



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.8.3.015>
УДК 616-006.364-053.2-07:575.224.24



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

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Новая транслокация, установленная методом NGS в материале опухоли у педиатрического пациента с альвеолярной рабдомиосаркомой

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – В.Д. Белобокова, К.О. Кальченко, Т.М. Михалевская, Л.П. Киселев; сбор материала – В.Д. Белобокова, К.О. Кальченко, Т.М. Михалевская, Д.В. Кочубинский; обработка материала и выполнение лабораторного исследования – В.Д. Белобокова, Т.М. Михалевская; обработка данных – В.Д. Белобокова, К.О. Кальченко; написание текста – В.Д. Белобокова, К.О. Кальченко, Т.М. Михалевская, Л.П. Киселев; редактирование – В.Д. Белобокова, Т.М. Михалевская, М.В. Белевцев, Л.П. Киселев.

Подана: 21.07.2022

Принята: 04.09.2022

Контакты: Vika04091995@gmail.com, kse-kalchenko@yandex.ru, aisiat@tut.by, Kotchou_dv2@mail.ru, belevtsev_m@mail.ru, leonslight@mail.ru

Резюме

Результаты современных исследований подтверждают необходимость точных молекулярных исследований мягкотканых новообразований. Высокопроизводительное секвенирование следующего поколения может быть эффективным методом как для подбора таргетной терапии, так и для прогнозирования степени агрессивности биологического поведения опухоли. В данной работе описан случай альвеолярной рабдомиосаркомы у ребенка трехлетнего возраста. В ткани новообразования для данного пациента было проведено молекулярно-генетическое исследование методом высокопроизводительного секвенирования с применением панели генов TruSight™ Tumor 170 (Illumina, США). По результатам исследования была выявлена транслокация NSD1-FGFR4, ранее не описанная в литературе у пациентов с рабдомиосаркомой альвеолярного типа.

Ключевые слова: рабдомиосаркома, альвеолярная рабдомиосаркома, транслокация NSD1-FGFR4, высокопроизводительное секвенирование

Belobokova V., Kalchenko K., Mihaleuskaya T., Kochubinsky D., Belevtsev M., Kisialeu L.
Republican Scientific and Practical Center for Children's Oncology, Hematology
and Immunology, Minsk, Belarus

New Translocation Established by NGS in Tumor Material from a Pediatric Patient with Alveolar Rhabdomyosarcoma

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: research concept and design – Belobokova V., Kalchenko K., Mihaleuskaya T., Kisialeu L.; collection of material – Belobokova V., Kalchenko K., Mihaleuskaya T., Kochubinsky D.; material processing and laboratory research – Belobokova V., Mihaleuskaya T.; data processing – Belobokova V., Kalchenko K.; text writing – Belobokova V., Kalchenko K., Mihaleuskaya T., Kisialeu L.; editing – Belobokova V., Mihaleuskaya T., Belevtsev M., Kisialeu L.

Submitted: 21.07.2022

Accepted: 04.09.2022

Contacts: Vika04091995@gmail.com, kse-kalchenko@yandex.ru, aisiat@tut.by, Kotchou_dv2@mail.ru, belevtsev_m@mail.ru, leonslight@mail.ru

Abstract

The results of modern research confirm the need for accurate molecular studies of soft tissue neoplasms. High-throughput next-generation sequencing can be an effective method for both selecting targeted therapy and predicting the degree of aggressiveness of the biological behavior of a tumor. This paper describes a case of alveolar rhabdomyosarcoma in a three-year-old child. In the tumor tissue for this patient, a molecular genetic study was performed using high-throughput sequencing using the TruSight™ Tumor 170 gene panel (Illumina, USA). The results of the study revealed a translocation of NSD1-FGFR4, which has not been previously described in the literature for patients with alveolar-type rhabdomyosarcoma.

Keywords: rhabdomyosarcoma, alveolar rhabdomyosarcoma, NSD1-FGFR4 translocation, high throughput sequencing

■ ВВЕДЕНИЕ

Рабдомиосаркома (РМС) относится к достаточно часто встречающимся (более половины случаев) злокачественным новообразованиям мягких тканей у пациентов детского возраста. Опухоль развивается из недифференцированных мезенхимальных клеток и отличается быстрым ростом и агрессивным биологическим поведением. Клинические признаки, прогноз и течение болезни у пациентов с рабдомиосаркомой различны и зависят от многих факторов, таких как локализация опухоли, распространенность местного опухолевого процесса, возраст пациента и наличие отдаленных метастазов. Важным критерием для подтверждения диагноза альвеолярной рабдомиосаркомы является наличие транслокации PAX3-FOXO1 или PAX7-FOXO1. Наличие данной транслокации является главным стандартом для подтверждения альвеолярного подтипа рабдомиосаркомы, который в отличие от других вариантов характеризуется неблагоприятным прогнозом и требует более



интенсивных вариантов терапии [1–3]. Ряд авторов отмечают, что в случае отсутствия транслокаций, связанных с FOXP1, пациенты с альвеолярной РМС демонстрируют лучшие клинические исходы, сравнимые с неальвеолярными подтипами новообразования [2]. В то же время остается актуальной проблема поиска новых транслокаций при FOXP1-негативных вариантах альвеолярной РМС с последующей оценкой их взаимосвязи с клиническим поведением опухоли и ответом на проводимую терапию.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Представление ранее не описанного в литературе случая наличия транслокации NSD1-FGFR4 у пациента детского возраста с FOXP1-негативной альвеолярной рабдомиосаркомой.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

У ребенка женского пола в возрасте 3 лет мама обнаружила невыраженный экзофтальм. Ребенок был осмотрен офтальмологом, после чего госпитализирован. В больнице ребенок был осмотрен неврологом, офтальмологом и нейрохирургом. На момент осмотра специалистами у ребенка отсутствовал болевой синдром, а также отсутствовали признаки очаговой симптоматики. На базе больницы была проведена КТ головного мозга и выявлено образование височной доли. Следующим этапом была проведена биопсия образования на базе РНПЦ неврологии и нейрохирургии, после чего для дальнейшей диагностики и лечения ребенок был направлен в Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии. На момент госпитализации в биохимическом анализе крови инициальный уровень ЛДГ составил 866. В костномозговом пунктате атипичные клетки выявлены не были. В ликворе: белок 0,21 г/л, цитоз $2,67 \times 10^9$ /л, эритроциты – 2–5, лимфоциты – 12, нейтрофилы – 1, моноциты – 4, эозинофилы – 2. При осмотре офтальмологом центра были обнаружены начальные проявления застоя диска зрительного нерва на стороне поражения.

По данным сцинтиграфии с Tc99 был выявлен участок патологического накопления радиофармпрепарата в проекции костей лицевого черепа, наружной стенки орбиты, подвисочной ямки слева до 230%.

Ребенку проведено МРТ-исследование. По результатам визуализации МРТ в области верхнелатеральной стенки левой глазницы определяется объемное образование с интраорбитальным (31×18×23 мм) и интракраниальным (43×21×38 мм) распространением, неоднородной структуры в верхних отделах за счет локального жирового вкрапления. Отмечается небольшой экстракраниальный компонент 10×5 мм, параоссалые мягкие ткани левой височной области не резко утолщены, с изменением сигнала на T2-импульсной последовательности, накапливают контрастное вещество. Опухоль оказывает масс-эффект на прилежащие височную и лобную доли головного мозга (рис. 1).

Результаты КТ-исследования свидетельствуют о наличии в левой глазнице объемного образования, широким основанием прилежащего к костным структурам на данном уровне, с местнодеструктивным ростом. Опухоль гиперденсивная (+47–+55 HU) по отношению к мозговой ткани, с четкими неровными наружными

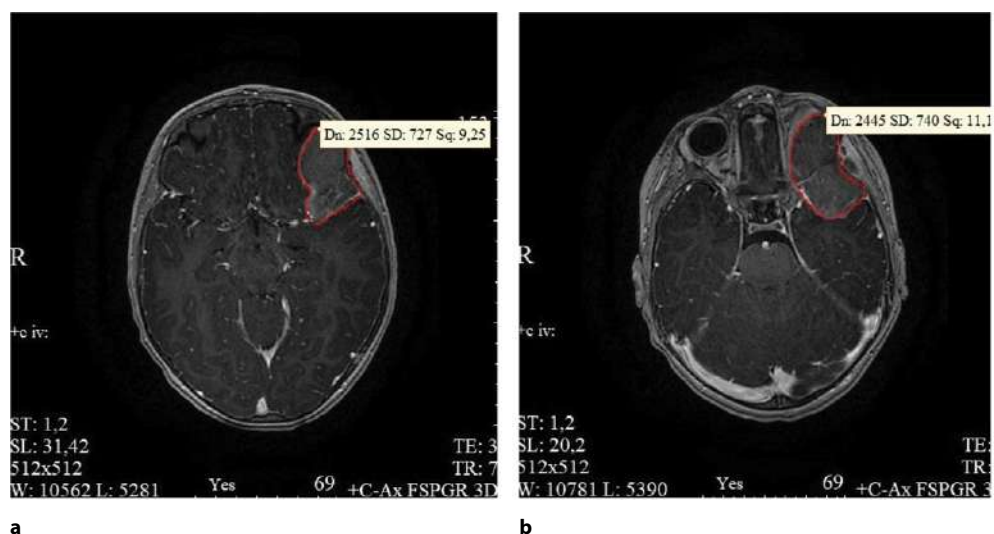


Рис. 1. Результат магнитно-резонансной томографии головного мозга: а – Ax T2-взвешенное изображение TSE, аксиальная проекция; б – режим FSPGR 3D с контрастным усилением, аксиальная проекция. Новообразование мягких тканей глазницы с интракраниальным компонентом с четким краем, умеренно копящее контрастное вещество

Fig. 1. The result of magnetic resonance imaging of the brain: a – Ax T2-weighted TSE image, axial projection; b – mode FSPGR 3D with contrast enhancement, axial projection. Neoplasm of the soft tissues of the orbit with an intracranial component with a clear margin, moderate accumulation of contrast agent

контурами. Костные структуры (левая скуловая, большое крыло клиновидной кости и глазничная часть лобной кости слева) неоднородной структуры за счет деструкции и линейной периостальной реакции.

По результатам биопсии опухоли с гистологическим исследованием выявлена злокачественная низкодифференцированная опухоль с очагово-солидным типом роста. Сосудистая сеть была представлена многочисленными сосудами синусоидного типа, признаки классической сосудистой пролиферации отсутствовали. Очаги некроза отсутствовали. Опухолевые клетки преимущественно являлись мономорфными, округлыми, с крупным округлым ядром с диспергированным хроматином без ядрышек и очень тонким ободком цитоплазмы. Встречались единичные гигантские клетки типа симпластов (рис. 2). Установлена высокая пролиферативная активность – до 8–9 митозов на HPF. При проведении иммуногистохимического исследования с широким спектром антител в опухолевых клетках определялась экспрессия LIN28a, Desmin, Synaptophysin, WT1, Myogenin, CCNB3 и Olig2. При этом экспрессия Myogenin носила диффузный характер. Экспрессия GFAP, CD99, Bcl2, S100, LCA, EMA, PanCK, Oct4 и HMB45 отсутствовала, ядерная экспрессия INI1 была сохранена. Примечательно, что опухолевые клетки экспрессировали антигены Olig2 и Synaptophysin, характерные для нейроэпителиальных опухолей головного мозга. При проведении ПЦР-исследования транскрипты PAX3-FKHR, PAX7-FKHR, SYT-SSX не выявлялись.

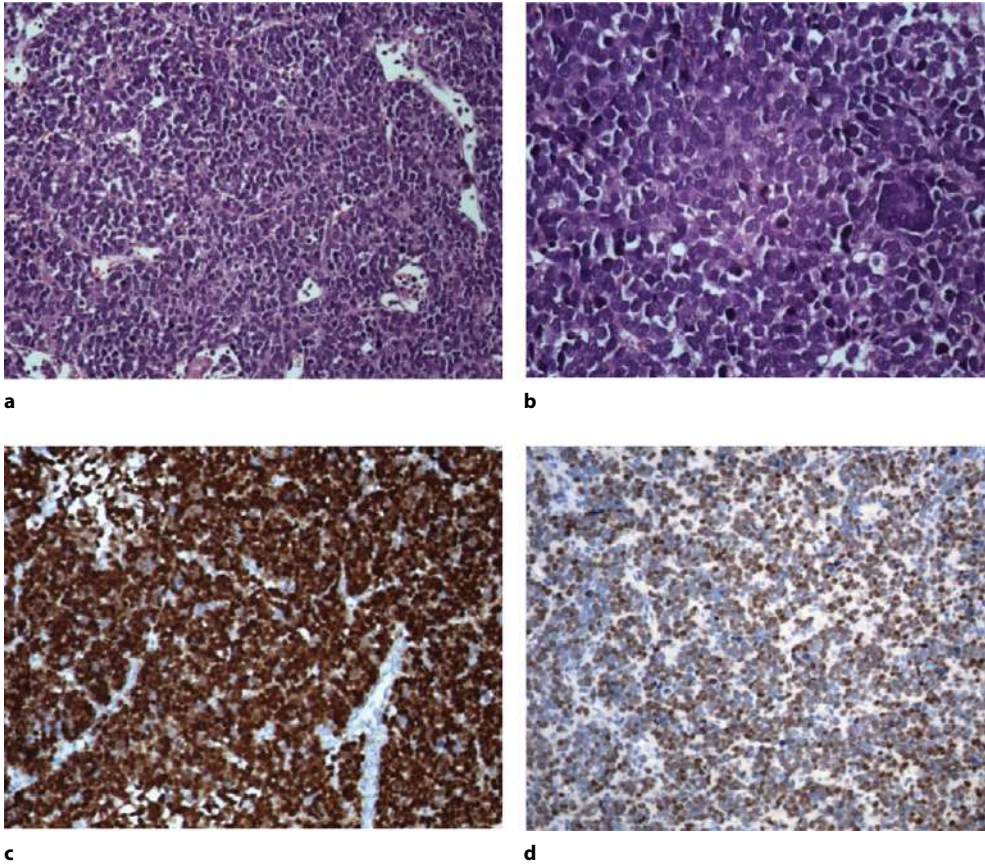


Рис. 2. Гистологическое исследование опухолевой ткани: а – солидные пласты низкодифференцированных клеток, разделенные сосудами синусоидного типа (×100, гематоксилин-эозин); б – среди опухолевых клеток встречаются многоядерные симпласты, частые фигуры митозов (×400, гематоксилин-эозин); в – в иммуногистохимическом окрашивании с антителом к Myogenin – положительное ядерное окрашивание в 100% опухолевых клеток (×200); д – иммуногистохимическое окрашивание с антителом к Olig2 – положительное ядерное окрашивание в 85% опухолевых клеток (×200)

Fig. 2. Histological examination of the tumor tissue: а – solid layers of poorly differentiated cells separated by sinusoid-type vessels (×100, hematoxylin-eosin); б – among tumor cells there are multinuclear symplasts, frequent mitotic figures (×400, hematoxylin-eosin); в – in immunohistochemical staining with antibody to Myogenin – positive nuclear staining in 100% of tumor cells (×200); д – immunohistochemical staining with antibody to Olig2 – positive nuclear staining in 85% of tumor cells (×200)

По результатам первичной диагностики поставлен диагноз: альвеолярная рабдомиосаркома области верхнелатеральных стенок левой глазницы с интраорбитальным и интракраниальным распространением, местнодеструктирующим ростом, масс-эффектом на прилежащие отделы головного мозга с поражением верхнеяремного лимфоузла слева pT3bN1M0, 3-я стадия. Группа очень высокого риска.

Пациент получал лечение согласно протоколу RMS-2005. После 4 блоков полихимиотерапии (IVADo: ифосфамид, винкристин, актиномицин, доксорубицин) отмечалась регрессия интраорбитального компонента до 24×3×15 мм. Интракраниальный компонент достоверно не определяется.

Произведена орбитотомия с удалением опухоли в объеме R1. Гистологическое исследование показало полный патоморфоз опухоли.

Продолжена полихимиотерапия согласно протоколу RMS-2005 (блоки IVA: ифосфамид, винкристин, актиномицин). Учитывая неблагоприятный морфологический вариант и степень резекции опухоли, принято решение о проведении 6 блоков IVA и дистанционной лучевой терапии на место первичной локализации опухоли (СОД 50 Gr). В качестве завершающего этапа терапии пациент получил 6 блоков поддерживающей химиотерапии (VNL + CPM: винорельбин, циклофосфамид). В настоящий момент спустя 9 месяцев пациент находится в ремиссии.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных образцов ДНК и РНК опухолевой ткани ребенка были приготовлены библиотеки с применением наборов реагентов TruSight™ Tumor 170 (Illumina, США) согласно протоколу производителя. Пробоподготовка образцов для высокопроизводительного секвенирования генов, ассоциированных с опухолями мягких тканей (170 генов), включала фрагментирование ДНК, синтез кДНК, фланкирование целевых регионов, лигирование технических последовательностей, гибридизацию зондов, амплификацию фрагментов библиотеки и нормализацию библиотеки. На следующем этапе образцы эквимольно пулировались. С целью достижения оптимального покрытия (более 500 прочтений на один нуклеотид) оптимальным количеством образцов на один запуск прибора является 8 образцов. Денатурация и разведение библиотеки осуществлялись согласно протоколу Illumina Denature and Dilute Libraries Guide for NextSeq System. Высокопроизводительное секвенирование проводили на приборе NextSeq 500 с использованием реагентов NextSeq Reagent Kit V3 (Illumina, США).

В процессе анализа данных высокопроизводительного секвенирования были выполнены поиск и аннотация однонуклеотидных вариантов, коротких инсерций/делеций и перестроек в геноме опухолей. Обработка полученных данных производилась с помощью автоматизированного софта от Illumina – BaseSpace. Для оценки патогенности и консервативности выявляемых генетических вариантов использовали информацию, которую извлекали из следующих баз данных: COSMIC, ClinVar, OMIM. Информация о частоте мутаций получена на основе данных GnomAD.

По результатам анализа нами были обнаружены полиморфизмы в генах TP53, KIT и ALK, которые имеют высокую частоту встречаемости в популяции и не являются патогенными. Отмечено увеличение числа копий гена KRAS, минимально превышающее значение единицы. Транслокации PAX3-FOXO1 или PAX7-FOXO1 не обнаружены, но была найдена ранее не описанная транслокация NSD1-FGFR4, которая включает в себя промотор гена NSD1 и киназный домен гена FGFR4. В качестве контроля найденных вариантов в опухолевой ткани пациента был проанализирован образец здоровой ткани (периферическая кровь). Транслокация NSD1-FGFR4 в здоровой ткани пациента не обнаружена.



Для подтверждения значимости факта обнаружения новой для PMC транслокации были проанализированы актуальные данные литературы. Нам не удалось найти ни одной публикации, в которой бы указывалось на наличие транскрипта NSD1-FGFR4 в ткани альвеолярной рабдомиосаркомы, однако данный транскрипт был описан в ткани немелкоклеточного рака легкого [4].

Существует достаточное количество данных, свидетельствующих об участии в патогенезе рабдомиосаркомы генов NSD1 и FGFR4. Известно, что одной из характерных особенностей альвеолярной рабдомиосаркомы является повышенный уровень экспрессии гена FGFR4 – мембранного белка, рецептора из семейства факторов роста фибробластов. Основываясь на данных последних публикаций, посвященных изучению молекулярного профиля рабдомиосарком, можно заключить, что увеличение экспрессии гена FGFR4 связано непосредственно со стимулирующим влиянием таких транслокаций, как PAX3-FOXO1 либо PAX7-FOXO1, или с наличием амплификации гена FGFR4 [6, 7]. Результаты полноэкзомного секвенирования, по литературным данным, также свидетельствовали о достаточно высокой частоте встречаемости точечных мутаций гена FGFR4 [6]. Активирующие мутации в гене FGFR4 встречаются примерно в 7,5% случаев альвеолярных рабдомиосарком. Чаще всего значимые мутации находятся в позициях 535 и 550 киназного домена. Согласно данным исследования Seki M. и соавт., указанные мутации ассоциированы с более агрессивным течением заболевания и более высокой частотой метастазирования [6]. Экспериментальные исследования свидетельствуют о различной степени значимости генетических нарушений для поддержания опухолевого клона рабдомиосаркомы. В частности, в экспериментальном исследовании Samuel Q. Li и соавт. показано, что трансдукция TEL-FGFR4 позволяет добиться получения культуры клеток PMC. Необходимо отметить большое значение генетических альтераций гена FGFR4 для лечения рабдомиосарком – рецептор тирозинкиназы может быть использован в качестве мишени для таргетной терапии [6].

NSD1 кодирует белки гистоновых метилтрансфераз млекопитающих, принимающих непосредственное участие в регуляции процесса транскрипции. Транслокации NSD1 описаны у пациентов с острым миелобластным лейкозом [8], при гепатоцеллюлярном раке, раке молочной железы [9]; в то же время нарушения в гене NSD1 могут встречаться при синдромах Сотоса и Беквита – Видемана, для которых характерна предрасположенность к развитию рабдомиосарком [10]. Относительно непосредственно PMC заметим, что существует публикация (Chen X. и соавт.) с описанием транслокации при участии данного гена (NSD1), но с другим геном-партнером – NSD1-ZNF346 [7].

Таким образом, обнаруженная транслокация NSD1-FGFR4 не была ранее описана (исходя из наших данных) для случаев с PMC, а приведенные нами данные литературы могут свидетельствовать о наличии онкогенного потенциала у генов-партнеров и позволяют предположить, что NSD1-FGFR4 является патогенной драйверной молекулярной поломкой.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный случай впервые обнаруженной у педиатрического пациента с рабдомиосаркомой транслокации NSD1-FGFR4 позволяет расширить спектр молекулярных нарушений, лежащих в основе развития мягкотканых новообразований.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Qualman S., Lynch J., Bridge J. (2008) Prevalence and clinical impact of anaplasia in childhood rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *Cancer*, vol. 113 (11), pp. 3242–3247.
2. Arnold M.A., Anderson J.R., Gastier-Foster J.M. (2016) Histology, Fusion Status, and Outcome in Alveolar Rhabdomyosarcoma With Low-Risk Clinical Features: A Report From the Children's Oncology Group. *Pediatric Blood and Cancer*, vol. 63 (4), pp. 634–639.
3. Parham D.M., Qualman S.J., Teot L. (2007) Correlation between histology and PAX/FKHR fusion status in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *American Journal of Surgical Pathology*, vol. 31 (6), pp. 895–901.
4. Qin A., Johnson A., Ross J. (2018) Detection of known and novel FGFR fusions in non-small cell lung cancer by comprehensive genomic profiling. *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 14 (1), pp. 54–62.
5. Seki M., Nishimura R., Yoshida K. (2015) Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nature communications*, vol. 6 (1).
6. Samuel Q. Li, Adam T., Cheuk J. (2013) Targeting Wild-Type and Mutationally Activated FGFR4 in Rhabdomyosarcoma with the Inhibitor Ponatinib. *Plos One*, vol. 8 (10).
7. Chen X., Stewart E., Shelat A. (2013) Targeting Oxidative Stress in Embryonal Rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*, vol. 24 (6), pp. 710–724.
8. Wang G., Cai L., Pasillas P., Kamps P. (2007) NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nature Cell Biology*, vol. 9, pp. 804–812.
9. Zhao Q. (2009) Transcriptome-guided characterization of genomic rearrangements in a breast cancer cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, pp. 1886–1891.
10. Baujat G., Rio M., Rossignol S., Sanlaville D. (2004) Paradoxical NSD1 Mutations in Beckwith-Wiedemann Syndrome and 11p15 Anomalies in Sotos Syndrome. *American Journal of Human Genetics, Elsevier (Cell Press)*, vol. 74 (4), pp. 715–720.