

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ
И МЕДИЦИНСКОЙ РАДИОЛОГИИ
ИМ. Н.Н. АЛЕКСАНДРОВА»

Объект авторского права

УДК 616.831-006-033.2-085-84/.089.163 (476)

МАКАРЕВИЧ
Оксана Олеговна

**ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА
И ЛЕЧЕНИЕ РЕТИНОБЛАСТОМЫ У ДЕТЕЙ**

**Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук
по специальности 14.01.12 – онкология**

Минск 2024

Научная работа выполнена в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Научный руководитель: **Конопля Наталья Евгеньевна**, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории противоопухолевой лекарственной терапии государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Официальные оппоненты: **Демешко Павел Дмитриевич**, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории лучевой терапии государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Ушакова Татьяна Леонидовна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник детского онкологического отделения хирургических методов лечения с проведением химиотерапии № 1 (опухолей головы и шеи) НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; профессор кафедры детской онкологии имени академика Л.А. Дурнова ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России

Оппонирующая организация: Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится 18 декабря 2024 г. в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.12.01 при государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (223040, Минский р-н, агр. Лесной, e-mail: N.Artemova@omr.by, тел. +375173899561).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова».

Автореферат разослан 31 октября 2024 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций
доктор медицинских наук, профессор



Н.А. Артемова

ВВЕДЕНИЕ

Ретинобластома (РБ) представляет собой злокачественное новообразование, развивающееся из фоторецепторных клеток сетчатки глаза, и является орфанным заболеванием детского возраста с частотой встречаемости в среднем 1:18 тыс. новорожденных [Вугоју V.V., 2023]. Заболеваемость РБ распределена неравномерно по всему миру: от 0,9 на 1 млн детей в возрасте от 0 до 4 лет в Азии (Катар) [Kooshakzadeh L., 2023] до 42,5 случая на 1 млн – в регионах Африки [Parkin D.M., 1998]. В США регистрируется заболеваемость 12,9 на 1 млн детей в возрасте 0–4 лет. В европейских странах самый низкий показатель заболеваемости в Австрии и Болгарии (3,4 случая на 1 млн детей в возрасте 0–4 лет), самый высокий – в Норвегии, Бельгии и Дании (15 случаев на 1 млн детей в возрасте 0–4 лет) [Fabian I. D., 2020; Kooshakzadeh L., 2023].

Развитие РБ в 40% случаев может быть обусловлено наличием герминального нарушения в гене-супрессоре опухолевого роста *RB1*, в иных случаях заболевание возникает спорадически [Вугоју V.V., 2023]. Генетически обусловленные формы заболевания характеризуются более агрессивным течением, преимущественно билатеральным поражением глаз и требуют разработки особых подходов к диагностике и лечению [Bouchoucha Y., 2023].

Оценка динамики показателей заболеваемости РБ представляет особый интерес, поскольку, наряду с совершенствованием диагностики и тенденцией к органосохраняющему лечению, частота возникновения РБ в развитых странах увеличивается, равно как и доля генетически обусловленных форм заболевания [Abdelazeem B., 2023].

Молекулярно-генетическая диагностика нарушений гена *RB1* необходима для определения кратности осмотра пациентов, находящихся в ремиссии, а также для последующего планирования семьи [Bouchoucha Y., 2023]. При выявлении патогенных нарушений в гене *RB1* становится доступным сравнение с клиническими данными, представленными в генетических базах, с целью сопоставления и определения вероятных трудностей в лечении пациентов с идентичными мутациями (к примеру, высокий риск метакронного возникновения опухоли в парном глазу). Поиск новых вариантов патогенных нарушений и их внесение в базы данных способствуют взаимодействию со специалистами, занимающимися лечением РБ по всему миру. Для генетической диагностики патогенных нарушений гена *RB1* могут быть использованы различные методы, однако не все они применимы в рутинной практике, нет единого алгоритма направления пациентов для генетической диагностики.

В связи с тем, что РБ является орфанным заболеванием, мало исследований проведено на больших когортах пациентов, подходы к лечению и их эффективность также весьма различны и зависят от обеспеченности структурных подразделений клиник необходимым оборудованием, а также от наличия квалифицированных врачей-специалистов (офтальмологов, онкологов, радиационных онкологов, рентгено-эндоваскулярных хирургов). Единого терапевтического плана при различных стадиях заболевания не разработано, при этом современные подходы к лечению широки и могут

включать: системную химиотерапию, суперселективную интраартериальную химиотерапию, интравитреальные инъекции цитостатических препаратов, интракамерные инъекции цитостатических препаратов, криодеструкцию, транспупиллярную термо- и термохимиотерапию, лазерную коагуляцию, брахитерапию, дистанционную лучевую терапию, энуклеацию, аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. Энуклеация является одним из методов, обеспечивающих высокие показатели общей и бессобытийной выживаемости, однако данная операция помимо потери органа зрения и функций глаза, может приводить к развитию анофтальмического синдрома, связанного с ним косметического дефекта, персистирующего воспалительного процесса в конъюнктивальной полости, связанного с использованием протеза. Этапное протезирование в первые месяцы после операции, а также последующая ежегодная замена протеза после проведения энуклеации связаны с постоянной необходимостью вложения финансовых средств. Таким образом, использование и совершенствование органосохраняющих методов лечения пациентов с РБ остается актуальной задачей.

В Республике Беларусь накоплен многолетний опыт оказания медицинской помощи пациентам с РБ, в связи с чем актуальным является проведение глубокого анализа клинико-эпидемиологических данных и результатов лечения пациентов с РБ в сравнительном аспекте применяемых клинических протоколов ОРЕС-ОJЕС, RBL-2003 и RBL-2016 для совершенствования клинической эффективности и поиска новых органосохраняющих подходов без повышения риска прогрессирования заболевания. Разработка алгоритма обследования пациентов с РБ для выявления патогенных нарушений в гене *RB1* также является актуальной задачей для выстраивания четкой модели действий врача при оказании медицинской помощи.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Работа выполнена на базе государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» в рамках научно-исследовательской работы: «Разработать и внедрить метод лечения ретинобластомы с использованием суперселективной интраартериальной химиотерапии» (№ гос. рег. 20221383) государственной научно-технической программы «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг», 2021–2025 гг., подпрограммы «Злокачественные опухоли».

Диссертационное исследование соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 гг., утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 22.04.2015 г. № 166 (пункт 4. Медицина, фармация, медицинская техника: технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний), а также приоритетным направлениям научно-технической и инновационной

деятельности на 2021–2025 гг., утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 г. № 156 (пункт 2. Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: диагностика, медицинская профилактика и лечение инфекционных, включая вирусной этиологии, и неинфекционных заболеваний, экспертиза качества медицинской помощи).

Цель и задачи, объект и предмет исследования

Цель исследования: повысить эффективность органосохраняющего лечения ретинобластомы у детей с использованием локальных методов доставки цитостатических препаратов и определить встречающиеся патогенные нарушения в гене *RB1* у пациентов с ретинобластомой в Республике Беларусь.

Задачи исследования:

1. Изучить динамику показателей заболеваемости ретинобластомой в Республике Беларусь за период с 1997 по 2021 годы.
2. Провести сравнительный анализ эффективности лечения пациентов с ретинобластомой за период 1997–2015 гг. с учетом применяемых клинических протоколов ОРЕС-ОЈЕС и RBL-2003.
3. Разработать и внедрить клинический протокол лечения пациентов с ретинобластомой с редуцированием системной химиотерапии и применением локальных методов доставки цитостатических препаратов (RBL-2016), обеспечивающий высокую эффективность органосохраняющего лечения без повышения риска прогрессирования заболевания.
4. Оценить эффективность разработанного протокола RBL-2016 в сравнении с протоколами ОРЕС-ОЈЕС и RBL-2003.
5. Разработать подход к молекулярно-генетической диагностике патогенных нарушений гена *RB1* (разработка панели олигонуклеотидных праймеров для амплификации и секвенирования регуляторной и кодирующей части гена *RB1*, отработка методов амплификации и секвенирования анализируемого локуса), и разработать алгоритм применения молекулярно-генетических методов у пациентов с ретинобластомой для диагностики генетически обусловленных форм заболевания. Провести анализ герминальных нарушений в гене *RB1*.

Объект исследования: пациенты детского возраста с ретинобластомой (далее – пациенты), проходившие диагностику и лечение в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» с 1997 по 2021 гг.

Предмет исследования: показатели заболеваемости ретинобластомой и результаты лечения пациентов с ретинобластомой в Республике Беларусь за период с 1997 по 2021 гг.; патогенные герминальные нарушения в гене *RB1*.

Научная новизна

1. Впервые проведен клинико-эпидемиологический анализ показателей заболеваемости ретинобластомой за 25-летний период (1997–2021 гг.) в Республике Беларусь, в результате которого выявлена возрастная и территориальная изменчивость заболеваемости ретинобластомой.

2. Впервые разработан, научно обоснован и внедрен метод лечения ретинобластомы с редуцированием системной химиотерапии и применением локальных способов доставки цитостатических препаратов, позволяющий сохранить орган зрения у пациентов с интраокулярной ретинобластомой в $75,7 \pm 6,2\%$ случаев.

3. Впервые внедрена и клинически отработана технология выполнения инъекций в полость стекловидного тела при ретинобластоме.

4. Впервые определен спектр генетических мутаций у пациентов с ретинобластомой и обнаружено 5 новых нарушений, ранее не описанных в международных генетических базах данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Стандартизованный показатель заболеваемости ретинобластомой за период 1997–2021 гг. в Республике Беларусь составляет $0,51 \pm 0,04$ на 100 тыс. населения в возрасте 0–14 лет, что сопоставимо с показателями заболеваемости в европейских странах. Имеется возрастная и территориальная изменчивость в распространенности ретинобластомы в Республике Беларусь. Грубый интенсивный показатель заболеваемости у пациентов в возрасте до 1 года составляет $2,67 \pm 0,33$ на 100 тыс., что в 2,9 раза выше аналогичного показателя в возрасте 1–4 года и в 53 раза выше заболеваемости в возрасте 5–9 лет ($0,93 \pm 0,10$ и $0,05 \pm 0,02$ на 100 тыс., соответственно). Грубый интенсивный показатель заболеваемости ретинобластомой в Дятловском районе Гродненской области в 9,5 раза превышает аналогичный показатель по Республике Беларусь ($3,97 \pm 1,77$ и $0,42 \pm 0,03$ на 100 тыс. населения в возрасте 0–14 лет, соответственно, $p < 0,05$). Стандартизованный показатель заболеваемости ретинобластомой в Дятловском районе Гродненской области в 9,7 раза превышает стандартизованный показатель заболеваемости ретинобластомой в Республике Беларусь ($4,95 \pm 2,24$ и $0,51 \pm 0,04$ на 100 тыс. населения в возрасте 0–14 лет, соответственно, $p < 0,05$).

2. Проведение комплексного лечения по протоколу RBL-2003 с применением стратификации пациентов в зависимости от размера опухолей, их локализации по отношению к структурам глазного яблока, с использованием системной химиотерапии и консолидирующих локальных методов лечения (лазерной термотерапии, криодеструкции, брахитерапии) обеспечивает удовлетворительные отдаленные результаты в сравнении с протоколом ОРЕС-ОЖЕС: показатели 5-летней общей выживаемости – $97,2 \pm 2,1\%$ и $76,3 \pm 7,2\%$, соответственно ($p < 0,01$), показатели 5-летней сохранности глаз – $50,5 \pm 4,5\%$ и $18,6 \pm 5,9\%$, соответственно ($p < 0,001$).

3. Применение и внедрение локальных методов доставки цитостатических препаратов, а также исключение системной химиотерапии для интраокулярной ретинобластомы групп А, В, С, использованные в протоколе RBL-2016, позволяют увеличить 5-летнюю сохранность глаз с распространенной стадией интраокулярной ретинобластомы (группы D, E) с $23,2 \pm 5,1\%$ до $54,3 \pm 11,1\%$ ($p = 0,0058$) и не приводят к уменьшению 5-летней общей ($p = 0,2795$) и 5-летней бессобытийной выживаемости ($p = 0,6350$) в сравнении с протоколом RBL-2003.

4. Для выявления патогенетически значимых нарушений в гене *RB1* необходим комплексный подход с использованием секвенирования, флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и мультиплексной амплификации лигированных проб (MLPA). В нашем исследовании 84,6% нарушений выявлено методом секвенирования, 11,5% – MLPA, 3,9% – FISH. Наиболее распространенное патогенетически значимое нарушение гена *RB1* встречается в сплайс-сайтах (34,6%). Обнаружены 5 патогенетически значимых нарушений, ранее не описанных в литературе и генетических базах данных (с.350_351delTT, с.861+2T>G, с.1701 dupA, с.512_519 delTTATATATinsATAACATG, делеция 16–17 экзонов).

Личный вклад соискателя ученой степени в результаты диссертации

Совместно с научным руководителем определена тема, поставлена цель и сформулированы задачи исследования, разработаны его этапы и направления, осуществлен выбор объекта, предмета и методов исследования.

Личный вклад автора в выполнение диссертационного исследования состоял в следующем: выполнение патентно-информационного поиска и аналитического обзора литературы по проблеме исследования; оперативное лечение и курация пациентов, получавших комплексное лечение по поводу ретинобластомы; обработка первичной медицинской документации, формирование электронных баз данных пациентов; осуществление динамического наблюдения за пациентами; оформление результатов исследования; подготовка и публикация результатов исследования в научных изданиях; оформление диссертационной работы, выводов и практических рекомендаций. Результаты проведенного исследования легли в основу разработанного соискателем раздела клинического протокола и технологии выполнения интравитреальных инъекций в полость стекловидного тела (рационализаторское предложение). Общий вклад автора – 90%.

Автором в соавторстве разработан комплекс праймеров и алгоритм применения молекулярно-генетических методов у пациентов с ретинобластомой для выявления мутаций в гене *RB1*. Под руководством заведующего лабораторией, к.б.н., доцента Гурьяновой И. Е. и старшего научного сотрудника Мигаса А. А. проведено выявление герминальных мутаций гена *RB1*. Статистическая обработка полученных данных проведена совместно с ведущим программистом отдела автоматизированных систем управления Быдановым О. И. Работа сотрудников, принимавших участие в исследовании, отражена в совместных публикациях.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Основные результаты исследования доложены и обсуждены на конференциях: IX Съезд офтальмологов Республики Беларусь с международным участием (13–14.12.2019 г., г. Минск); Научная сессия БГМУ (20.01.2020 г., г. Минск); Юбилейная научно-практическая конференция кафедры офтальмологии педиатрического факультета ФБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России «Охрана зрения детей и подростков на рубеже веков. Путь длиною в 55 лет» (17.10.2019 г., г. Москва); XIII

Республиканская конференция с международным участием (11–12.12.2020 г.); Научная сессия БГМУ (27.01.2021 г., г. Минск); XIV Республиканская конференция с международным участием «Актуальные вопросы офтальмологии» (10–11.12.2021 г., г. Минск); XVI Международная конференция «Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии» (21–22.10.2021 г., г. Минск); Республиканская научно-практическая конференция с международным участием в рамках Европейской недели ранней диагностики опухолей головы и шеи «Онкоофтальмология Update» (23–24.09.2021 г., г. Минск). Утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкция по применению метода (внедрена в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии») и клинический протокол «Диагностика и лечение детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями», содержащий раздел по диагностике и лечению РБ.

Опубликованность результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий, 1 статья в рецензируемом журнале, не включенном в перечень, 2 тезиса докладов. Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждена 1 инструкция по применению, Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.12.2022 № 113 утвержден клинический протокол «Диагностика и лечение детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями», содержащий раздел по диагностике и лечению ретинобластомы, признано рационализаторским предложение «Технология выполнения инъекций в полость стекловидного тела при ретинобластоме» (№ 128), признано рационализаторским предложение «Алгоритм применения молекулярно-генетических методов обследования пациентов с ретинобластомой для выявления мутаций в гене *RB1*» (№ 161). Общий объем опубликованных статей составляет 4,4 авторских листа. Доля участия автора в опубликовании результатов – 90%.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 116 страницах и состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, изложенных в трех главах, заключения, а также списка из 205 использованных источников, включающего 11 публикаций соискателя. Работа содержит 14 таблиц, иллюстрирована 20 рисунками.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования

В исследование включено 168 пациентов, наблюдавшихся по поводу РБ в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» в 1997–2021 гг.

Анализ эффективности лечения пациентов ($n=167$) с РБ проводили в сравнительном аспекте трех различных клинических протоколов: ОРЕС-ОЈЕС ($n=34$), RBL-2003 ($n=92$) и RBL-2016 ($n=41$). Один пациент исключен из анализа эффективности лечения в связи с тем, что заболевание было выявлено в результате патологоанатомической экспертизы, а пациент не получал лечение по поводу РБ. В ретроспективную группу включено 126 (75,4%) пациентов, проходивших лечение в период 1997–2015 гг., в проспективную группу включен 41 пациент (24,6%), проходивший лечение в период 2016–2021 гг.

Выявление патогенных герминальных мутаций в гене *RB1* проведено у 45 пациентов с РБ и 13 кровных родственников. Для этого использовали высокопроизводительное секвенирование (NGS), капиллярное секвенирование по Сэнгеру, методы флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и мультиплексной амплификации лигированных проб (MLPA). При наличии стигм дизэмбриогенеза (низко посаженные мочки ушей, высокий лоб, широкая переносица, задержка психомоторного развития, умственная отсталость, черепно-лицевой дизморфизм, высокий вес при рождении, макроцефалия, гепатомегалия, паховая грыжа, крипторхизм) использовали FISH, в иных случаях – секвенирование. Если по результатам секвенирования не было обнаружено патогенных нарушений, проводили MLPA. Пациентам с билатеральной РБ, у которых нет стигм дизэмбриогенеза и не было обнаружено патогенных нарушений методами секвенирования и MLPA, выполняли FISH.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы Statistica 7.0. Сравнение количественных показателей в группах проводили с использованием критерия Манна-Уитни, t -критерия для парных выборок. Качественные показатели представлены частотами и процентами, для сравнения использовали критерий хи-квадрат, точный критерий Фишера. Показатели общей и бессобытийной выживаемости, сохранности глаз рассчитывали по методу Каплан-Майера. Событиями при оценке бессобытийной выживаемости считали рецидив или прогрессирование, смерть от осложнений лечения; при оценке общей выживаемости – смерть от любых причин. Событием при оценке показателя сохранности глаз считали энуклеацию. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки заболеваемости РБ использовали грубый интенсивный и стандартизованный показатели заболеваемости в возрастных группах до 1 года, 1–4 года, 5–9 лет, а также по возрастной показатель заболеваемости.

Клинико-эпидемиологические аспекты ретинобластомы в Республике Беларусь

В 1997–2021 гг. в Республике Беларусь находились под динамическим наблюдением и проходили лечение 167 пациентов детского возраста с РБ, еще 1 пациенту диагноз установлен в результате патологоанатомической экспертизы. Среди пациентов, включенных в анализ, 86 мальчиков (51,2%) и 82 девочки (48,8%); 131 (78,0%) городской и 37 (22,0%) сельских жителей. С монолатеральной формой заболевания выявлено 115 (68,5%) пациентов, у 56 (48,7%) из них в процесс вовлечен левый глаз, у 59 (51,3%) – правый глаз. Билатеральная РБ зарегистрирована у 53 (31,5%), среди которых билатеральная синхронно возникающая РБ – у 42 (79,2%), билатеральная метакронная форма – у 11 (20,8%) пациентов. Монокулярная форма РБ выявлена у 51 (30,5%) мальчика и 63 (37,5%) девочек. Среди пациентов с бинокулярной РБ мальчиков было больше – 35 (64,8%), чем девочек – 19 (35,2%).

Грубый интенсивный показатель заболеваемости за 1997–2021 гг. в возрастной группе 0–14 лет составил $0,42 \pm 0,03$ на 100 тыс. Самый высокий показатель заболеваемости отмечался в группе пациентов до 1 года – $2,67 \pm 0,33$ на 100 тыс. Стандартизованная по возрасту заболеваемость за период наблюдения в возрастной группе 0–14 лет составила $0,511 \pm 0,039$ на 100 тыс.

В 42 (79,2%) случаях билатеральной РБ процесс развивался синхронно на обоих глазах, в 11 (20,8%) – асинхронно. Медиана возраста пациентов с РБ составила 14,7 месяца (от 26 дней до 8,4 года). Медиана возраста пациентов с монолатеральной РБ – 21,8 месяца (от 46 дней до 8,4 года), медиана возраста пациентов с билатеральной формой заболевания – 7,9 месяца (от 26 дней до 4,6 года), $p=0,0113$.

Исходя из проведенного анализа клинико-эпидемиологических данных за 25-летний период в Республике Беларусь прослеживается территориальная изменчивость в распространенности РБ. Грубый интенсивный показатель заболеваемости в Дятловском районе Гродненской области в 9,5 раз превышает аналогичный показатель по стране ($3,97 \pm 1,77$ на 100 тыс. в возрасте 0–14 лет и $0,42 \pm 0,03$ на 100 тыс. в возрасте 0–14 лет, соответственно, $p < 0,05$). Стандартизованный показатель заболеваемости РБ в этом регионе в 9,7 раза превышает стандартизованный показатель заболеваемости по Республике Беларусь ($4,95 \pm 2,24$ на 100 тыс. в возрасте 0–14 лет и $0,51 \pm 0,04$ на 100 тыс. в возрасте 0–14 лет, соответственно, $p < 0,05$).

Отягощенный по РБ семейный анамнез был выявлен у 4 пациентов, у троих из них обнаружена билатеральная РБ, у одного – монолатеральная.

В результате обследования из 167 пациентов (221 глаз) в 64 глазах (29,0%) была обнаружена РБ в стадии T1N0M0. В 107 глазах (48,4%) диагностирована стадия T2N0M0. В 45 глазах (20,3%) – стадия T3, в 5 глазах (2,3%) установлена стадия T4. Опухоль в стадии T1 была выявлена в обоих глазах у 11 пациентов, причем у 3 из них – при плановой диспансеризации в отсутствии жалоб. Монокулярная форма РБ стадии T1 была выявлена у 10 пациентов, у половины из них – при прохождении диспансеризации. Таким

образом, заболевание у 14,1% пациентов в стадии T1N0M0 было выявлено в результате диспансеризации, что позволило сохранить орган зрения каждому.

Стадирование опухолевого процесса осуществляли по классификации Reese-Ellsworth, за исключением 5 пациентов, которым по этой классификации стадии не могли быть установлены из-за недостаточности данных в медицинской документации. В результате было определено, что более 50% глаз имели неблагоприятный прогноз лечения (IV и V группы).

На этапе диагностики у 1 пациента выявлено поражение центральной нервной системы метастатическим процессом. Поражения костного мозга на этапе первичной диагностики выявлено не было.

За период наблюдения умерло 12 (8,3%) пациентов, из них у шести – билатеральная РБ, у шести – монологатеральная форма заболевания. По причине осложнений лечения (сепсис) умерло 2 пациента из 12 (показатель смертности от осложнений лечения составил $1,5 \pm 1,0\%$), другие – по причине прогрессирования заболевания.

Возраст манифестации билатеральной формы заболевания статистически значимо меньше возраста, в котором выявляется монологатеральная РБ ($p=0,0113$).

Грубый интенсивный показатель заболеваемости у пациентов до года в 2,9 раза выше аналогичного показателя в возрасте 1–4 года и в 53 раза выше заболеваемости в возрасте 5–9 лет. При диспансеризации в отсутствии жалоб выявляется лишь 5,4% (9/168) случаев заболевания, каждый из которых относится к стадии T1N0M0, что диктует острую необходимость повышения эффективности ранней диагностики заболевания с учетом возраста его манифестации.

Анализ эффективности лечения пациентов с ретинобластомой в Республике Беларусь в зависимости от использованных протоколов лечения в период 1997–2015 гг. и разработанного протокола RBL-2016

За период 1997–2021 гг. лечение пациентов с РБ осуществлялось по трем различным протоколам (ОРЕС-ОЈЕС, RBL-2003 и RBL-2016). С 1997 по 2002 год все пациенты получали системную полихимиотерапию после чего проводилась энуклеация глазного яблока (протокол ОРЕС-ОЈЕС). С 2003 по 2015 год использовался протокол RBL-2003 с применением блоков химиотерапии и локальных консолидирующих методов лечения (криодеструкции, лазерной термотерапии, брахитерапии) для глаз с опухолями, относящимися к группам I–III по классификации Reese-Ellsworth, а для групп IV–V – с применением системной химиотерапии и последующей энуклеацией глазного яблока. С 2016 года использовался протокол RBL-2016 с изменениями, утвержденными Ученым советом Центра (протокол №4 от 04.04.2019): пациенты групп А, В, С (по Международной классификации интраокулярной РБ, IIRC) проходили лечение с применением локальных методов: криотерапии, лазерного лечения, брахитерапии, интраартериальной химиотерапии, интравитреальных инъекций цитостатических препаратов. Пациенты групп D, E получали 2 блока системной химиотерапии CARBO-VP (карбоплатин, этопозид) с последующей оценкой ответа. При полном или

частичном ответе (уменьшение размеров опухоли не менее чем на 50%) применялись локальные методы лечения. Лазерное лечение и криодеструкция сопровождалась системной химиотерапией при размерах очагов более 3 мм.

За период наблюдения с 1997 по 2021 гг. 5-летняя общая выживаемость (ОВ) пациентов с РБ составила $93,0 \pm 2,0\%$, 5-летняя бессобытийная выживаемость (БСВ) – $73,0 \pm 2,9\%$, 5-летняя сохранность глаз – $42,0 \pm 4,0\%$.

В зависимости от используемого протокола лечения, наблюдались изменения показателей ОВ и БСВ. 5-летняя ОВ по протоколу ОРЕС-ОЈЕС составила $76,3 \pm 7,2\%$ и была статистически значимо ниже в сравнении с аналогичным показателем по протоколу RBL-2003 ($97,2 \pm 2,1\%$, $p_{\text{ОРЕС-ОЈЕС/RBL-2003}} < 0,01$). 5-летняя ОВ по протоколу RBL-2016 составила 100%, при этом в сравнении с протоколом RBL-2003 статистически значимых различий в ОВ не выявлено ($p_{\text{RBL-2003/RBL-2016}} = 0,2795$, рисунок 1 А).

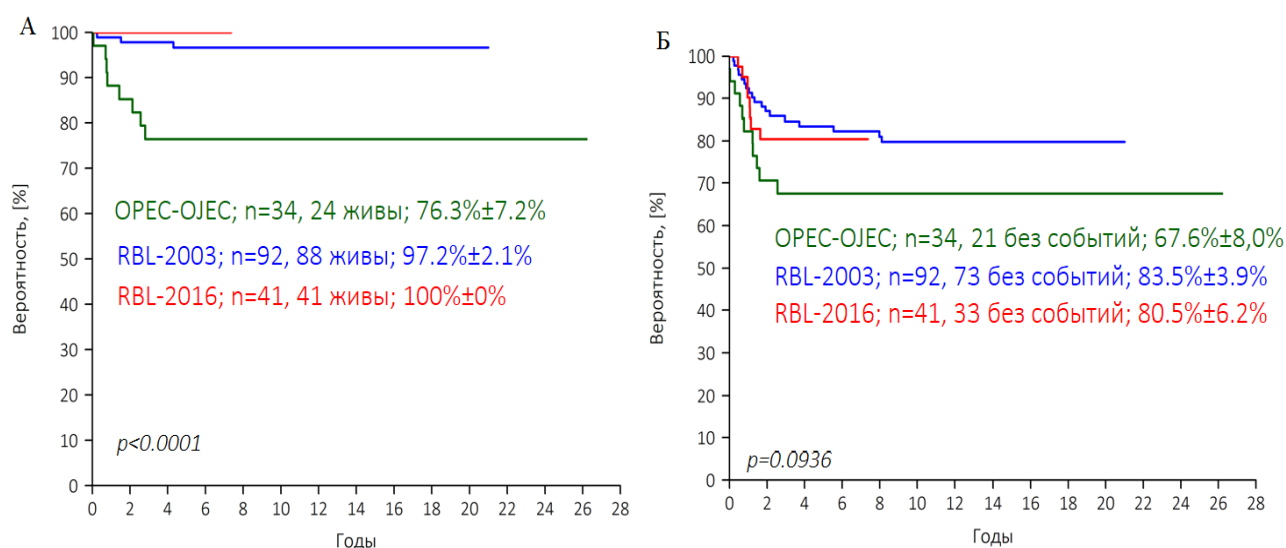


Рисунок 1 – Общая (А) и бессобытийная (Б) 5-летняя выживаемость пациентов с ретинобластомой, получавших лечение по протоколам ОРЕС-ОЈЕС, RBL-2003, RBL-2016

5-летняя БСВ при использовании трех протоколов лечения не различалась и составила: по протоколу ОРЕС-ОЈЕС – $67,6 \pm 8\%$; RBL-2003 – $83,5 \pm 3,9\%$ ($p_{\text{ОРЕС-ОЈЕС/RBL-2003}} = 0,0972$); RBL-2016 – $80,5 \pm 6,2\%$ ($p_{\text{RBL-2003/RBL-2016}} = 0,6350$, рисунок 1 Б). Исходя из этого, редуцирование системной химиотерапии и более широкое применение локальных консолидирующих методов лечения не влияло на показатель БСВ.

5-летняя ОВ пациентов с интраокулярной РБ групп А, В, С независимо от протокола лечения составила 100% (рисунок 2 А). 5-летняя БСВ пациентов в группах А, В, С составила: по протоколу ОРЕС-ОЈЕС – 100%; RBL-2003 – $77,4 \pm 8,1\%$; RBL-2016 – $76,5 \pm 10,3\%$. Однако, некорректно проводить сравнение показателей 5-летней ОВ и 5-летней БСВ с аналогичными показателями по протоколу ОРЕС-ОЈЕС по причине малого количества пациентов (n=2). Различия в 5-летней БСВ пациентов с РБ в группах А, В, С по протоколам RBL-2003 и RBL-2016 не выявлены (рисунок 2 Б).

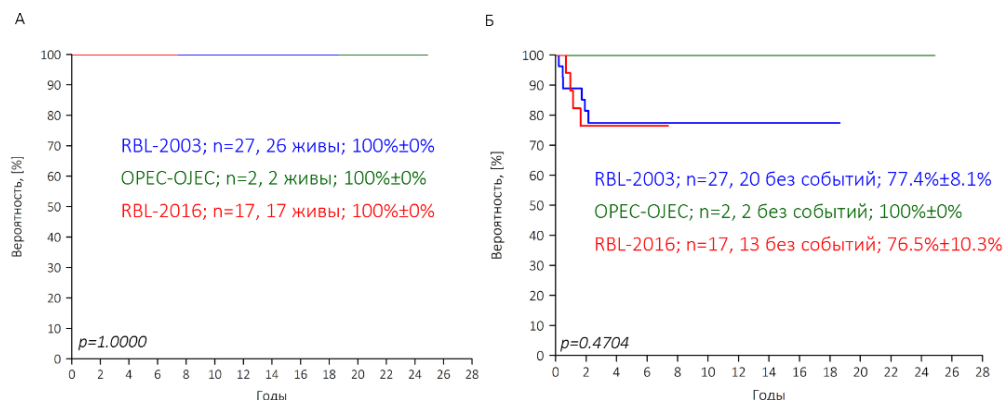


Рисунок 2 – Общая (А) и бессобытийная (Б) 5-летняя выживаемость пациентов с ретинобластомой в группах А, В, С, проходивших лечение по протоколам OPEC-OJEC, RBL-2003, RBL-2016

5-летняя ОВ пациентов по протоколам в группах D, E была статистически значимо выше при использовании протоколов RBL-2003 (95,3±3,3%) и RBL-2016 (100%) в сравнении с OPEC-OJEC – 75,2±8,0% ($p_{\text{OPEC-OJEC/RBL-2003}}=0,0026$; $p_{\text{OPEC-OJEC/RBL-2016}}=0,0158$, рисунок 3 А).

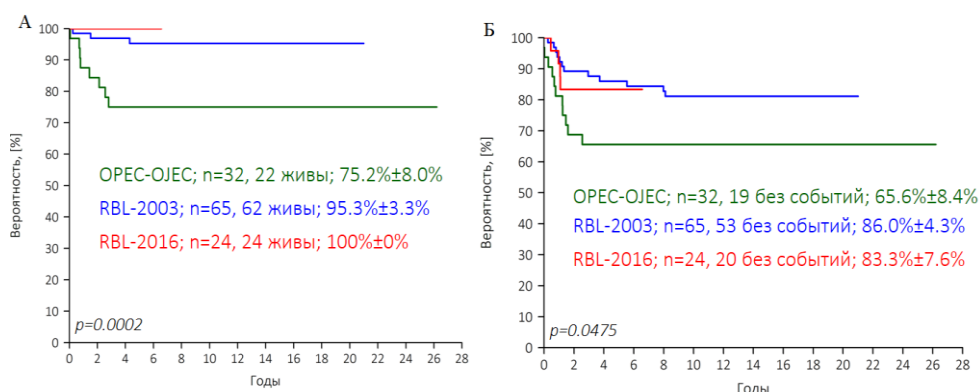


Рисунок 3 – Общая (А) и бессобытийная (Б) 5-летняя выживаемость пациентов с ретинобластомой в группах D, E проходивших лечение по протоколам OPEC-OJEC, RBL-2003, RBL-2016

Показатель 5-летней БСВ для пациентов в группах D, E был ниже по протоколу OPEC-OJEC (65,6±8,4%) в сравнении с показателем 5-летней БСВ при применении RBL-2003 (86,0±4,3%) и RBL-2016 (83,3±7,6%), однако данное отличие статистически незначимо ($p_{\text{OPEC-OJEC/RBL-2003}}=0,0543$; $p_{\text{OPEC-OJEC/RBL-2016}}=0,1639$; $p_{\text{RBL-2003/RBL-2016}}=0,6999$, рисунок 3 Б).

Внедрение протоколов RBL-2003/ RBL-2016 со стратификацией пациентов в зависимости от локализации и размеров опухоли, а также применение системной и локальной химиотерапии, консолидирующих методов лечения способствует увеличению показателей 5-летней ОВ и 5-летней БСВ.

Показатель 5-летней сохранности глаз пациентов с РБ за период 1997–2002 гг. составил 18,6±5,9%. Лечение пациентов в этот период было направлено на сохранение жизни пациента, не использовались органосохраняющие методы лечения, в связи с этим было сохранено только 6 из 42 пораженных глаз.

В последующий период с внедрением протокола RBL-2003 и стратификацией опухолей по локализации и размеру стало возможным

использование локальных консолидирующих методов лечения, что позволило повысить 5-летнюю сохранность глаз до $50,5 \pm 4,5\%$ ($p < 0,001$).

При использовании RBL-2016 для интраокулярных опухолей групп А, В, С была отменена системная химиотерапия и более широко использовались локальные методы лечения, а также локальная химиотерапия в виде интравитреальных инъекций и интраартериальной химиотерапии, что позволило повысить 5-летнюю сохранность глаз до $75,7 \pm 6,2\%$ ($p < 0,0001$, рисунок 4).

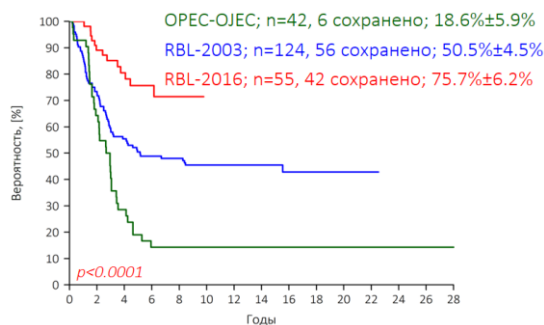


Рисунок 4 – 5-летняя сохранность глаз по протоколам OPEC-OJEC, RBL-2003, RBL-2016

5-летняя сохранность глаз в группах А, В, С интраокулярной РБ значимо не менялась в зависимости от протокола лечения: OPEC-OJEC – $85,7 \pm 13,2\%$; RBL-2003 – $85,5 \pm 4,8\%$; RBL-2016 – $92,6 \pm 5,0\%$ ($p_{\text{OPEC-OJEC/RBL-2003}} = 0,5754$, $p_{\text{RBL-2003/RBL-2016}} = 0,2827$, $p_{\text{OPEC-OJEC/RBL-2016}} = 0,1839$, рисунок 5 А). Таким образом, отмена системной химиотерапии в группах А, В, С интраокулярной РБ и более широкое использование локальной химиотерапии и других консолидирующих методов лечения не влияло на 5-летнюю сохранность глаз.

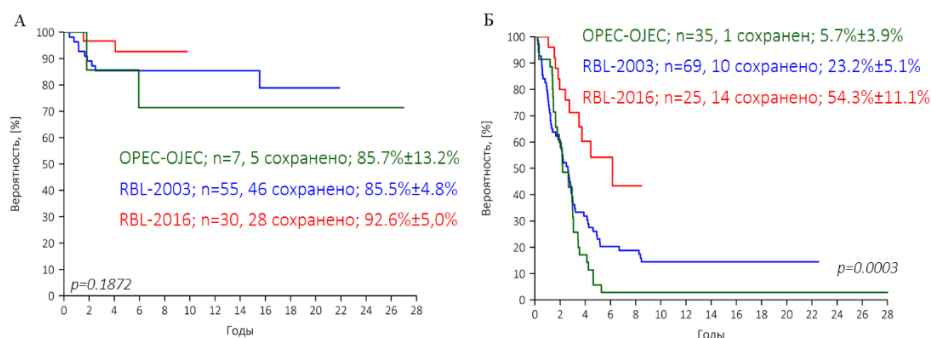


Рисунок 5 – 5-летняя сохранность глаз в группах А, В, С (А) и группах D, E (Б) по протоколам OPEC-OJEC, RBL-2003, RBL-2016

В отличие от глаз групп А, В, С, глаза с распространенными стадиями интраокулярной РБ (группы D, E) при использовании протокола RBL-2016 с применением локальной химиотерапии и консолидирующих методов удавалось сохранять чаще ($54,3 \pm 11,1\%$), чем глаза, пролеченные по протоколам OPEC-OJEC ($5,7 \pm 3,9\%$) и RBL-2003 ($23,2 \pm 5,1\%$) ($p_{\text{OPEC-OJEC/RBL-2003}} = 0,1636$, $p_{\text{RBL-2003/RBL-2016}} = 0,0058$, $p_{\text{OPEC-OJEC/RBL-2016}} = 0,0066$, рисунок 5 Б).

Основные терапевтические элементы RBL-2003 и RBL-2016, которые показали эффективность по результатам проведенного исследования, применяются в настоящее время и включены автором в клинический протокол

«Диагностика и лечение детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями».

Выявление герминальных мутаций гена *RB1* у пациентов с ретинобластомой

Для определения герминальных мутаций гена *RB1* у пациентов с РБ разработан следующий алгоритм применения методов молекулярно-генетической диагностики: при наличии у пациента с РБ стигм дизэмбриогенеза (низко посаженные мочки ушей, высокий лоб, широкая переносица, задержка психомоторного развития, умственная отсталость, черепно-лицевой дизморфизм, высокий вес при рождении, макроцефалия, гепатомегалия, паховая грыжа, крипторхизм) первоначально выполняется метод FISH. При отсутствии перечисленных выше стигм дизэмбриогенеза или при отрицательном результате FISH исследования, проводится секвенирование гена *RB1*. В случае, если мутации гена *RB1* не были выявлены, проводится MLPA для поиска более крупных aberrаций гена. При обнаружении у пациента мутации гена *RB1* или aberrаций 13 хромосомы случай заболевания считают генетически обусловленным. Учитывая, что при билатеральной форме РБ патогенное нарушение в гене *RB1* в редких случаях (менее 5%) может не определяться, для таких пациентов рекомендуется применение метода FISH даже при отсутствии стигм дизэмбриогенеза и случаев заболевания в семье.

Поиск патогенных герминальных нарушений в гене *RB1* проведен у 45 пациентов с РБ. В результате исследования выявлено 25 различных герминальных нарушений у 26 пациентов: методом секвенирования выявлено 21 патогенное нарушение у 22 пациентов, методом MLPA в гене *RB1* детектированы 3 крупные мутации (делеция 1–23 экзонов, делеция 8 экзона и делеция 16, 17 экзонов), методом FISH выявлена делеция длинного плеча 13 хромосомы (Del13q14) у одного пациента. У 2 неродственных пациентов определено одинаковое однонуклеотидное нарушение в регионе сплайс-сайта шестого экзона (с.607+1G>T), описанное в литературе среди пациентов как с монологической, так и билатеральной РБ. У 19 пациентов анализ данных проведенного генетического исследования клинически значимых нарушений не выявил. Таким образом, у 84,6% пациентов (22/26) нарушения выявлены методом секвенирования, методом MLPA выявлено 11,5% нарушений и методом FISH – 3,9%, что подчеркивает важность использования как методов для определения небольших мутаций, так и методов для детектирования крупных патогенных нарушений.

Пять патогенных нарушений ранее не были идентифицированы у пациентов с РБ среди других популяций: в третьем экзоне делеция двух нуклеотидов, приводящая к преждевременному стоп-кодону (с.350_351delTT, p.Phe117TyrfsTer2); однонуклеотидная замена в регионах сплайс-сайтов восьмого экзона (с.861+2T>G); делеция 16–17 экзонов; делеция нескольких нуклеотидов с последующей вставкой иной последовательности нуклеотидов в 5 экзоне, приводящая к сдвигу рамки считывания (с.512_519delTTATATATinsATAACATG, p.Leu171His); однонуклеотидная вставка в 18 экзоне, приводящая к сдвигу рамки считывания (с.1701 dupA,

p.Pro568ThrfsTer4). Все выявленные мутации детектированы в гетерозиготном состоянии, при этом мутации в сплайс-сайтах находятся в регионах, изменения в которых ассоциированы с развитием заболевания.

В зависимости от типа генетические нарушения распределились следующим образом: 34,6% (n=9) дефектов в сплайс-сайтах; 7,7% (n=2) миссенс-мутаций; 26,9% (n=7) мутаций со сдвигом рамки считывания; 15,4% (n=4) крупных делеций; 15,4% (n=4) нонсенс-мутаций. Пациент с делецией длинного плеча 13 хромосомы имел явные фенотипические отличия, несвойственные пациентам с другими типами нарушений. Его клинический портрет включал низко посаженные ушные раковины, повернутые к верху мочки ушей, широкую переносицу. Пациенту также диагностирована задержка психомоторного и речевого развития, наличие эпилепсии в анамнезе, выявлено увеличение шишковидной железы с мелкой кистой и с гетерогенным контрастированием, отмечены признаки незавершенной миелинизации с наружной гидроцефалией.

Герминальные нарушения определены у 15,0% (3/20) пациентов с монолатеральной РБ и у 92% (23/25) – с билатеральной. Из этого следует, что у 57,8% пациентов (26/45) при генетическом исследовании гена *RB1*, в ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови, определены врожденные нарушения. Поиск семейного генетического нарушения выполнен для 13 кровных родственников пациентов из 5 неродственных семей. У двух пациентов подтверждена наследственная форма РБ, у трех – *de novo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Клинико-эпидемиологический анализ за 25-летний период демонстрирует территориальную изменчивость в распространенности РБ в Республике Беларусь. Грубый интенсивный показатель заболеваемости в Дятловском районе Гродненской области в 9,5 раза превысил аналогичный показатель по стране ($3,97 \pm 1,77$ и $0,42 \pm 0,03$ на 100 тыс. в возрасте 0–14 лет, соответственно, $p < 0,05$), и в 9,7 раза превысил стандартизованный показатель ($4,95 \pm 2,24$ и $0,51 \pm 0,04$ на 100 тыс. в возрасте 0–14 лет, соответственно, $p < 0,05$) [1, 6, 7].

Медиана возраста пациентов с РБ составила 14,7 месяца (от 26 дней до 8,4 года). Медиана возраста манифестации билатеральной формы заболевания – 7,9 месяца (от 26 дней до 4,6 года), что статистически значимо ниже ($p = 0,0113$) возраста, в котором выявлялась монолатеральная РБ (от 46 дней до 8,4 года; медиана 21,8 месяца). Грубый интенсивный показатель заболеваемости у пациентов до года составил $2,67 \pm 0,33$ на 100 тыс., что в 2,9 раза выше аналогичного показателя в возрасте 1–4 года и в 53 раза выше заболеваемости в возрасте 5–9 лет ($0,93 \pm 0,10$ и $0,05 \pm 0,02$ на 100 тыс., соответственно [1, 6, 7, 8].

2. Анализ эффективности лечения, проводимого до 2016 года, демонстрирует, что стратификация пациентов в зависимости от локализации и размеров опухоли, а также применение системной химиотерапии и локальных консолидирующих методов лечения способствовали повышению показателя 5-

летней ОВ с $76,3 \pm 7,2\%$ до $97,2 \pm 2,1\%$ ($p < 0,01$) и увеличению показателя 5-летней сохранности глаз с $18,6 \pm 5,9\%$ до $50,5 \pm 4,5\%$ ($p < 0,001$) [1, 2, 6, 8].

3. Внедрение локальных методов доставки цитостатических препаратов позволило увеличить 5-летнюю сохранность глаз с распространенной стадией интраокулярной РБ групп D, E с $23,2 \pm 5,1\%$ до $54,3 \pm 11,1\%$ ($p = 0,0058$), при этом не влияло на показатели 5-летней ОВ (100%, $p = 0,3311$) и 5-летней БСВ ($83,3 \pm 7,6\%$, $p = 0,6999$) в сравнении с протоколом RBL-2003 [1, 2, 3].

4. Для выявления патогенетически значимых мутаций в гене *RB1* необходим комплексный подход, при этом основополагающим является метод секвенирования, применение которого в нашем исследовании позволило выявить 84,6% (22/26) патогенных нарушений. Методом MLPA выявлено 11,5% (3/26) нарушений, методом FISH – 3,9% (1/26). Наиболее распространенное патогенетически значимое нарушение гена *RB1* обнаружено в сплайс-сайтах (34,6%). В зависимости от типа генетические нарушения распределялись следующим образом: нонсенс-мутации – 15,4% ($n = 4$), мутации со сдвигом рамки считывания – 26,9% ($n = 7$), дефекты в сплайс-сайтах – 34,6% ($n = 9$); миссенс-мутации – 7,7% ($n = 2$), крупные делеции – 15,4% ($n = 4$) [4, 5, 9].

5. Обнаружено пять патогенных нарушений в гене *RB1*, ранее не идентифицированных у пациентов с ретинобластомой среди других популяций: в третьем экзоне делеция двух нуклеотидов, приведшая к преждевременному стоп-кодону (с.350_351delTT, p.Phe117TyrfsTer2); однонуклеотидная замена в регионах сайтов сплайсинга восьмого экзона (с.861+2T>G); делеция 16–17 экзонов; делеция нескольких нуклеотидов с последующей вставкой иной последовательности нуклеотидов в 5 экзоне, приведшая к сдвигу рамки считывания (с.512_519delTTATATATinsATAACATG, p.Leu171His); однонуклеотидная вставка в 18 экзоне, приведшая к сдвигу рамки считывания (с.1701 dupA, p.Pro568ThrfsTer4) [5, 9].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Лечение пациентов с РБ необходимо осуществлять в соответствии с клиническим протоколом «Диагностика и лечение детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями», утвержденным Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь 05.12.2022 № 113 [11].

При наличии опухолевых отсеков РБ в полости стекловидного тела рекомендуется проведение интравитреальных инъекций мелфалана в соответствии с технологией выполнения инъекций в полость стекловидного тела при ретинобластоме, изложенной в рационализаторском предложении № 128. Использование интравитреальных инъекций для лечения РБ с наличием отсеков в полости стекловидного тела также изложено в клиническом протоколе «Диагностика и лечение детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями», утвержденном Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь 05.12.2022 № 113 [11].

Пациентам с РБ рекомендуется проведение методов молекулярно-генетической диагностики для обнаружения патогенных нарушений гена *RB1* в соответствии с алгоритмом, изложенным в рационализаторском предложении

№161. При наличии стигм дизэмбриогенеза (низко посаженные мочки ушей, высокий лоб, широкая переносица, задержка психомоторного развития, умственная отсталость, черепно-лицевой дизморфизм, высокий вес при рождении, макроцефалия, гепатомегалия, паховая грыжа, крипторхизм) используется FISH, в иных случаях – секвенирование. Если по результатам секвенирования не обнаруживаются патогенных нарушений, проводится MLPA. Пациентам с билатеральной РБ, у которых нет стигм дизэмбриогенеза и не обнаружено патогенное нарушение методами секвенирования и MLPA, рекомендуется выполнение FISH. Комплекс праймеров, необходимый для выполнения секвенирования, изложен в инструкции по применению № 092-0722 «Метод определения мутации в гене *RB1* для диагностики ретинобластомы», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 24.11.2022 г. [10]. В случае выявления патогенных нарушений в гене *RB1* рекомендовано проведение генетического консультирования и поиск мутаций у членов семьи пробанда. Отсутствие мутации в гене *RB1* не исключает наличие РБ, поскольку в 60% случаев данная опухоль носит спорадический характер [4, 5].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в научных журналах, соответствующие требованиям пункта 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий

1. Ретинобластома в Республике Беларусь: клинико-эпидемиологический анализ за 22-летний период / О. О. Макаревич, Н. Е. Конопля, Д. В. Кочубинский, М. А. Горбач, Е. П. Жиялева, В. С. Млечко // Здоровоохранение. – 2020. – № 5. – С. 65–72.
2. Макаревич, О. О. Транспупиллярная термотерапия в лечении ретинобластомы / О. О. Макаревич // Евраз. онколог. журн. – 2020. – Т. 8, № 1. – С. 10–15.
3. Макаревич, О. О. Интравитреальные инъекции в лечении ретинобластомы / О. О. Макаревич // Вестн. Витеб. гос. мед. ун-та. – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 7–13.
4. Роль генетических нарушений гена RB1 в патогенезе ретинобластомы / И. Е. Гурьянова, О. О. Макаревич, Д. Ю. Литвинова, А. А. Мигас, Н. Е. Конопля // Евраз. онколог. журн. – 2021. – Т. 9, № 2. – С. 113–126.
5. Первые результаты проведения генетического скрининга и изучения генотип-фенотипических корреляций у пациентов с ретинобластомой из Беларуси / И. Е. Гурьянова, А. В. Любушкин, О. О. Макаревич, Д. Ю. Литвинова, В. Р. Вертелко, Е. В. Волочник, Е. А. Полякова, А. А. Мигас, Н. Е. Конопля // Вопр. гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2022. – Т. 21, № 2. – С. 78–88.
6. Результаты лечения ретинобластомы в Республике Беларусь за период 1997–2021 гг. / О. О. Макаревич, Л. В. Наumenко, Д. В. Кочубинский, М. А. Горбач, Н. Е. Конопля // Евраз. онколог. журн. – 2023. – Т. 11, № 3. – С. 198–211.

Статьи в других рецензируемых научных журналах

7. Макаревич, О. О. Ретинобластома: клинические проявления и особенности диагностики у детей / О. О. Макаревич // Педиатрия. Вост. Европа. – 2020. – Т. 8, № 2. – С. 251–257.

Тезисы докладов и материалы конференций

8. Клинико-эпидемиологические аспекты ретинобластомы в Республике Беларусь за период 1997–2018 гг. / О. О. Макаревич, Н. Е. Конопля, Л. В. Наumenко, Е. П. Жиялева, В. С. Млечко // IX Съезд офтальмологов Республики Беларусь с международным участием : сб. материалов, Минск, 13–14 дек. 2019 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Белорус. мед. акад. последиплом. образования ; под общ. ред. Т. А. Имшенецкой. – Минск, 2019. – С. 206–207.
9. Генетические нарушения пациентов с ретинобластомой в Республике Беларусь / О. О. Макаревич, Н. Е. Конопля, И. Е. Гурьянова, А. В. Любушкин, Е. П. Жиялева, А. А. Мигас, Д. В. Луцкович // Актуальные вопросы офтальмологии : сб. материалов XIV Респ. конф. с междунар. участием, Минск, 10–11 дек. 2021 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Белорус. мед. акад.

последиплом. образования ; под общ. ред. Т. А. Имшенецкой. – Минск, 2021. – С. 38–39.

Инструкция по применению

10. Метод определения мутации в гене RB1 для диагностики ретинобластомы : инструкция по применению № 092-0722 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 24.11.2022 / Респ. науч.-практ. центр дет. онкологии, гематологии и иммунологии, Респ. науч.-практ. центр онкологии и мед. радиологии им. Н. Н. Александрова ; О. О. Макаревич, А. А. Мигас, И. Е. Гурьянова, А. В. Любушкин, Е. П. Жилиева, Л. В. Наumenко, Н. Е. Конопля. – Минск, 2022. – 12 с.

Клинический протокол

Диагностика и лечение детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями : клинический протокол : утв. Постановлением М-ва здравоохранения Респ. Беларусь № 113 от 05.12.2022 г. / И. А. Августинovich, ... О. О. Макаревич [и др.] / под ред. И. В. Пролесковской, М. В. Борисевич. – Минск, 2023.

Рационализаторские предложения

– Технология выполнения инъекций в полость стекловидного тела при ретинобластоме : рац. предложение № 128 : утв. Респ. науч.-практ. центром дет. онкологии, гематологии и иммунологии 24.06.2020 / О. О. Макаревич.

– Алгоритм применения молекулярно-генетических методов у пациентов с ретинобластомой для выявления мутаций в гене RB1 : рац. предложение № 161 : утв. Респ. науч.-практ. центром дет. онкологии, гематологии и иммунологии 30.04.2024 / О. О. Макаревич.



РЭЗІЮМЭ
Макарэвіч Аксана Алегаўна
Эпідэміялогія, генетычная дыягностыка
і лячэнне рэтынабластомы ў дзяцей

Ключавыя словы: рэтынабластома (РБ), суперселектыўная інтраартерыяльная хіміятэрапія (СІАХТ), інтравітрыяльная хіміятэрапія (ІВХТ).

Мэта даследвання: павысіць эфектыўнасць органазахавальнага лячэння РБ у дзяцей з выкарыстаннем лакальных спосабаў дастаўкі цытастатычных прэпаратаў, і вызначыць патагенныя парушэнні, якія сустракаюцца ў гене *RB1*, у пацыентаў з РБ у Рэспубліцы Беларусь.

Метады даследавання і выкарыстаная апаратура: У даследаванне ўключана 168 пацыентаў з РБ, якія праходзілі дыягностыку і лячэнне ў перыяд з 1997 па 2021 гг. Аналіз эфектыўнасці лячэння праводзілі ў параўнальным аспекце 3 розных клінічных пратаколаў: ОРЕС-ОJЕС, RBL-2003 і RBL-2016. Выяўленне патагенных гермінальных парушэнняў у гене *RB1* праведзена ў 45 пацыентаў з РБ і 13 крэйных сваякоў з выкарыстаннем метадаў секвеніравання, флуарэсцэнтнай *in situ* гібрыдызацыі і мультыплекснай ампліфікацыі лігіраваных проб.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: Стандартызаваны паказчык захворвання ў Дзятлаўскім раёне Гродзенскай вобласці ў 9,7 раза перавышае аналагічны паказчык па краіне ($4,95 \pm 2,24$ на 100 тыс. ва ўзросце 0–14 гадоў і $0,51 \pm 0,04$ на 100 тыс. ва ўзросце 0–14 гадоў, адпаведна, $p < 0,05$). Самы высокі паказчык захворвання адзначаўся ў групе пацыентаў да 1 года – $2,67 \pm 0,33$ на 100 тыс. Стратыфікацыя пацыентаў у залежнасці ад лакалізацыі і памераў пухліны, а таксама выкарыстоўванне сістэмнай хіміятэрапіі і лакальных кансалідуючых метадаў лячэння спрыялі павелічэнню 5-гадовай агульнай выжывальнасці з $76,3 \pm 7,2\%$ да $97,2 \pm 2,1\%$ ($p < 0,01$) і павелічэнню паказчыка 5-гадовага захоўвання вачэй з $18,6 \pm 5,9\%$ да $50,5 \pm 4,5\%$ ($p < 0,001$). Укараненне СІАХТ і ІВХТ, рэдукаванне сістэмнай хіміятэрапіі ў пратаколе RBL-2016 дазволіла павялічыць 5-гадовае захоўванне вачэй з распаўсюджанай стадыяй інтраакулярнай РБ груп D, E з $23,2 \pm 5,1\%$ да $54,3 \pm 11,1\%$ ($p = 0,0058$) з захаваннем лячэбнага эфекту. Для выяўлення патагенных парушэнняў у гене *RB1* неабходны комплексны падыход, пры гэтым асноватворным з'яўляецца метадаў секвеніравання, выкарыстоўванне якога ў нашым даследаванні дазволіла выявіць 84,6% (22/26) парушэнняў. Найбольш распаўсюджанае патагенетычна значнае парушэнне гена *RB1* выяўлялася ў сплайс-сайтах (34,6%). Выяўлена 5 патагенных парушэнняў у гене *RB1*, раней не ідэнтыфікаваных у пацыентаў з РБ.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: вынікі работы выкарыстоўваюцца ў практыцы Цэнтра дзіцячай анкалогіі, гематалогіі і імуналогіі.

Галіна прымянення: анкалогія.

РЕЗЮМЕ

Макаревич Оксана Олеговна

Эпидемиология, генетическая диагностика и лечение ретинобластомы у детей

Ключевые слова: ретинобластома (РБ), суперселективная интраартериальная химиотерапия (СИАХТ), интравитреальная химиотерапия (ИВХТ).

Цель работы: повысить эффективность органосохраняющего лечения РБ у детей с использованием локальных методов доставки цитостатических препаратов, и определить встречающиеся патогенные нарушения в гене *RB1* у пациентов с РБ в Республике Беларусь.

Методы исследования и использованная аппаратура: В исследование включено 168 пациентов с РБ, проходивших диагностику и лечение в период с 1997 по 2021 гг. Анализ эффективности лечения проводили в сравнительном аспекте 3 различных клинических протоколов: ОРЕС-ОЈЕС, RBL-2003 и RBL-2016. Выявление патогенных герминальных нарушений в гене *RB1* проведено у 45 пациентов с РБ и 13 кровных родственников с использованием методов секвенирования, флуоресцентной *in situ* гибридизации и мультиплексной амплификации лигированных проб.

Результаты и их новизна: Стандартизованный показатель заболеваемости в Дятловском районе Гродненской области в 9,7 раза превышает аналогичный показатель по стране ($4,95 \pm 2,24$ и $0,51 \pm 0,04$ на 100 тыс. в возрасте 0–14 лет, соответственно, $p < 0,05$). Самый высокий показатель заболеваемости отмечался в группе пациентов до 1 года – $2,67 \pm 0,33$ на 100 тыс. Стратификация пациентов в зависимости от локализации и размеров опухоли, а также применение системной химиотерапии и локальных консолидирующих методов лечения способствовали повышению 5-летней общей выживаемости с $76,3 \pm 7,2\%$ до $97,2 \pm 2,1\%$ ($p < 0,01$) и увеличению показателя 5-летней сохранности глаз с $18,6 \pm 5,9\%$ до $50,5 \pm 4,5\%$ ($p < 0,001$). Внедрение СИАХТ и ИВХТ, редуцирование системной химиотерапии в протоколе RBL-2016 позволило увеличить 5-летнюю сохранность глаз с распространенной стадией интраокулярной РБ групп D, E с $23,2 \pm 5,1\%$ до $54,3 \pm 11,1\%$ ($p = 0,0058$) с сохранением лечебного эффекта. Для выявления патогенных нарушений в гене *RB1* необходим комплексный подход, при этом основополагающим является метод секвенирования, применение которого в нашем исследовании позволило выявить 84,6% (22/26) патогенных нарушений. Наиболее распространенное патогенетически значимое нарушение гена *RB1* обнаруживалось в сплайс-сайтах (34,6%). Обнаружено 5 патогенных нарушений в гене *RB1*, ранее не идентифицированных у пациентов с РБ.

Рекомендации по использованию: результаты работы внедрены в практику в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Область применения: онкология.

ABSTRACT

Makarevich Aksana Alegovna

Epidemiology, genetic diagnostics and treatment of retinoblastoma in children

Key words: retinoblastoma (RB), superselective intraarterial chemotherapy (SIAC), intravitreal chemotherapy (IVCT).

Purpose of the study: to increase the effectiveness of organ-preserving treatment of RB in children using local methods of delivery of cytostatic drugs, and to identify the occurring pathogenic disorders in the *RB1* gene in patients with RB in the Republic of Belarus.

Methods and equipment used: The study included 168 patients with RB who underwent diagnosis and treatment from 1997 to 2021. Analysis of the effectiveness of treatment was carried out in the comparative aspect of 3 different clinical protocols: OPEC-OJEC, RBL-2003 and RBL-2016. Identification of pathogenic germline mutations in the *RB1* gene was carried out in 45 patients with RB and 13 blood relatives using sequencing methods, fluorescent in situ hybridization and multiplex amplification of ligated samples.

Research results and their novelty: The standardized incidence rate in the Dyatlovo district of the Grodno region is 9.7 times higher than the same indicator in the country (4.95 ± 2.24 and 0.51 ± 0.04 , respectively, $p < 0.05$). The highest incidence rate was observed in the group of patients under 1 year of age – 2.67 ± 0.33 . Stratification of patients depending on the location and size of the tumor, as well as the use of systemic chemotherapy and local consolidating treatments, contributed to an increase in 5-year overall survival from $76.3 \pm 7.2\%$ to $97.2 \pm 2.1\%$ ($p < 0.01$) and an increase in 5-year globe salvage from $18.6 \pm 5.9\%$ to $50.5 \pm 4.5\%$ ($p < 0.001$). The introduction of SIAC and IVCT, the reduction of systemic chemotherapy in the RBL-2016 protocol made it possible to increase the 5-year globe salvage with advanced stage intraocular RB of groups D, E from $23.2 \pm 5.1\%$ to $54.3 \pm 11.1\%$ ($p = 0.0058$) while maintaining the therapeutic effect. To identify pathogenic disorders in the *RB1* gene, an integrated approach is required, and the sequencing method is fundamental, the use of which in our study allowed us to identify 84.6% (22/26) of mutations. The most common pathogenetically significant disorder of the *RB1* gene was found in splice sites (34.6%). Five pathogenic disorders were discovered in the *RB1* gene that had not previously been identified in patients with RB.

Recommendations for use: the results of the work have been put into practice at the Belarusian Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology.

Field of application: oncology.