecular genetic features of neuroblastoma in adolescent. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):106–15. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-106-115>

ВВЕДЕНИЕ

Нейробластома (НБ) — самая распространенная экстракраниальная солидная злокачественная опухоль у детей, которая в основном развивается в возрасте до 5 лет (более 90 % всех случаев) [1]. В 30 % случаев данная патология возникает у детей 1-го года жизни. У пациентов подросткового возраста и взрослых пациентов развитие НБ — редкое событие, наблюдаемое с частотой 0,2 случая на 1 млн человек [2]. По данным Программы регистрации статистических данных по онкологической заболеваемости и смертности (Surveillance Epidemiology and End Results, SEER) Национального института рака США (National Cancer Institute, NCI), развитие НБ в возрасте старше 20 лет наблюдалось в 6,1 % случаев, а в возрасте старше 60 лет — в 0,9 % [2].

Нейробластома, развивающаяся в подростковом и более старшем возрасте, имеет особенности клинического течения. Как правило, у подростков и молодых пациентов заболевание протекает индолентно, медленно, но неуклонно прогрессирует, несмотря на проведение терапии. Имеются несколько сообщений о худшем ответе НБ на химио- и лучевую терапию больных старше 10 лет, что приводит к развитию локального или системного рецидива [3, 4]. Пятилетняя общая выживаемость пациентов старше 20 лет, по данным SEER, и пациентов 10–19 лет, по данным Международной группы по изучению факторов риска при нейробластоме (International Neuroblastoma Risk Group, INRG), не превышают 36,3 и 46,2 % соответственно [2, 5].

При этом биологическая агрессивность НБ у подростков не может быть объяснена наличием стандартных цитогенетических aberrаций, используемых для стратификации пациентов на группы риска [6]. Амплификация гена *MYCN* у больных данной возрастной группы встречается лишь в 9 % случаев, тогда как в общей когорте — в 20–25 % [5]. Напротив, сообщается о более частой встречаемости делеции 11q и увеличении числа копий 17q у пациентов с НБ подросткового возраста [7].

В связи с немногочисленностью пациентов с НБ старше 10 лет в большинстве работ описываются единичные наблюдения или небольшие когорты больных, у которых не во всех случаях оценивали молекулярно-генетический профиль опухоли. В зарубежной литературе есть всего несколько публикаций, подчеркивающих наличие молекулярно-генетических особенностей НБ, развивающейся у подростков и взрослых. Так, выявлены соматические генетические aberrации в гене *ATRX*, приводящие к потере функции белка (делеции, нонсенс-мутации, инделы со сдвигом рамки считывания белка). У пациентов с НБ старше 18 лет соматические мутации или делеции *ATRX* обнаружены в 58 % случаев, соматические мутации в гене *ALK* — в 42 %, что значительно больше, чем в общей популяции больных НБ [8]. N.K. Cheung и соавт. показали зависимость частоты выявления мутаций в гене *ATRX* от возраста больных: у пациентов в возрасте до 18 мес ($n = 18$) aberrации не выявлены ни в одном случае, в возрасте 18 мес — 12 лет мутации *ATRX* определены в 17 % (9/54) случаев, а в возрасте старше 12 лет —

в 44 % (14/32). При этом у всех взрослых больных с метастатической формой заболевания обнаружены мутации в этом гене [9]. Таким образом, отмечены рекуррентные молекулярно-генетические изменения у пациентов с НБ, заболевших в возрасте старше 10 лет. В отечественной литературе на данный момент имеется лишь 1 публикация, в которой описана серия клинических случаев [10].

Цель исследования — клиническая и молекулярно-генетическая характеристика НБ в когорте пациентов старше 10 лет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с 2019 по 2023 г. в лаборатории молекулярной онкологии Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева пациентам с морфологически верифицированным диагнозом «нейробластома/ганглионейробластома» в дебюте заболевания проведены 162 молекулярно-генетических исследования методом таргетного высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS). Ретроспективно из данной группы выбраны больные старше 10 лет на момент установления диагноза, данные которых проанализированы в рамках настоящего исследования. У всех пациентов определено наличие несбалансированных хромосомных аберраций с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) и мультиплексной лигазозависимой амплификации (multiplex ligase-dependent probe amplification, MLPA).

Методом FISH на ткани первичной опухоли выявлялись изменения количества копий гена *MYCN*, делеции короткого плеча хромосомы 1 (1p36) и длинного плеча хромосомы 11 (11q23). Интерпретация результатов исследования осуществлялась согласно протоколу немецкой группы по изучению нейробластом NB2004. Сегментарные и количественные хромосомные аберрации в ткани опухоли выявляли методом MLPA с использованием наборов SALSA P251, P252, P253 (MRC Holland, Нидерланды), содержащих олигонуклеотидные зонды, специфичные к различным регионам хромосом 1–4, 7, 9, 11, 12, 14, 17. Детекцию результатов проводили с помощью капиллярного электрофореза с применением генетического анализатора SeqStudio (Thermo Fischer Scientific, США). Обработку и анализ полученных результатов проводили с использованием программы Coffalyser.Net (MRC Holland, Нидерланды). Результаты интерпретировали в соответствии с критериями Европейской группы по оптимизации терапии нейробластомы Международного общества детских онкологов (International Society of Paediatric Oncology Europe Neuroblastoma, SIOPEN) [11].

Таргетное высокопроизводительное секвенирование ДНК, выделенной из ткани опухоли, проводили с использованием кастомизированной панели QIASeq (Qiagen, Германия), включающей гены, значимые в этио-

патогенезе детских солидных опухолей, в том числе все экзоны гена *ATRX*. Секвенирование выполняли путем парно-концевого прочтения на приборе MiSeq с помощью набора реагентов Kit MiSeq Reagent Kit, v2 (300 циклов) (Illumina, США) со средней глубиной прочтения региона интереса более 500×. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы специализированные базы данных соматических (VarSome, COSMIC, OncoKB) и герминальных (VarSome, HGMD, OMIM) мутаций, а также данные литературы. Сведения о числе копий отдельных экзонов отсековированных генов получены с помощью сервиса QIAGEN GeneGlobe (Qiagen, Германия).

В описываемую когорту вошли 12 пациентов, из них 11 подросткового возраста (диапазон возраста на момент постановки диагноза 124–173 мес, медиана возраста 160 мес). Также в исследование включен 1 пациент 41 года, который получал консультативную помощь в Национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева. Этот случай представлял интерес в связи с немногочисленностью взрослых больных НБ и схожестью биологии опухоли во взрослом и подростковом возрасте. Все педиатрические пациенты получали лечение по протоколу НБ NB2004. В качестве интенсификации терапии при выявлении активирующих мутаций в гене *ALK* применяли соответствующие ингибиторы (церитиниб, лорлатиниб): в 2 случаях в 1-й линии терапии, в 1 — при прогрессировании заболевания.

Для анализа качественных характеристик применяли критерий χ^2 . Выживаемость пациентов оценивали с помощью метода Каплана–Майера по состоянию на 01.09.2023. Медиана времени наблюдения за больными ($n = 11$) составила 32 мес (диапазон 8–68 мес). Взрослый пациент выбыл из-под наблюдения. Медиана времени до развития неблагоприятного события или последнего наблюдения составила 17 мес (диапазон 4–38 мес).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди 12 больных, вошедших в исследование, в 9 (75 %) случаях опухоль представлена низкодифференцированной НБ, в 2 (16,7 %) — недифференцированной НБ, в 1 (8,3 %) — смешанной ганглионейробластомой. В анализируемой когорте превалировали пациенты с заболеванием 4-й стадии (63,6 %; 7/11) и пациенты группы высокого риска (72,7 %; 8/11). Статус гена *MYCN* проанализирован у всех 12 больных (у взрослого пациента применен метод MLPA); амплификация данного гена обнаружена в 2 (17 %) случаях. Делеция 1p выявлена у 2 (20 %) из 10 пациентов, делеция 11q — у 2 (22,2 %) из 9 пациентов.

Исследование методом MLPA, выполненное 9 пациентам, позволило во всех случаях обнаружить геномный профиль неблагоприятной НБ, характеризующийся значительным количеством сегментарных

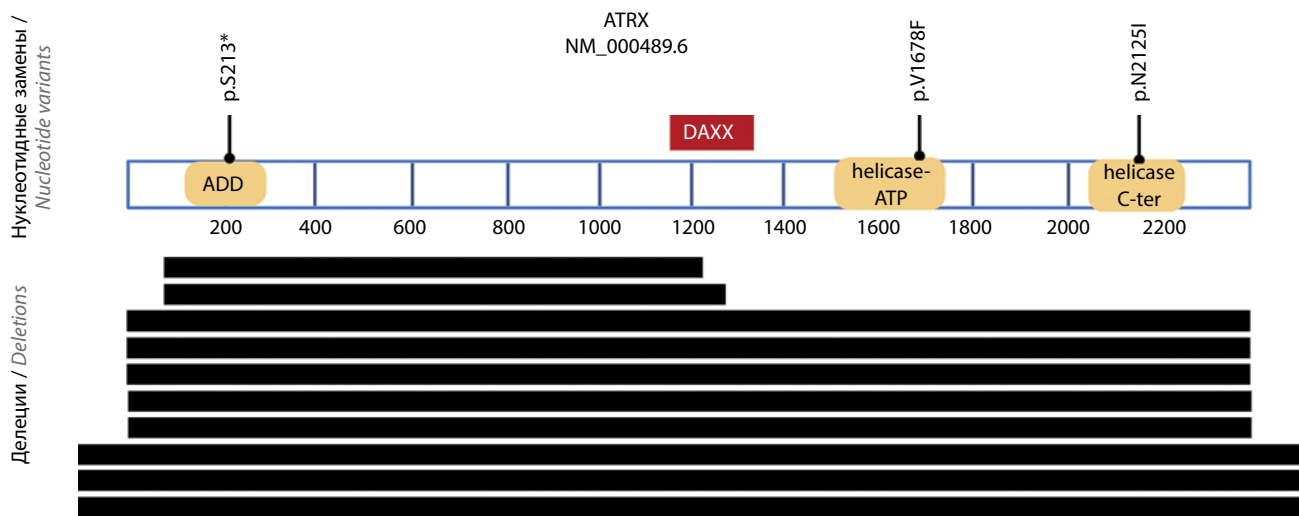
хромосомных aberrаций и отсутствием количественных изменений хромосом. Количество сегментарных aberrаций в опухолевом геноме варьировало от 2 до 5 (медиана составила 4 aberrации). Наиболее часто определялись делеции 1p (80 % случаев), 3p (80 % случаев), 11q (67 % случаев), 4p (56 % случаев), а также увеличение числа копий 17q (62,5 % случаев). В единичных случаях выявлены делеции 2q, 7q, изохромосома 11 и увеличение числа копий генов *MYCN* и *ALK*, не достигающие порога амплификации. Материал только 1 пациента с наличием амплификации гена *MYCN* по данным FISH был доступен для исследования методом MLPA. Наличие амплификации региона 2p23.4 (включающего гены *MYCN*, *DDX1*, *NBAS*) подтверждено двумя независимыми методами. Делеции 1p и 11q выявлены с помощью MLPA в значительно большем числе случаев, чем в ходе FISH (см. таблицу).

Исследование методом NGS с оценкой нуклеотидных вариантов и аномалий числа копий анализируемых генов позволило обнаружить дефекты в гене *ATRX* у 11 (91,6 %) из 12 пациентов. В большинстве случаев (10/11; 90 %) выявлены делеции гена *ATRX* в виде утраты экзонов 4–10, 4–12 или полной кодирующей последовательности гена (см. рисунок). У 3 (30 %) из 10 пациентов женского пола утрата всей кодирующей последовательности гена *ATRX* была связана с моносомией X, обнаруженной по снижению копийности генов, картированных как на длинном, так и на коротком плече хромосомы X. В 3 (30 %) из 10 случаев делеция гена *ATRX* или экзонов 4–12 (в 1 случае) носила субклональный характер. У 3 (27,3 %) из 11 пациентов выявлены нуклеотидные миссенс-мутации p.V1678F и p.N2125I ($n = 2$) и нонсенс-мутация p.S213* ($n = 1$). Причем у 2 больных обнаружены онкогенные нуклеотидные замены, сочетающиеся с делецией всего гена *ATRX* и моносомией X.

Молекулярно-генетические изменения в опухоли у пациентов не ограничивались aberrациями в гене *ATRX* (см. таблицу). В 58 % (7/12) случаев выявлены дефекты в генах, кодирующих компоненты сигнальных путей RAS-RAF-MEK и p53 (*BRAF*, *ATM*, *NRAS*, *TP53*), включая активирующие миссенс-варианты в гене *ALK*, обнаруженные у 3 больных и послужившие основанием для назначения таргетной терапии. В остальных случаях обнаружены патогенные варианты в генах *ATP7B* и *FANCD2*. Лишь у 1 пациента в ткани опухоли не выявлено онкогенных вариантов.

Примечательно, что у 2 пациентов наблюдались патогенетически взаимоисключающие события: амплификация гена *MYCN* и делеция гена *ATRX*. Как уже отмечалось выше, у 1 из данных больных амплификация гена *MYCN* подтверждена двумя различными методами.

При анализе выживаемости пациентов ($n = 11$) прослеживается индолентное течение НБ, характеризующееся медленным, но неуклонным прогрессированием. Так, 3-летняя бессобытийная выживаемость составила 43,1 % (95 % доверительный интервал 16,5–100), 3-летняя ОВ – 88,9 % (95 % доверительный интервал 70,6–100). У 5 (45 %) из 11 пациентов выявлены неблагоприятные события. Медиана количества таких событий, связанных с заболеванием, у 1 пациента составила 2 (диапазон 2–4). Живы без событий 6 больных. Однако стоит отметить небольшой срок наблюдения за пациентами, который составил 32 мес (диапазон 8–68 мес). Один взрослый больной выбыл из-под наблюдения. Наличие мутаций в компонентах путей RAS-RAF-MEK и p53 в дополнение к выявляемым в большинстве случаев дефектам в гене *ATRX* обнаружено у 7 пациентов и было сопряжено с повышенной частотой прогрессирования опухоли: у 4 (66,7 %) из 6 больных терапия оказалась неудачной, 1 больной



Результаты секвенирования гена *ATRX*. Черными линиями указана протяженность делеций в этом гене. Наиболее протяженные линии соответствуют моносомии X-хромосомы. Helicase-ATP – хеликазный АТФ-связывающий домен; helicase C-ter – хеликазный C-концевой домен
ATRX gene sequencing results. Black lines indicate the extent of deletions in this gene. The longest lines correspond to monosomy of the X chromosome. Helicase-ATP – helicase ATP-binding domain; helicase C-ter – helicase C-terminal domain

Характеристика пациентов с нейробластомой (НБ) старше 10 лет
Characteristics of patients with neuroblastoma (NB) older than 10 years

Паци- ент Patient	Пол Gender	Возраст на момент диагноза, лет Diagnosis age, years	Локализация первичного очага Primary tumor location	Стадия по INSS INSS stage	Группа риска по протоко- лу NB2004 Risk group according to the NB2004 protocol	Статус MYCN (FISH) (MYCN status status (FISH))	Статус 1p 1p status	Статус 11q 11q status	Неблагопри- ятное событие Adverse event	Исход Out- come	Дефекты в гене ATRX** ATRX gene defects**	Нуклеотидные варианты в других генах** Nucleotide variants in the other genes**
1 ^s	Ж F	41,1	Н/д N/d	Н/д N/d	Н/д N/d	N [#]	Делеция [#] Deletion [#]	Делеция [#] Deletion [#]	Н/д N/d	Н/д N/d	ATRX p.V1678F (32 %)	ATM p.E1822* (36 %)
2	М M	14,4	Забрюшинное пространство Retroperitoneal	4	ВР HR	N	N	N	Нет No	Жив Alive	Делеция экзонов 4–12 (субклональный вариант) Exons 4–12 delation (subclonal variant)	ALK p.F1174I (14 %)
3	Ж F	10,4	Забрюшинное пространство Retroperitoneal	4	ВР HR	N	Н/д N/d	N	Нет No	Жив Alive	Делеция гена (моносомия X) Gene delation (monosomy X)	ALK p.F1174L (16 %)
4	М M	13,5	Надпочечник Adrenal gland	4	ВР HR	Ампли- фикация Amplifi- cation	Делеция Deletion	N	Системный рецидив Systemic relapse	Умер Died	Делеция гена Gene delation	Нет No
5	М M	12,2	Забрюшинное пространство Retroperitoneal	4	ВР HR	N	N	Н/д N/d	Системная прогрессия Systemic progression	Жив Alive	Делеция экзонов 4–10 Exons 4–10 delation	ALK p.R1275Q (23 %)
6	М M	13,7	Забрюшинное пространство Retroperitoneal	4	ВР HR	N	N	N	Нет No	Жив Alive	Делеция гена Gene delation	Нет No
7	М M	13,4	Надпочечник Adrenal gland	3	ПР IR	N	N	N	Системный рецидив Systemic relapse	Жив Alive	ATRX p.S213* (67 %), делеция гена (субкло- нальный вариант) ATRX p.S213* (67 %), gene delation (subclonal variant)	BRAF p.K601E (23 %)

Окончание таблицы
The end of table

Паци- ент Patient	Пол Gender	Возраст на момент диагноза, лет Diagnosis age, years	Локализация первичного очага Primary tumor location	Стадия по INSS INSS stage	Группа риска по протоко- лу NB2004 Risk group according to the NB2004 protocol	Статус <i>MYCN</i> (<i>FISH</i>) <i>MYCN</i> status (<i>FISH</i>)	Статус 1p 1p status	Статус 11q 11q status	Неблагопри- ятное событие Adverse event	Исход Out- come	Дефекты в гене <i>ATRX</i> ** <i>ATRX</i> gene defects**	Нуклеотидные варианты в других генах** Nucleotide variants in the other genes**
8	Ж F	11,0	Мультифо- кальная НБ Multifocal NB	4	ВР HR	N	N	Делеция Deletion	Нет No	Жив Alive	<i>ATRX</i> p.N2125I (51 %), делеция гена (моносомия X) <i>ATRX</i> p.N2125I (51 %), gene delation (monosomy X)	<i>ATP7B</i> p.A1135Qfs*13 (32 %)
9	Ж F	12,5	Надпочечник Adrenal gland	1	ВР HR	Ампли- фикация Amplific- ation	N	N	Нет No	Жив Alive	Делеция гена Gene delation	Нет No
10*	Ж F	10,4	Надпочечник Adrenal gland	4	ВР HR	N	N	Делеция Deletion	Нет No	Жив Alive	Нет No	Нет No
11	М M	13,3	Средостение Posterior mediastinum	2	НР LR	N	N	Н/д N/d	Системная прогрессия Systemic progression	Жив Alive	Делеция гена (субкло- нальный вариант) Gene delation (subclonal variant)	<i>FANCD2</i> p.G333* (11 %), <i>FANCD2</i> p.W364* (24 %), <i>FANCD2</i> c.696-1G>A (19 %), <i>NRAS</i> p.Q61L (29 %)
12	Ж F	14,3	Забрюшинное пространство Retroperitoneal	2	НР LR	N	N	N	Системная прогрессия Systemic progression	Жив Alive	Делеция гена (моносомия X) Gene delation (monosomy X)	<i>TP53</i> p.S127_Q128insP (56 %)

* Гистологический тип – смешанная ганглионеуробластома. ** Для нуклеотидных вариантов указана доля альтернативного аллеля (%). § Единственный взрослый пациент (старше 18 лет) в исследуемой группе выбыл из-под наблюдения. * Результаты мультиплексной лигазозависимой амплификации (multiplex ligation-dependent amplification, MLPA).

Примечание. Ж – женский пол; М – мужской пол; Н/д – нет данных; N – норма; ВР – группа высокого риска; ПР – группа промежуточного риска; НР – группа низкого риска (наблюдения); INSS – International Neuroblastoma Staging System, Международная система оценки стадии при нейробластоме.

* Histological type – mixed ganglioneuroblastoma. ** The proportion of the alternative allele is indicated for nucleotide variants (%). § The only adult patient (over 18 years old) in the study group, lost to follow-up.

* Multiplex ligation-dependent amplification (MLPA) results.

Note. F – female; M – male; N/d – no data; N – normal; HR – high risk; IR – intermediate risk; LR – low risk (observation); INSS – International Neuroblastoma Staging.

выбыл из-под наблюдения. Напротив, отсутствие нуклеотидных вариантов в компонентах патогенетически значимых путей RAS-RAF-MEK и p53 связано с меньшей вероятностью прогрессирования заболевания (1/5; 20 %), однако различия не были статистически значимыми ($p = 0,12$).

Интересным представляется отсутствие неблагоприятных событий у 2 пациентов с заболеванием IV стадии с делециями гена *ATRX* и миссенс-мутациями в тирозинкиназном домене *ALK*, получавших *ALK*-ингибиторы в 1-й линии терапии. Период наблюдения составил 32 и 34 мес.

ОБСУЖДЕНИЕ

Подростковая/взрослая НБ по своим клиническим и биологическим характеристикам значительно отличается от опухолей, возникающих в раннем возрасте, в той же мере, в которой различаются НБ у детей младше и старше 18 мес. При этом возрастной порог смены биологии НБ в детском возрасте определен довольно однозначно. Молекулярно-генетическими маркерами опухолей данных типов являются хромосомные aberrации — количественные, характерные для благоприятных НБ, и сегментарные — характерные для агрессивных. Единого мнения о втором возрастном пороге, после которого биология НБ вновь кардинально меняется, нет. В исследовании V.F. Lasorsa и соавт. показано, что профиль сегментарных хромосомных aberrаций в опухолях, манифестировавших до и после 6 лет, значительно различается [12]. Однако при изучении выживаемости пациентов введение возрастного порога в 6 лет не позволяло разделить больных, прогноз у которых был различен [13]. На данный момент согласно периодизации возраста Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), большинство исследователей определяют НБ подросткового возраста при манифестации заболевания в 10–18 лет и НБ взрослых — при дебюте заболевания в возрасте старше 18 лет.

Стандартное лечение с использованием цитостатических препаратов подростковой НБ обычно неэффективно. Течение заболевания носит прогрессивный характер, часто возникают последовательные эпизоды прогрессии опухоли. В то же время события могут развиваться через длительный промежуток времени, который иногда занимает годы. Бурная опухолевая прогрессия не характерна для НБ подросткового возраста. Клиническое поведение НБ у пациентов старше 10 лет отличается неблагоприятным течением как при локализованных, так и при метастатических формах заболевания. Феномен спонтанной регрессии или созревания НБ в данной возрастной группе не описан, поэтому наличие резидуальной опухоли (в том числе микроскопической) после хирургического лечения является фактором риска развития рецидива заболевания [14]. Амплификация гена *MYCN* в клетках подростковой НБ встречается редко (до 9 %

случаев) и не может объяснить агрессивное течение заболевания [5, 15]. В нашем исследовании встречаемость амплификации гена *MYCN* оказалась больше, чем в других исследованиях, — в 2 (17 %) случаях, что связано с немногочисленностью и селективностью выборки. У всех больных опухоль имела значительное количество сегментарных хромосомных aberrаций. Наиболее часто встречались делеции 1p (80 % случаев), 11q (67 % случаев), 3p (80 % случаев) и 4p (56 % случаев) и увеличение числа копий 17q (62,5 % случаев). Более частое выявление делеции 11q и увеличения числа копий 17q в группе больных НБ старше 10 лет, описанное в литературе, подтверждено с помощью MLPA.

В литературе, посвященной генетическому профилю подростковой НБ, сообщалось о значительном превалировании дефектов в генах *ATRX* и *ALK* [8, 9, 15]. В нашей когорте aberrации гена *ATRX* выявлены в 92 % случаев. С учетом значительно более редкой встречаемости аномалий *ATRX* у больных НБ младшего возраста и патогенетического значения этих нарушений наличие инактивирующих молекулярно-генетических событий в данном гене может рассматриваться как маркер специфического клинко-биологического феномена — подростковой НБ. На наш взгляд, именно дефекты *ATRX* могут стать «водоразделом», позволяющим осуществлять дифференциальную диагностику типичных и подростковых опухолей, аналогично тому, как несбалансированные хромосомные aberrации дают возможность разделить благоприятные и неблагоприятные НБ у пациентов младшего возраста.

Ген *ATRX* локализуется в локусе 21.1q на X-хромосоме и состоит из 35 экзонов. Белок, кодируемый этим геном, содержит домен АТФазы/хеликазы и принадлежит к семейству факторов ремоделирования хроматина. Герминальные мутации в этом гене связаны с X-сцепленным синдромом, проявляющимся когнитивными нарушениями, а также альфа-талассемией. Патогенные варианты в гене *ATRX* вызывают разнообразные изменения в характере метилирования ДНК, что может объяснить патогенетическую связь между ремоделированием хроматина, метилированием ДНК и экспрессией генов в процессе развития [16].

Согласно данным базы Genomic Data Commons (GDC) Национального института рака США (National Cancer Institute, NCI) (по состоянию на 8 октября 2023 г.), ген *ATRX* входит в 20 генов, в которых наиболее часто возникают соматические мутации при различных видах злокачественных опухолей. Онкогенные соматические варианты в этом гене встречаются при гистогенетически различных опухолях, в том числе при глиомах низкой и высокой степеней злокачественности, остеосаркомах, НБ и нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы. Мутации в гене *ATRX* включают точечные мутации в кодирующих областях и делеции/инсерции со сдвигом рамки считывания, которые приводят к функциональной потере

белка [17]. Помимо обнаруженных точечных мутаций и инделов в гене *ATRX* описаны крупные делеции, приводящие к выпадению нескольких экзонов, не сопровождающиеся сдвигом рамки считывания белка. В дефектных белках отсутствуют несколько важных доменов взаимодействия с хроматином, что способствует развитию агрессивной НБ за счет aberrантной реорганизации хроматина и нарушений регуляции транскрипции [16].

Показано, что делеции и мутации в гене *ATRX* являются отличительными чертами 90 % клеточных линий, immortalized за счет активации альтернативных механизмов поддержания длины теломер (alternative lengthening of telomeres, ALT) [18]. Более того, обнаружено, что мутации в гене *ATRX* являются взаимоисключающими с перестройками в промоторе гена каталитической субъединицы теломеразы (*TERT*), которые увеличивают экспрессию теломеразы и запускают классический путь удлинения теломерных повторов [19, 20]. Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что ген *ATRX* является супрессором ALT и играет большую роль в онкогенезе. При этом исследования *in vitro* продемонстрировали, что выключения функции белка *ATRX* недостаточно для запуска ALT, однако наличие дефекта гена *ATRX* является обязательным условием ALT [21].

Кроме того, одной из функций белка *ATRX* является обеспечение стабильности генома за счет предотвращения образования вторичных структур ДНК (R-петель и G4-квадруплексов), поддержания гетерохроматина теломерных и центромерных локусов, мобильных элементов генома и других регионов «проблемных» для репликации и склонных к образованию вторичных структур. Напротив, *ATRX* поддерживает состояние эухроматина сайтов связывания Zn^{2+} транскрипционных факторов и GC-богатых генов, тем самым он обеспечивает экспрессию последних. Таким образом, *ATRX*-опосредованное поддержание состояний эухроматина или гетерохроматина зависит от геномного контекста. Поддержание повторяющихся областей в гетерохроматическом состоянии имеет решающее значение для предотвращения aberrантной транскрипции, которая чревата развитием репликативного стресса (остановки репликационной вилки) и может угрожать целостности генома [21].

Одной из важнейших функций *ATRX* также является защита клеток от репликационного стресса, опосредованного формированием вторичных структур ДНК, который может блокировать репликацию или транскрипцию, что приводит к коллапсу репликационной вилки. Мутации в гене *ATRX* при НБ увеличивают репликативный стресс и вызывают повреждения ДНК. В свою очередь, повышение уровня белка N-тус вызывает метаболическое перепрограммирование, митохондриальную дисфункцию, выработку активных форм кислорода, которые также способствуют репликативному стрессу и повреждению ДНК. В условиях

модельного эксперимента показано, что стресс репликации ДНК, вызванный инактивацией *ATRX* и амплификацией *MYCN*, несовместим с жизнью клетки (синтетическая летальность). Это редкий случай, когда инактивация гена-супрессора опухоли и активация онкогена несовместимы [16].

Тем не менее в нашей когорте выявлены 2 случая сочетания амплификации гена *MYCN* и делеции гена *ATRX*. Согласно данным литературы, синтетическая летальность может быть преодолена за счет активации генов, снижающих окислительный стресс (*CUX2*), и фармакологических агентов, индуцирующих дифференцировку (ретиноевая кислота) или снижающих уровень продукции активных форм кислорода (N-ацетилцистеин) [22]. Кроме того, два опухолевых субклона с разными генетическими дефектами могут сосуществовать в одной опухоли в рамках внутриопухолевой гетерогенности.

Предложенная S. Ackermann и соавт. патогенетическая классификация НБ предполагает относить к группе высокого риска пациентов, у которых опухолевые клетки приобретают репликативную immortalization за счет канонического или альтернативного пути удлинения теломер. Дополнительное выявление мутаций в генах, кодирующих компоненты сигнальных путей RAS-RAF-MEK и p53, определяет крайне неблагоприятный прогноз и фенотип НБ ультравысокого риска [23]. Сочетание aberrаций в гене *ATRX* с генетическими нарушениями, приводящими к дисфункции указанных выше сигнальных путей, в нашем исследовании также было сопряжено с наивысшим риском развития неблагоприятного события. С учетом большой частоты выявления активирующих мутаций в гене *ALK* среди подростков с НБ интенсификация терапии за счет применения ингибиторов *ALK* представляется оправданной: у 2 пациентов, получавших молекулярно-направленную терапию, не выявлены признаки прогрессирования заболевания при сроке наблюдения, превышающем медиану времени до прогрессирования в нашей когорте больных.

Белок *ATRX* принимает участие в репарации двуниевых разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации. Инактивация гена *ATRX* в клетках опухоли может приводить к развитию феномена, схожего с дефицитом гомологичной рекомбинации, который можно использовать терапевтически [20]. На данный момент нет клинических исследований, подтверждающих результативность молекулярно-направленной терапии опухолей с дефектами *ATRX*. В доклинических исследованиях показана эффективность применения PARP-ингибиторов, особенно в сочетании с ионизирующим излучением, алкилирующими агентами или ингибиторами топоизомеразы [21, 24]. Обсуждается потенциальная роль препаратов, используемых в настоящее время в клинической практике: ингибиторов HDAC, киназы *Aurora* и ингибиторов *EZH2* [24]. Однако механизм их действия при *ATRX*-дефицитных опухолях

носит опосредованный характер; эффективность данных препаратов в клинических исследованиях подтверждена не была. Перспективным представляется применение ингибиторов АТМ для воздействия на опухоль с дефектом *ATRX*. В условиях дефицита гомологичной рекомбинации ответ на двунитевые повреждения ДНК осуществляется за счет оси АТМ–СНК2–p53. Блокирование данного пути может привести к переключению процесса репарации ДНК на нехомологичное объединение концов (nonhomologous end joining), нарастанию геномной нестабильности и синтетической летальности [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клиническое поведение НБ в детском и более старшем возрасте значительно различаются. Для НБ, возникшей в более старшем возрасте, характерно индолентное течение со склонностью к прогрессированию. Биологические особенности и клиническая агрессивность подростковой/взрослой НБ могут быть объяснены репликативной иммортализацией клеток за счет альтернативного пути поддержания длины теломера. Маркером и важным условием реализации данного феномена являются инактивирующие аберрации

в гене *ATRX* (делеции или нуклеотидные варианты), сопровождающиеся экспрессионным репрограммированием, блоком дифференцировки и нарастающей геномной нестабильностью. Дефекты гена *ATRX* могут стать маркером, обеспечивающим объективизацию смены биологии опухоли при переходе от классической НБ раннего возраста к подростковой НБ и важным дифференциально-диагностическим критерием.

Очевидно, что существующие подходы к стратификации пациентов с НБ на группы риска, хорошо зарекомендовавшие себя у больных раннего возраста, неприменимы в возрастной группе старше 10 лет и нуждаются в новой молекулярно-биологической классификации с учетом изменений в гене *ATRX*. Для лечения пациентов старше 10 лет необходимо разработать терапевтические рекомендации, при этом особое внимание должно быть уделено не только интенсификации стандартного лечения, но и применению молекулярно-направленной терапии. В настоящий момент при выявлении соответствующей молекулярно-генетической мишени единственным способом интенсификации классической терапии является применение ингибиторов ALK, эффективность и безопасность которых подтверждена клиническими исследованиями.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. London W.B., Castleberry R.P., Matthay K.K. et al. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2005;23(27):6459–65. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.571
2. Esiashvili N., Goodman M., Ward K. et al. Neuroblastoma in adults: Incidence and survival analysis based on SEER data. *Pediatr Blood Cancer* 2007;49(1):41–6. DOI: 10.1002/pbc.20859
3. Rogowitz E., Babiker H.M., Kanaan M. et al. Neuroblastoma of the elderly, an oncologist's nightmare: case presentation, literature review and SEER database analysis. *Exp Hematol Oncol* 2014;3:20. DOI: 10.1186/2162-3619-3-20
4. Allan S.G., Cornbleet M.A., Carmichael J. et al. Adult neuroblastoma. Report of three cases and review of the literature. *Cancer* 1986;57(12):2419–21. DOI: 10.1002/1097-0142(19860615)57:12<2419::aid-cnrcr2820571228>3.0.co;2-v
5. Mosse Y.P., Deyell R.J., Berthold F. et al. Neuroblastoma in older children, adolescents and young adults: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61(4):627–35. DOI: 10.1002/pbc.24777
6. Друй А.Е., Цаур Г.А., Шориков Е.В. и др. Прогностическое значение амплификации гена *MYCN*, делеции короткого плеча хромосомы 1 и делеции длинного плеча хромосомы 11 у пациентов с нейробластомой. *Педиатр* 2013;4(1):41–8.
7. Druy A.E., Tsaur G.A., Shorikov Ye.V. et al. Prognostic impact of MYCN amplification, 1p deletion and 11q deletion in neuroblastoma patients. *Pediatr = Pediatrician* 2013;4(1):41–8. (In Russ.).
8. Berbegall A.P., Villamón E., Tadeo I. et al. Neuroblastoma after childhood: prognostic relevance of segmental chromosome aberrations, ATRX protein status, and immune cell infiltration. *Neoplasia* 2014;16(6):471–80. DOI: 10.1016/j.neo.2014.05.012
9. Suzuki M., Kushner B.H., Kramer K. et al. Treatment and outcome of adult-onset neuroblastoma. *Int J Cancer* 2018;143(5):1249–58. DOI: 10.1002/ijc.31399
10. Cheung N.K., Zhang J., Lu C. et al. Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA* 2012;307(10):1062–71. DOI: 10.1001/jama.2012.228
11. Казанцев И.В., Геворгян А.Г., Юхта Т.В. и др. Особенности клинического течения и биологических характеристик нейробластомы у подростков и молодых взрослых. Описание серии клинических случаев и обзор литературы. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2020;7(3):13–21.
12. Kazantsev I.V., Gevorgyan A.G., Yukhta T.V. et al. Clinical and biological characteristics of neuroblastoma in adolescents and young adults. Case study and literature review. *Rossiiskij zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2020;7(3):13–21. (In Russ.).
13. Ambros I.M., Brunner B., Aigner G. et al. A multilocus technique for risk evaluation of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2011;17(4):792–804. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0830
14. Lasorsa V.A., Cimmino F., Ognibene M. et al. 19p loss is significantly enriched in older age neuroblastoma patients and correlates with poor prognosis. *NPJ Genom Med* 2020;5:18. DOI: 10.1038/s41525-020-0125-4
15. Conte M., Parodi S., De Bernardi B. et al. Neuroblastoma in adolescents: the Italian experience. *Cancer* 2006;106(6):1409–17. DOI: 10.1002/cncr.21751
16. Ryan A.L., Akinkuotu A., Pierro A. et al. The role of surgery in high-risk neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2020;42(1):1–7. DOI: 10.1097/MPH.0000000000001607
17. Mazzocco K., Defferrari R., Sementa A.R. et al. Genetic abnormalities in adolescents and young adults with neuroblastoma: a report from the Italian Neuroblastoma group. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62(10):1725–32. DOI: 10.1002/pbc.25552
18. Pang Y., Chen X., Ji T. et al. The chromatin remodeler ATRX: role and mechanism in biology and cancer. *Cancers* 2023;15(8):2228. DOI: 10.3390/cancers15082228

17. Wiestler B., Capper D., Holland-Letz T. et al. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol* 2013;126(3):443–51. DOI: 10.1007/s00401-013-1156-z
18. Lovejoy C.A., Li W., Reisenweber S. et al. Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of telomeres pathway. *PLoS Genet* 2012;8:e1002772. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002772
19. Killela P.J., Reitman Z.J., Jiao Y. et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(15):6021–6. DOI: 10.1073/pnas.1303607110
20. Peifer M., Hirtwig F., Roels F. et al. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature* 2015;526(7575):700–4. DOI: 10.1038/nature14980
21. Aguilera P., López-Contreras A.J. ATRX, a guardian of chromatin. *Trends Genet* 2023;39(6):505–19. DOI: 10.1016/j.tig.2023.02.009
22. Zeineldin M., Federico S., Chen X. et al. MYCN amplification and ATRX mutations are incompatible in neuroblastoma. *Nat Commun* 2020;11(1):913. DOI: 10.1038/s41467-020-14682-6
23. Ackermann S., Cartolano M., Hero B. et al. A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science* 2018;362(6419):1165–70. DOI: 10.1126/science.aat6768
24. George S.L., Lorenzi F., King D. et al. Therapeutic vulnerabilities in the DNA damage response for the treatment of ATRX mutant neuroblastoma. *EBioMedicine* 2020;59:102971. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102971
25. Qin T., Mullan B., Ravindran R. et al. ATRX loss in glioma results in dysregulation of cell-cycle phase transition and ATM inhibitor radio-sensitization. *Cell Rep* 2022;38(2):110216. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.110216

Вклад авторов

Н.А. Андреева: написание текста статьи, обзор литературы по теме статьи;
Т.В. Шаманская, Д.Ю. Качанов: научное редактирование;
Н.В. Гегелия, Р.Х. Абасов: анализ и интерпретация данных;
А.Е. Друй: анализ и интерпретация данных, научное редактирование.

Authors' contributions

N.A. Andreeva: article writing, a review of the literature on the topic of the article;
T.V. Shamanskaya, D.Yu. Kachanov: scientific editing;
N.V. Gegeliya, R.H. Abasov: data analysis and interpretation;
A.E. Druy: data analysis and interpretation, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID authors

Н.А. Андреева / N.A. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0001-5626-218X>
Т.В. Шаманская / T.V. Shamanskaya: <https://orcid.org/0000-0002-3767-4477>
Д.Ю. Качанов / D.Yu. Kachanov: <https://orcid.org/0000-0002-3704-8783>
Р.Х. Абасов / R.H. Abasov: <https://orcid.org/0000-0001-9179-8430>
Н.В. Гегелия / N.V. Gegeliya: <https://orcid.org/0000-0001-6208-6557>
А.Е. Друй / A.E. Druy: <https://orcid.org/0000-0003-1308-8622>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке фонда «Наука — детям».

Funding. The study was carried out with the support of the Science for Children Foundation.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен независимым этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the independent ethics committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia.

Статья поступила: 11.12.2023. **Принята к публикации:** 18.03.2024.

Article submitted: 11.12.2023. **Accepted for publication:** 18.03.2024.