

Прогностическое значение наиболее частых цитогенетических перестроек при нейробластоме. Результаты Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Республики Беларусь

И.В. Пролесковская, Е.В. Волочник, В.П. Букат, О.И. Быданов, Н.Е. Конопля

НГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»
Министерства здравоохранения Республики Беларусь; Республика Беларусь, 223053, Минская область,
Минский район, Боровлянский с/с, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43

Контактные данные: Инна Витальевна Пролесковская proleskai@mail.ru

Цель исследования — оценить частоту встречаемости наиболее частых цитогенетических перестроек при нейробластоме (НБ) и их корреляцию с клинико-биологическими характеристиками и исходом терапии в Республике Беларусь.

Материалы и методы. Исследованы 280 пациентов с первично диагностируемой НБ с 10.10.2007 по 01.04.2018. Материалом для исследования послужили первичная опухоль или метастазы опухоли в костный мозг (поражение более 60 %) согласно критериям протокола. Исследование проводилось методом флуоресцентной гибридизации *in situ*.

Результаты. Частота встречаемости таких цитогенетических aberrаций, как MYCN-амплификация (20,1 %), делеция/дисбаланс 11q (19,7 %) и aberrации 1p (28 %) в исследуемой популяции соответствует данным литературы. Частота встречаемости gain 17q (34,5 %) была ниже литературных данных. Статистически достоверно подтверждено негативное влияние на бессобытийную выживаемость (БСВ) пациентов с НБ наличие таких генетических aberrаций в опухоли, как MYCN-амплификация, делеция/дисбаланс 11q, aberrации 1p. Статистически достоверно подтверждены более высокие показатели бессобытийной выживаемости для больных с околотриплоидным набором хромосом в опухоли по сравнению с околотетраплоидным (97 ± 3 % против 63 ± 5 %). Для пациентов, у которых в опухоли отсутствовали структурные aberrации, БСВ составила 75 ± 4 % против 51 ± 9 % в группе с aberrациями ($p < 0,0001$).

Ключевые слова: дети, нейробластома, цитогенетические aberrации, FISH, прогноз

Для цитирования: Пролесковская И.В., Волочник Е.В., Букат В.П., Быданов О.И., Конопля Н.Е. Прогностическое значение наиболее частых цитогенетических перестроек при нейробластоме. Результаты Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Республики Беларусь. Российский журнал детской гематологии и онкологии 2019;6(1):11–9.

Prognostic value of the most frequent cytogenetic rearrangements in neuroblastoma. Results of the Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology of the Republic of Belarus

I.V. Proleskovskaya, E.V. Valochnik, V.P. Bukat, O.I. Bydanov, N.E. Konoplya

Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of the Republic of Belarus; 43 Frunzenskaya St., Borovlyany village, Minsk district, Minsk region, 223053, Republic of Belarus

The purpose of the study is to assess the frequency of occurrence of the most frequent cytogenetic rearrangements in neuroblastoma (NB) and their correlation with clinical and biological characteristics and outcome of therapy in the Republic of Belarus.

Materials and methods. 280 patients with primary diagnosed NB from 10.10.2007 to 01.04.2018 were studied. The material for the study was the primary tumor or tumor metastases in the bone marrow (damage more than 60 %) according to the criteria of the protocol. The study was conducted by the method of fluorescent hybridization *in situ*.

Results. The frequency of occurrence of such cytogenetic aberrations as MYCN amplification (20.1 %), 11q deletion/imbalance (19.7 %) and 1p aberration (28%) in the studied population corresponds to literature data. The frequency of occurrence of gain 17q (34.5 %) was lower than the literature data. The negative effect on event-free survival (EFS) of patients with NB was statistically confirmed and the presence of such genetic aberrations in the tumor, such as MYCN amplification, 11q deletion/imbalance, 1p aberration. Statistically reliably confirmed higher rates of event-free survival for patients with near-triploid set of chromosomes in the tumor, as compared with near-/tetraploid (97 ± 3 % versus 63 ± 5 %). For patients who lacked structural aberrations in the tumor, EFS was 75 ± 4 % versus 51 ± 9 % in the group with aberrations ($p < 0.0001$).

Key words: children, neuroblastoma, cytogenetic aberrations, FISH, prognosis

For citation: Proleskovskaya I.V., Valochnik E.V., Bukat V.P., Bydanov O.I., Konoplya N.E. Prognostic value of the most frequent cytogenetic rearrangements in neuroblastoma. Results of the Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology of the Republic of Belarus. Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology 2019;6(1):11–9.

Информация об авторах

И.В. Пролесковская: к.м.н., доцент, заведующая онкологическим инфекционным (гематологическим) отделением № 2 РНПЦ ДОГИ, e-mail: proleskai@mail.ru
 Е.В. Волочник: научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований РНПЦ ДОГИ, e-mail: valochnikalena@gmail.com
 В.П. Букат: младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований РНПЦ ДОГИ, e-mail: bukat_vera@mail.ru
 О.И. Быданов: ведущий инженер-программист РНПЦ ДОГИ, e-mail: budanov@oncology.by
 Н.Е. Конопля: д.м.н., профессор, заместитель директора по клинической работе РНПЦ ДОГИ, e-mail: n.konoplya@mail.ru

Information about the authors

I.V. Proleskovskaya: Cand. of Sci. (Med.), Docent, Head of Oncological Infectious (Hematology) Department No. 2 Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of the Republic of Belarus, e-mail: proleskai@mail.ru
 E.V. Valochnik: Researcher Laboratory of Molecular Genetic Studies Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of the Republic of Belarus, e-mail: valochnikalena@gmail.com
 V.P. Bukat: Junior Researcher Laboratory of Molecular Genetic Studies Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of the Republic of Belarus, e-mail: bukat_vera@mail.ru
 O.I. Bydanov: Lead Software Engineer Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of the Republic of Belarus, e-mail: budanov@oncology.by
 N.E. Konoplya: Dr. of Sci. (Med.), Professor, Deputy Director of Clinical Work of the Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of the Republic of Belarus, e-mail: n.konoplya@mail.ru

Вклад авторов

И.В. Пролесковская: разработка концепции и дизайна статьи, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, статистическая обработка данных, анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи, составление резюме
 Е.В. Волочник: разработка концепции и дизайна статьи, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных
 В.П. Букат: сбор и обработка данных
 О.И. Быданов: статистическая обработка данных
 Н.Е. Конопля: анализ и интерпретация данных, научная редакция статьи

Authors' contributions

I.V. Proleskovskaya: concept development and article design, data collection and processing, provision of research materials, statistical data processing, data analysis and interpretation, writing the text of the manuscript, composing a resume
 E.V. Valochnik: concept development and article design, data collection and processing, data analysis and interpretation
 V.P. Bukat: data collection and processing
 O.I. Bydanov: statistical data processing
 N.E. Konoplya: data analysis and interpretation, scientific edition of the article

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. / **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки. / **Funding.** The study was performed without external funding.

Введение

Нейробластома (НБ) — опухоль симпатической нервной системы — является наиболее распространенной солидной опухолью экстракраниальной локализации детского возраста. Клинические проявления варьируют от агрессивного злокачественного роста до спонтанной регрессии. Биологическая активность опухоли в частности зависит от цитогенетических характеристик. Так, пациенты, имеющие опухоль с околотриплоидным кариотипом и только с числовыми хромосомными aberrациями, имеют хороший прогноз, тогда как у больных с околодиплоидным или околотетраплоидным кариотипом и структурными хромосомными aberrациями прогноз значительно хуже [1–3].

Наиболее частыми генетическими перестройками при НБ, по данным литературы, являются: амплификация протоонкогена *MYCN*, делеции/дисбаланс 1p или 11q, увеличение копий генетического материала длинного плеча 17-й хромосомы (gain17q) [4]. Наличие этих цитогенетических перестроек в опухоли ассоциируется с плохим прогнозом заболевания. Цитогенетические характеристики опухолевых клеток используют для разделения на терапевтические группы риска, от которых зависит интенсивность используемой терапии. Одним из первых цитогенети-

ческих открытий, связанных с негативным прогнозом для больных НБ, было выявление амплификации гена *MYCN*. Эта цитогенетическая характеристика уже более 30 лет используется для стратификации пациентов по группам риска, и до сих пор является обязательным исследованием при постановке диагноза. Она встречается только в 20–23 % опухолей [5, 6].

Делеция короткого плеча хромосомы 1 была впервые идентифицирована в 1980-х годах в клеточных линиях НБ человека [7]. Данная aberrация наблюдалась при первичных НБ с частотой от 30 до 80 %, была отмечена значительная связь между наличием делеции 1p36 и прогрессированием опухоли [7–9]. Ее роль в качестве неблагоприятного прогностического маркера подтверждена в исследовании на большом числе пациентов.

В ряде исследований была рассмотрена гипотеза о том, что при делеции 1p затрагивается по крайней мере один ген, ассоциированный с НБ. Изучение потери гетерозиготности позволило уточнить область размером менее 1 Мб в хромосомном регионе 1p36.2 [8]. Было выделено несколько кандидатов на роль генов, связанных с развитием НБ, таких как *TP73*, *CDC2L1*, *HKR3*, *DAN*, *PAX7*, *ID3*, *E2F*, *TCB3*, *TNFR2*, *DR3*, *UBE4B/UFD2*, *KIF1B*, *DFFA*, *PGD*, *CORT*, *PEX14* и *ICAT*, расположенных в области делеции или

на минимальной от нее удалении. Однако ни один из них не был идентифицирован как ген НБ [10–12]. Роль данных генов также не была подтверждена в случаях семейных НБ [13].

Статус *MYCN*, 11q и ploидность опухоли недавно были включены в Международную классификацию групп риска НБ (International Neuroblastoma Risk Group, INRG) после обзора базы данных INRG, которая содержит сведения о 8,8 тыс. пациентов с НБ [14].

За последние 10 лет произошел экспоненциальный рост исследований по изучению генетики НБ. Так, gain17q было обнаружено примерно в 70 % [15], а 12q – в 25 % случаях НБ [16]. Делеции 4p [17], 9p [18], 11q [8, 9, 19, 20] и 14q [21] наблюдались с частотами от 20 до 30 %.

Согласно рекомендациям Европейской группы по изучению НБ (International Society of Pediatric Oncology European Neuroblastoma Group, SIOPEN), выделяют 5 основных генетических подтипов НБ: тип А (только числовые aberrации); тип В (структурные aberrации без числовых aberrаций и без *MYCN*); тип С – только *MYCN*-амплификация без числовых aberrаций; тип D (числовые и структурные aberrации без *MYCN*-амплификации); тип Е (*MYCN*-амплификация, сочетанная с числовыми aberrациями). Прогностическое значение данного подхода было оценено в унивариантном анализе при использовании метода Каплана–Майера для 4-летней безрецидивной выживаемости. Так, для типа А она составила 91 ± 3 %, для остальных подтипов (В, С, D, Е) она была значительно ниже – 45 ± 10 %; 39 ± 10 %; $36,5 \pm 8$ %; 37 ± 14 % соответственно ($p = 0,001$) [22–25].

Целью данного исследования было оценить частоту встречаемости наиболее частых цитогенетических перестроек при НБ и их корреляцию с клинико-биологическими характеристиками и исходом терапии у белорусских пациентов.

Материалы и методы

Исследованы 280 пациентов с первично диагностированной НБ, проходивших лечение в ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь в период с 10.10.2007 по 01.04.2018. Диагноз устанавливался в соответствии с критериями протокола NB-2004m. Пациенты получали терапию в соответствии с данным протоколом. Распределение по полу составило: мальчики – 149 (53,2 %), девочки – 131 (46,8 %). Возраст больных варьировал от 4 дней до 10,86 года (медиана – 1,76 года). Распределение по стадиям: 1-я – 55 (19,6 %) пациентов, 2-я – 28 (10 %), 3-я стадия – 71 (25,3 %), 4-я стадия – 115 (41,0 %) больных. Диагноз был верифицирован морфологически.

Материалом для цитогенетического исследования послужили опухолевые клетки, выделенные из фрагментов опухоли или костного мозга (при

поражении более 60 %). Полученные изолированные клетки в дальнейшем отмывались минимальной средой RPMI-1640, культивировались в среде RPMI-1640 с 20 % эмбриональной телячьей сывороткой (24 ч) и фиксировались с помощью раствора Карнуа (ледяная уксусная кислота–метанол в соотношении 3:1). Исследования проводились с использованием зондов на определение хромосомных регионов 1p36.2 (mi-del(1p36) или 1p36/1q25 DC), 2p24/*NMYC* (*NMYC* SO или *NMYC*/cen2 DC), 11q22.3 (*ATM*/cen11 DC) и 17q21.2 (cen17/*TOP2A* DC). Гибридизация осуществлялась в соответствии с инструкцией фирмы-производителя зондов. При недостаточном количестве доставленного материала или сомнительном результате исследования проводились на гистологическом материале (мазки-отпечатки, парафиновые срезы).

При исследовании препарата суспензионной культуры анализировались 100–200 интерфазных ядер (в зависимости от клеточности и наличия клеток с aberrантным расположением сигналов). При исследовании парафинового среза – весь материал на стекле, подсчитывали сигналы минимум 200 клеток, проанализированных в разных областях препарата. В препаратах с очаговым расположением клеток с aberrациями считались минимум 50 клеток. Амплификацией считалось более чем 4-кратное увеличение количества сигналов исследуемого гена по отношению к референсной пробе. При увеличении количества сигналов исследуемой пробы по отношению к количеству сигналов контрольной пробы менее чем в 4 раза статус анализируемого гена/хромосомного региона определялся как “gain”. При определении aberrаций, связанных с потерей анализируемого региона, выделяли 2 типа изменений: делеция – представлена только одним сигналом рассматриваемого хромосомного региона/гена (соотношение сигналов контрольного региона к анализируемым сигналам 2:1, 3:1) и дисбаланс – выявлена диспропорция сигналов, при этом количество сигналов исследуемого региона не менее 2 (соотношение 3:2, 4:2, 4:3 и т. д.). Если количество копий исследуемого гена/хромосомного региона соответствовало количеству сигналов контрольного региона, то статус определялся как отрицательный. В случае нахождения метафазных пластинок в препарате данные интерфазного метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) дополнялись метафазным FISH, уточнялось модальное число (весь материал, доставляемый в лабораторию, верифицировался морфологически).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica для Windows XP Professional. Для оценки достоверности различий были использованы χ^2 -тест и тест Манна–Уитни. Построение кривых выживаемости осуществлялось по методу Каплана–Майера, их сравнение – с использованием log-rank test. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Методом FISH оценивались такие наиболее часто встречающиеся цитогенетические изменения при НБ, как: *MYCN*-амплификация, aberrации 1p36.2 (делеция и дисбаланс), aberrации 11q22.3 (делеция и дисбаланс), увеличение генетического материала 17q (gain17q).

***MYCN*-амплификация**

Наличие aberrаций *MYCN* определялось у 274 пациентов, из них *MYCN*-амплификация выявлена у 55 (20,1 %) (рис. 1). Частота встречаемости данной aberrации соответствует данным литературы [5, 6].

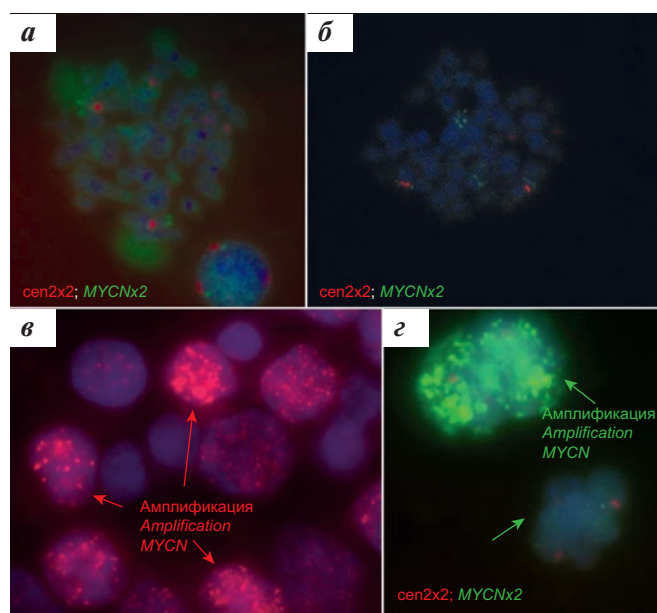


Рис. 1. Исследование статуса *MYCN* методом FISH: а – метафазная пластинка и интерфазные ядра клеток НБ с отсутствием aberrаций *MYCN* (красным цветом отмечена проба, специфичная центромере 2; зеленым – проба, специфичная гену *MYCN*); б – метафазная пластинка с gain *MYCN* (на интерфазном методе FISH как: *nuc ish cen2(D2Z1 × 2), 2p24(MYCN × 2)*); в – интерфазные ядра с амплификацией *MYCN* с использованием одноцветного зонда; г – интерфазные ядра с амплификацией *MYCN* с использованием двухцветного зонда (красным цветом отмечена проба, специфичная центромере 2; зеленым – проба, специфичная гену *MYCN*)

Fig. 1. Study of *MYCN* status using the FISH method: а – metaphase plate and interphase nuclei of NB cells with no *MYCN* aberrations (the sample specific for centromere 2 is marked in red; the sample specific for *MYCN* gene is marked in green); б – metaphase plate with gain *MYCN* (on the interphase FISH method as: *nuc ish cen2(D2Z1 × 2), 2p24(MYCN × 2)*); в – interphase nuclei with *MYCN* amplification using a single-color probe; г – interphase nuclei with *MYCN* amplification using a two-color probe (the sample specific to the centromere 2 is marked in red; the sample specific to the *MYCN* gene is marked in green)

В таблице представлена клиническая характеристика исследуемой группы.

Наличие *MYCN*-амплификации достоверно чаще наблюдалось при 4-й стадии заболевания ($p < 0,0001$). Среди пациентов, имевших *MYCN*-амплификацию, достоверно чаще встречались больные старше 1 года на момент постановки диагноза ($p = 0,0017$), что является известным прогностически неблагоприятным фактором при НБ.

Выживаемость оценивалась у протокольных и наблюдаемых пациентов в рамках протокола (данные по каждой aberrации см. в таблице). Пациенты, отказавшиеся от проведения протокольного лечения либо уехавшие продолжать терапию за рубежом, исключались из анализа выживаемости. Для оценки влияния генетических aberrаций на прогноз заболевания из анализа исключались также смерти пациентов, связанные с терапией.

Так, ОВ больных с *MYCN*-амплификацией ($n = 46$) составила 39 ± 11 % против 82 ± 3 % у пациентов без нее ($n = 194$); $p < 0,0001$. БСВ больных с *MYCN*-амплификацией ($n = 46$) составила 39 ± 8 %, против 79 ± 4 % у пациентов без нее ($n = 194$); $p < 0,0001$. Это согласуется с данными мировой литературы, говорящими о неблагоприятном прогностическом влиянии данного генетического события.

Аберрации 1p

Исследование статуса 1p36 проводилось у 247 пациентов, из них в 40 (16,2 %) случаях были выявлены aberrации 1p36 (делеции или дисбаланс) (рис. 2). По данным литературы, частота встречаемости данного генетического события выше и оставляет около 20–40 % всех НБ [9–11]. В нашем исследовании при оценке клинической значимости aberrаций 1p в анализируемую группу вошли и случаи с делецией, и случаи с дисбалансом 1p/q (далее как aberrации 1p или del/imblp).

Сочетание aberrаций 1p с *MYCN*-амплификацией встречалось у 25 (10,1 %) из 247 пациентов. Это является довольно частым описанным феноменом. Так как *MYCN*-амплификация – более мощный прогностически неблагоприятный фактор, то для оценки влияния именно del/imblp на прогноз заболевания исследовалась группа пациентов только с изменением 1p ($n = 15$) и без нее ($n = 150$) (см. таблицу).

Наличие aberrаций 1p достоверно чаще наблюдалось при 4-й стадии заболевания ($p = 0,0009$). Среди пациентов, имевших aberrации 1p, достоверно чаще встречались дети старше 1 года на момент постановки диагноза ($p = 0,0190$), что является известным прогностически неблагоприятным фактором.

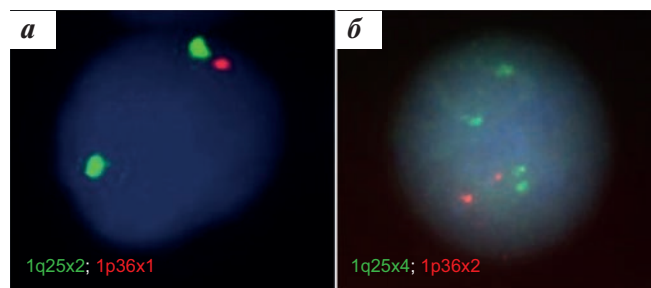


Рис. 2. Клетки НБ с aberrациями хромосомного локуса 1p36: а – делеция локуса 1p36 (зеленым цветом отмечена проба, специфичная контрольному; соотношение 2:1); б – дисбаланс 1p/1q; соотношение сигналов контрольного региона к исследуемому – 4:2

Fig. 2. NB cells with aberrations of the chromosomal locus 1p36: а – deletion of the locus 1p36 (a sample specific to the control region 1q25 is marked in green; a sample specific to the region 1p36 is marked in red; ratio 1:2); б – 1p/1q imbalance; the ratio of the signals of the control region to the study – 4:2

Клиническая характеристика и результаты терапии НБ в зависимости от прогностически значимых цитогенетических aberrаций
Clinical characteristics and results of NB therapy depending on prognostically significant cytogenetic aberrations

Клинические параметры Clinical parameters	Прогностически значимые aberrации при НБ Prognostic significant aberrations in NB											
	MUCN+	MUCN–	p	есть del/imb 1p	нет del/imb 1p	p	есть del/imb 11q	нет del/imb 11q	p	есть gain 17q	нет gain 17q	p
Стадия Stage	n = 55	n = 219		15	150		14	54		23	45	
1-я	3	50		0	38		1	19		6	15	
2-я	4	24		1	18		0	8		3	6	
3-я	9	61		3	42		3	14		8	5	
4-я	39	74	< 0,0001	11	46	0,0009	10	13	0,0008	6	19	0,1917
4s	0	10		0	10		0	0		0	0	
Возраст, дни Age, days (медиана (интервал)) (median (interval))	837 (97–2815)	597 (4–4330)		1040 (218–2173)	474 (4–3767)		1186 (97–2173)	422 (4–2627)		493 (34–2029)	731 (4–2627)	
До 1 года Up to 1 year	17	85	0,0017	17	67	0,019	0	26	0,001	11	15	0,2443
Выживаемость у протокольных и наблюдаемых пациентов, n* Survival in protocol and observed	n = 39	n = 146		n = 13	n = 137		n = 13	n = 50		n = 21	n = 42	
Общая выживаемость (ОВ) Overall survival	39 ± 11 %	83 ± 3 %	0,0001	69 ± 20 %	81 ± 5 %	0,1920	71 ± 17 %	97 ± 3 %	0,0749	100 %	91 ± 6 %	0,5270
Бессобытийная выживаемость (БСВ) Event-free survival	39 ± 8 %	79 ± 4 %	< 0,0001	0 %	78 ± 4 %	0,0104	0	89 ± 6 %	0,0569	89 ± 7 %	43 ± 31 %	0,2910

Примечание. * — протокольные (полностью соответствуют критериям включения в протокол) и наблюдаемые пациенты (зарегистрированные в исследовании, если они имели отклонения в терапии, не предусмотренные исследованием и не обусловленные побочными действиями лечения и/или осложнениями заболевания; имеется тяжелое сопутствующее заболевание, которое затрудняет лечение по протоколу; отсутствие важных исходных данных, необходимых для точного проведения цитостатического лечения в соответствии с протоколом).

Note. * — protocol (fully meet the criteria for inclusion in the protocol) and the observed patients (registered in the study if they had deviations in therapy, not covered by the study and not due to side effects of treatment and / or complications of the disease; there is a serious concomitant disease that makes it difficult to treat protocol, the absence of important baseline data necessary for the accurate conduct of cytostatic treatment in accordance with the protocol).

Так, ОВ пациентов с абберациями 1p ($n = 13$) составила 69 ± 20 % против 81 ± 5 % у больных без них ($n = 137$); $p = 0,1920$. БСВ пациентов с абберациями 1p ($n = 13$) была 0 % против 78 ± 4 % у больных без них ($n = 137$); $p = 0,0104$.

Абберации 11q

Исследование статуса 11q методом FISH проводилось у 81 пациента, из них в 16 (19,7 %) случаях была выявлена потеря региона 11q22.3 по отношению к центромере 11-й хромосомы (делеция или дисбаланс 11q) (рис. 3). В нашем исследовании оба события вошли в одну группу с наличием аббераций 11q (далее del/imb11q). Полученные результаты соответствуют литературным данным о частоте встречаемости данной абберации (от 20 до 30 %) [22–24]. Сочетание MYCN-амплификации и делеции 11q наблюдалось всего у 2 (2,5 %) пациентов, что также соответствует данным литературы и может быть связано с различными путями развития MYCN-позитивных и 11q-позитивных опухолей.

Так как MYCN-амплификация — более мощный прогностически неблагоприятный фактор, то для оценки влияния именно аббераций 11q на прогноз заболевания исследовалась группа пациентов только с изолированной del/imb11q ($n = 14$) и без нее ($n = 54$) (см. таблицу).

Наличие del/imb11q достоверно чаще наблюдалось при 4-й стадии заболевания ($p = 0,0008$). Среди пациентов, имевших абберации 11q, достоверно чаще встречались дети старше 1 года на момент постановки диагноза — 14 из 14 против 28 из 54 ($p = 0,001$).

Так, ОВ пациентов с del/imb11q ($n = 13$) составила 71 ± 17 % против 97 ± 3 % у больных без нее ($n = 50$); $p = 0,0749$. БСВ пациентов с del/imb11q ($n = 13$) была 0 % против 89 ± 6 % у больных без нее ($n = 50$); $p = 0,0569$. По данным литературы, наличие этой генетической абберации является неблагоприятным

фактором прогноза. По нашим данным, имеется тенденция к неблагоприятному прогнозу, отсутствие достоверности, возможно, связано с малым числом пациентов и небольшим сроком наблюдения.

Gain17q

Определение статуса длинного плеча 17-й хромосомы проведено у 81 пациента, из них у 28 (34,5 %) найден gain17q (рис. 4). По данным литературы, частота встречаемости данного феномена иногда достигает 70 % [4, 19].

Сочетание MYCN-амплификации и gain17q встречалось у 4 (4,9 %) пациентов. Так как MYCN-амплификация — более мощный прогностически неблагоприятный фактор, то для оценки влияния именно gain17q на прогноз заболевания исследовалась группа пациентов только с gain17q ($n = 23$) и без нее ($n = 45$) (см. таблицу).

Наличие gain17q встречалось как при 4-й стадии заболевания, так и при локальных стадиях — 6 из 23 против 19 из 45 по 4-й стадии ($p = 0,1917$). Различий по возрасту между группами найдено не было — возраст до 1 года: 11 из 23 против 15 из 45 ($p = 0,2443$).

Так, ОВ пациентов с gain17q ($n = 21$) составила 100 % против 91 ± 6 % у больных без нее ($n = 42$); $p = 0,5270$. БСВ пациентов с gain17q ($n = 21$) составила 89 ± 7 % против 43 ± 31 % у больных без нее ($n = 42$); $p = 0,5910$. Таким образом, прогностического значения данной перестройки для исследуемой группы нами не выявлено.

Пloidность

Широко известным прогностическим фактором является ploidy опухолевых клеток. Прогностически благоприятным фактором служит наличие триплоидного набора хромосом в опухоли, неблагоприятным — ди-/тетраплоидного [19]. В нашем исследовании методом FISH определялась примерная

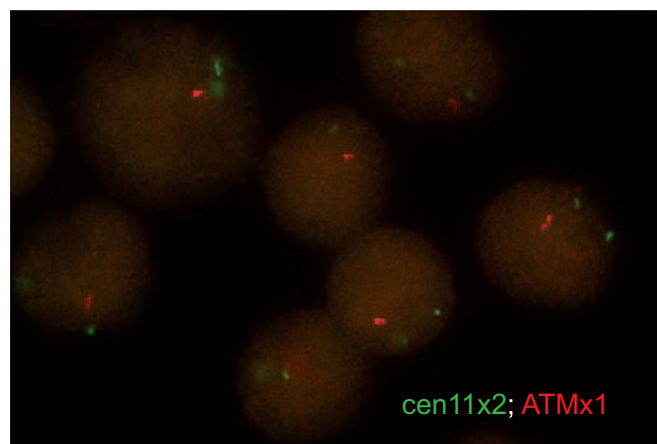


Рис. 3. Клетки НБ с делецией хромосомного региона 11q22.3 (ген ATM). Зеленым цветом отмечена проба, специфичная контрольному региону центромеры 11, красным цветом — проба, специфичная региону 11q22.3; соотношение — 2:1

Fig. 3. NB cells with a deletion of the chromosomal region 11q22.3 (ATM gene). The sample specific to the control region of the centromere 11 is marked in green, the sample specific to the region 11q22.3 is marked in red; ratio — 2:1

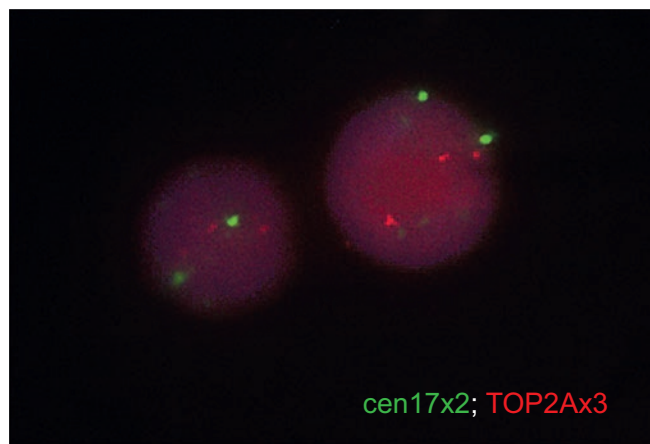


Рис. 4. Клетки НБ с gain17q; зеленым цветом отмечена проба, специфичная контрольному региону центромеры 17, красным цветом — проба, специфичная хромосомному региону 17q21.2 (ген TOP2A); соотношение — 2:3

Fig. 4. NB cells with gain17q; the sample specific to the control region of the centromere 17 is marked in green, the sample specific to the chromosomal region of the region 17q21.2 (TOP2A gene) is marked in red; ratio — 2:3

плоидность клеток (учитывалось количество сигналов используемых зондов), она была выставлена у 176 пациентов, из них околодиплоидных было 137 (77,8 %), околотриплоидных – 39 (22,1 %). Чем большее количество проб используется при исследовании – тем более достоверными будут полученные данные. Однако данный метод позволяет определить примерную плоидность далеко не во всех случаях.

Пациенты, относящиеся к группе околотриплоидных, были достоверно младше по возрасту (до 1 года 23 из 39 против 30 из 137; $p < 0,0001$), среди них достоверно реже встречались больные с 4-й стадией болезни (4 из 39 против 73 из 137; $p < 0,0001$). Также среди них не было пациентов с *MYCN*-амплификацией (0 из 39 против 30 из 137; $p = 0,0007$).

Так, ОВ больных с триплоидным набором хромосом ($n = 37$) составила 100 % против 64 ± 5 % у пациентов с дитетраплоидным набором ($n = 119$); $p = 0,0004$. БСВ больных с триплоидным набором хромосом ($n = 37$) составила 97 ± 3 % против 63 ± 5 % у пациентов с дитетраплоидным набором ($n = 119$); $p < 0,0001$.

Прогностическое значение структурных и числовых хромосомных aberrаций

Если разделить наших пациентов по предлагаемому в последнее время критерию группы SIOPEN с наличием структурных aberrаций [23, 25] и без них, используя только метод FISH и определяя упомянутые aberrации, то группа с наличием структурных aberrаций имеет достоверно более низкую БСВ по сравнению с группой больных без них (рис. 5).

Согласно данным, полученным в нашей работе, мы предлагаем следующий алгоритм стратификации пациентов с НБ на основе цитогенетических характеристик опухоли по группам риска (рис. 6).

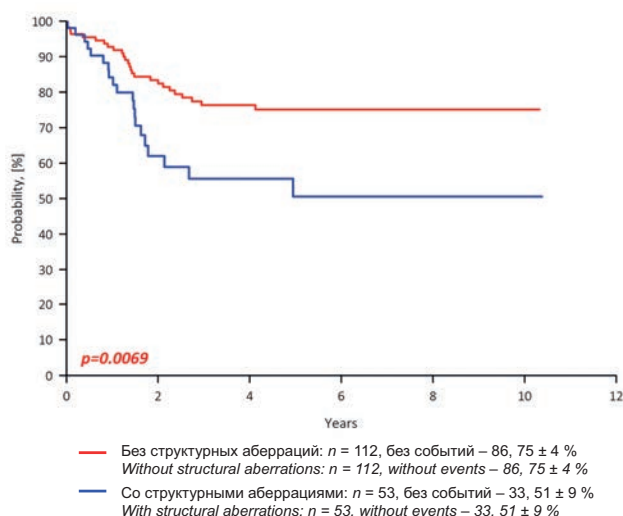


Рис. 5. БСВ пациентов с НБ в зависимости от наличия структурных aberrаций в опухоли

Fig. 5. Event-free survival of patients with NB depending on the presence of structural aberrations in the tumor

Обсуждение

Наши результаты по исследованию такого феномена, как *MYCN*-амплификация, и по частоте встречаемости в популяции, и по прогностическим характеристикам полностью согласуются с данными мировой литературы [5, 6]. Это, вероятно, свидетельствует об адекватном методе детекции данной перестройки и еще раз подтверждает, что метод FISH является мировым стандартом для определения *MYCN*-амплификации.

Низкий процент выявляемости aberrаций 1p за весь период исследования может быть связан с несколькими факторами. Во-первых, это изначальный выбор зонда для проведения анализа. До 2013 г. для детекции данной aberrации применялся трехцветный зонд *mi-del(1p36)*, который позволял определять только делецию 1p36 с использованием имеющихся в Центре двухцветных фильтров. Дисбаланс 1p/q в таком случае не детектировался. С 2013 г. начал использоваться двухцветный зонд 1p36 SO/1q25 SG, позволяющий определить и делецию, и дисбаланс в данных случаях. При подсчете частоты встречаемости *del/imblp36* с 06.2013 г. по 09.2018 г. частота встречаемости aberrаций 1p составила 28 % (33/118). Во-вторых, возможна недостаточная диагностика методом FISH в связи с тем, что с его помощью исследуется ограниченное количество локусов на хромосоме (обычно это локус 1p36 и контрольный 1q25). При использовании других методов (например, MLPA) исследуется большее число хромосомных регионов (8 генов на коротком плече хромосомы 1 и 4 гена на длинном ее плече), что позволяет выявить изменения в регионах, не захватываемых зондами FISH. Также возможна выдача ложноотрицательных вариантов и в случае диагностики на парафиновых срезах (если aberrантный клон меньше 30 % и клетки с aberrацией располагаются не очагово), мазках-отпечатках (плохо сделаны отпечатки), малом количестве доставленного материала или низкой клеточности образца (недостаточно клеток для выявления субклональных изменений) или при доставке неинформативного опухолевого материала (если забор материала был проведен вслепую, без контроля цитолога, возможна доставка материала с низким содержанием опухолевых клеток или вообще без нейробластов).

Частота встречаемости aberrаций 11q в Республике Беларусь и их сочетание с другими хромосомными aberrациями соответствуют литературным данным [19, 20]. У нас имеется выраженная тенденция к негативному прогностическому влиянию на выживаемость больных, имеющих данную перестройку, отсутствие статистической достоверности, вероятно, связано с небольшим числом пациентов.

Недостаточно высокая частота встречаемости *gain17q* может быть обусловлена высокой вариабельностью aberrаций 17-й хромосомы, вследствие чего недостаточно использования одного зонда (необходимо ставить дополнительные пробы на специфичные локусы короткого плеча 17-й хромосомы, другие регионы длинного плеча (более дистальные)). Также методом FISH невозможно оценить кластерную дупликацию,

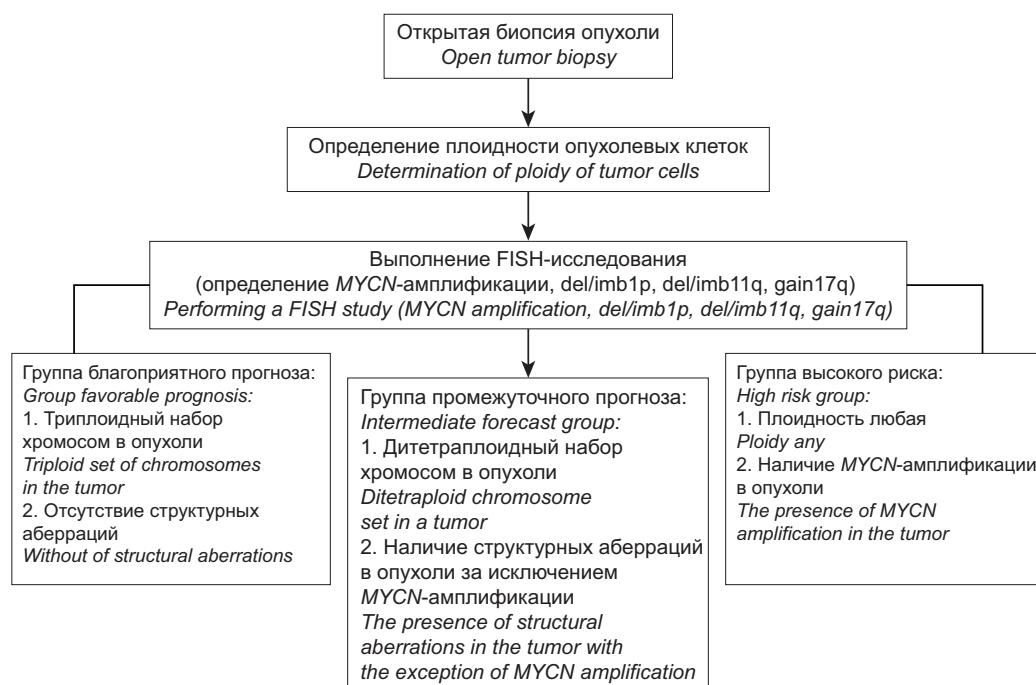


Рис. 6. Алгоритм стратификации пациентов с НБ на основе цитогенетических характеристик опухоли по группам риска

Fig. 6. Algorithm of stratification of patients with NB based on the cytogenetic characteristics of the tumor by risk groups

трипликацию. Учитывая вышеизложенное, оптимальным для определения gain17q будет являться использование молекулярно-генетических методов [25].

По ряду литературных данных, наличие gain17q является неблагоприятным фактором прогноза. Также имеется ряд публикаций, в которых отрицалась независимая прогностическая значимость данной aberrации. По нашим данным, прогностического значения данной aberrации при НБ у детей не выявлено, что может быть связано как с отсутствием независимой прогностической значимости данного фактора для нашей группы пациентов, так и с малым количеством проанализированных образцов или недостаточным сроком наблюдения.

Предложенный нами алгоритм стратификации по группам риска пациентов с НБ на основе цитогенетических характеристик опухоли должен использоваться в комплексе с сочетанием клинических, визуализирующих и морфологических данных для определения терапевтической тактики.

Согласно современным представлениям геномные микрочипы (CGH, SNP) являются хорошими инструментами для анализа хромосомных перестроек в опухолях. В нескольких исследованиях проанализировали хромосомные aberrации в геноме при НБ [26, 27]. В последнее время исследования с использованием массива CGH для анализа около 500 опухолей выявили 2 генетических класса НБ, по-видимому, связанные с различными механизмами нестабильности [28]. В первый класс вошли опухоли только с числовыми изменениями, без структурных. Данные случаи были ассоциированы с отличными результатами лечения даже у пациентов в возрасте старше 18 месяцев или на стадии продвинутого заболевания. Второй класс

включал опухоли со структурными хромосомными изменениями, в которых делеции 1p, 3p, 11q и 1q, 2p, gain17q были определены как статистически значимые прогностические факторы. Авторы предположили, что любое структурное изменение связано с повышенным риском рецидива [25]. Поэтому создание кооперативных групп для изучения как можно большего количества образцов опухоли с использованием современных технологий является перспективным и актуальным на современном этапе изучения НБ.

Заключение

Частота встречаемости таких цитогенетических aberrаций, как MYCN-амплификация (20,1 %), del/imb11q (19,7 %) и del/imb1p (28 %) в исследуемой популяции соответствует данным литературы. Частота встречаемости gain17q (34,5 %) ниже, чем данные, указанные в литературных источниках, что связано с используемым методом детекции данных aberrаций, количеством и размерами исследуемых локусов, малочисленной выборкой и небольшим сроком наблюдения.

Статистически достоверно подтверждено негативное влияние на БСВ пациентов с НБ наличия таких генетических aberrаций в опухоли, как MYCN-амплификация, del/imb11q, del/imb1p, что согласуется с данными литературы. Статистически достоверно подтверждено благоприятное значение для БСВ наличия околотриплоидного набора хромосом в опухоли по сравнению с околоди-/тетраплоидным (97 ± 3 % против 63 ± 5 %), что соответствует данным литературы. А также наличие опухоли без генетических структурных aberrаций в опухоли достоверно ассоциируется с благоприятным прогнозом (БСВ – 75 ± 4 % против 51 ± 9 %).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Spitz R., Betts D.R., Simon T., Boensch M., Oestreich J., Niggli F.K., Ernestus K., Berthold F., Hero B. Favorable outcome of triploid neuroblastomas: a contribution to the special oncogenesis of neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;167:51–6. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2005.09.001.
- Spitz R., Oberthuer A., Zaparka M., Brors B., Hero B., Ernestus K., Oestreich J., Fischer M., Simon T., Berthold F. Oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization (aCGH) of 90 neuroblastomas reveals aberration patterns closely associated with relapse pattern and outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45(12):1130–42. doi: 10.1002/gcc.20376.
- Brodeur G.M. Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:203–16. doi: 10.1038/nrc1014.
- Schwab M., Westermann F., Hero B., Berthold F. Neuroblastoma: Biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003;4(8):472–80. doi: 10.1016/S1470-2045(03)01166-5.
- Cohn S.L., Tweddle D.A. *MYCN* amplification remains prognostically strong 20 years after its “clinical debut”. *Eur J Cancer* 2004;40:2639–42. doi: 10.1016/j.ejca.2004.07.025.
- Lau D.T., Flemming C.L., Gherardi S., Perini G., Oberthuer A., Fischer M., Juraeva D., Brors B., Xue C., Norris M.D., Marshall G.M., Haber M., Fletcher J.L., Ashton L.J. *MYCN* amplification confers enhanced folate dependence and methotrexate sensitivity in neuroblastoma. *Oncotarget* 2015;6(17):15510–23. doi: 10.18632/oncotarget.3732.
- Maris J.M., Weiss M.J., Guo C., Gerbing R.B., Stram D.O., White P.S., Hogarty M.D., Sulman E.P., Thompson P.M., Lukens J.N., Matthay K.K., Seeger R.C., Brodeur G.M. Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children’s Cancer Group study. *J Clin Oncol* 2000;18:1888–99. doi: 10.1200/JCO.2000.18.9.1888.
- Mazzocco K., Defferrari R., Sementa A.R., Garaventa A., Longo L., De Mariano M., Rosaria Esposito M., Negri F., Ircolo D., Viscardi E., Luksch R., D’Angelo P., Prete A., Castellano A., Massirio P., Erminio G., Gigliotti A.R., Tonini G.P., Conte M. 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.
- Defferrari R., Mazzocco K., Ambros I.M., Ambros P.F., Bedwell C., Beiske K., Bernard J., Berbegall A.P., Bown N., Combaret V., Couturier J., Erminio G., Gambini C., Garaventa A., Gross N., Haupt R., Kohler J., Jeison M., Lunec J., Marques B., Martinsson T., Noguera R., Parodi S., Schleiermacher G., Tweddle D.A., Valent A., Van Roy N., Vicha A., Villamon E., Tonini G.P. Influence of segmental chromosome abnormalities on survival in children over the age of 12 months with unresectable localised peripheral neuroblastic tumours without *MYCN* amplification. *Br J Cancer* 2015;112(2):290–5. doi: 10.1038/bjc.2014.557.
- Krona C., Ejekär K., Abel F., Kogner P., Bjelke J., Björk E., Sjöberg R., Martinsson T. Screening for gene mutations in a 500 kb neuroblastoma tumor suppressor candidate region in chromosome 1p: mutation and stage-specific expression in UBE4B/UFD2. *Oncogene* 2003;22:2343–51. doi: 10.1038/sj.onc.1206324.
- Maris J.M., Guo C., Blake D., White P.S., Hogarty M.D., Thompson P.M., Rajalingam V., Gerbing R., Stram D.O., Matthay K.K., Seeger R.C., Brodeur G.M. Comprehensive analysis of chromosome 1p deletions in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:32–6. doi: 10.1002/1096-911X(20010101)36:1<32::AID-MPO1009>3.0.CO;2-O.
- White P.S., Thompson P.M., Seifried B.A., Sulman E.P., Jensen S.J., Guo C., Maris J.M., Hogarty M.D., Allen C., Biegel J.A., Matisse T.C., Gregory S.G., Reynolds C.P., Brodeur G.M. Detailed molecular analysis of 1p36 in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:37–41. doi: 10.1002/1096-911X(20010101)36:1<37::AID-MPO1010>3.0.CO;2-L.
- Maris J.M., Kyemba S.M., Rebbeck T.R., White P.S., Sulman E.P., Jensen S.J., Allen C., Biegel J.A., Yanofsky R.A., Feldman G.L., Brodeur G.M. Familial predisposition to neuroblastoma does not map to chromosome band 1p36. *Cancer Res* 1996;56(15):3421–5. PMID: 8758905.
- Cohn S.L., Pearson A.D., London W.B., Monclair T., Ambros P.F., Brodeur G.M., Faldum A., Hero B., Ichihara T., Machin D., Mosseri V., Simon T., Garaventa A., Castel V., Matthay K.K.; INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009;27(2):289–97. doi: 10.1200/JCO.2008.16.6785.
- Cunsolo C.L., Bicocchi M.P., Petti A.R., Tonini G.P. Numerical and structural aberrations in advanced neuroblastoma tumors by CGH analysis; survival correlates with chromosome 17 status. *Br J Cancer* 2000;83:1295–300. doi: 10.1054/bjoc.2000.1432.
- Bown N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol* 2001;54:897–910. PMID: 11729208.
- Perri P., Longo L., Cusano R., McConville C.M., Rees S.A., Devoto M., Conte M., Ferrara G.B., Seri M., Romeo G., Tonini G.P. Weak linkage at 4p16 to predisposition for human neuroblastoma. *Oncogene* 2002;21:8356–60. doi: 10.1038/sj.onc.1206009.
- Giordani L., Iolascon A., Servedio V., Mazzocco K., Longo L., Tonini G.P. Two regions of deletion in 9p22–p24 in neuroblastoma are frequently observed in favorable tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;135(1):42–7. doi: 10.1016/S0165-4608(01)00640-9.
- Mosse Y., Greshock J., King A., Khazi D., Weber B.L., Maris J.M. Identification and high-resolution mapping of a constitutional 11q deletion in an infant with multifocal neuroblastoma. *Lancet Oncol* 2003;4(12):769–71. PMID: 14662434.
- Spitz R., Hero B., Ernestus K., Berthold F. Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:52–8. PMID: 12538451.
- Thompson P.M., Seifried B.A., Kyemba S.K., Jensen S.J., Guo C., Maris J.M., Brodeur G.M., Stram D.O., Seeger R.C., Gerbing R., Matthay K.K., Matisse T.C., White P.S. Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:28–31. doi: 10.1002/1096-911X(20010101)36:1<28::AID-MPO1008>3.0.CO;2-O.
- Michels E., Vandesompele J., De Preter K., Hoebeek J., Vermeulen J., Schramm A., Molenaar J.J., Menten B., Marques B., Stallings R.L., Combaret V., Devalck C., De Paepe A., Versteeg R., Eggert A., Laureys G., Van Roy N., Speleman F. Array CGH-based classification of neuroblastoma into genomic subgroups. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46(12):1098–108. doi: 10.1002/gcc.20496.
- Michels E., Vandesompele J., Hoebeek J., Menten B., De Preter K., Laureys G., Van Roy N., Speleman F. Genome-wide measurement of DNA copy number changes in neuroblastoma: dissecting amplicons and mapping losses, gains and breakpoints. *Cytogenet Genome Res* 2006;115(3–4):273–82. doi: 10.1159/000095924.
- Uryu K., Nishimura R., Kataoka K., Sato Y., Nakazawa A., Suzuki H., Yoshida K., Seki M., Hiwatari M., Isobe T., Shiraishi Y., Chiba K., Tanaka H., Miyano S., Koh K., Hanada R., Oka A., Hayashi Y., Ohira M., Kamijo T., Nagase H., Takimoto T., Tajiri T., Nakagawara A., Ogawa S., Takita J. Identification of the genetic and clinical characteristics of neuroblastomas using genome-wide analysis. *Oncotarget* 2017;8(64):107513–29. doi: 10.18632/oncotarget.22495.
- Schleiermacher G., Mosseri V., London W.B., Maris J.M., Brodeur G.M., Attiyeh E., Haber M., Khan J., Nakagawara A., Speleman F., Noguera R., Tonini G.P., Fischer M., Ambros I., Monclair T., Matthay K.K., Ambros P., Cohn S.L., Pearson A.D.J. Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project. *Brit J Cancer* 2012;107:1418–22. doi: 10.1038/bjc.2012.375.
- Chen Q.R., Bilke S., Khan J. High-resolution cDNA microarray-based comparative genomic hybridization analysis in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2005;228:71–81. doi: 10.1016/j.canlet.2004.12.056.
- Chen Q., Bilke S., Wei J.S., Whiteford C.C., Cenacchi N., Krasnoselsky A.L., Greer B.T., Chang-Gue S., Westermann F., Berthold F., Schwab M., Catchpole D., Khan J. cDNA array-CGH profiling identifies genomic alterations specific to stage and *MYCN*-amplification in neuroblastoma. *BMC Genomics* 2004;5:70. doi: 10.1186/1471-2164-5-70.
- Mosse Y.P., Diskin S.J., Wasserman N., Rinaldi K., Attiyeh E.F., Cole K., Jagannathan J., Bhambhani K., Winter C., Maris J.M. Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46(10):936–49. doi: 10.1002/gcc.20477.