

С.Н. Михайлова<sup>1</sup>, Т.П. Казубская<sup>1</sup>, В.М. Козлова<sup>1</sup>, Т.Т. Кондратьева<sup>1</sup>, Е.И. Трофимов<sup>3</sup>,  
Т.С. Бельшева<sup>1</sup>, Е.А. Алексеева<sup>2</sup>, В.В. Стрельников<sup>2</sup>, Т.Л. Ушакова<sup>1,4</sup>, Т.Т. Валиев<sup>1</sup>,  
М.В. Рубанская<sup>1</sup>, А.А. Малахова<sup>1</sup>, Е.С. Бабий<sup>4</sup>

## Спорадические и наследственные формы первично-множественных злокачественных опухолей у детей

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,

<sup>2</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»,

<sup>3</sup>ФГБУ «Научно-клинический центр оториноларингологии» ФМБА,

<sup>4</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»

Минздрава России,

Москва

В статье представлены особенности клинических проявлений спорадических и наследственно детерминированных первично-множественных злокачественных опухолей (ПМЗО) у 104 детей, наблюдавшихся в НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 1998 по 2012 гг. Возраст пациентов на момент возникновения второй злокачественной опухоли варьировал от 2,8 до 28 лет и в среднем составил 15,6 года. Вторые опухоли статистически значимо чаще возникали в группе первичных гемобластозов (8,7%) по сравнению с группой солидных опухолей (3,4%) ( $p < 0,0001$ ). У детей с ПМЗО обнаружена закономерность совместных опухолей. У пациентов с ретинобластомой повышен риск развития остеогенной саркомы, у пациентов с лимфомой Ходжкина — повышенный риск развития лейкозов. У больных, закончивших лечение по поводу солидной опухоли щитовидная железа, костная ткань и молочные железы являются органами — мишенями для развития метакронного рака. Пациенты с впервые возникшими гемопоэтическими опухолями могут быть кандидатами для метакронного развития лейкоза и опухолей костной ткани. Использование секвенирования нового поколения (NGS), тест-системы MLPA (мультиплексной лигазозависимой амплификации) позволило выявить герминальные мутации у 12 детей с ПМЗО. Выявленные у пациентов мутации в генах *TP53*, *RB1*, *CHEK2*, *FANCN/PALB2*, *MLH1*, *PMS2* ассоциировались с наследственными синдромами и увеличенным риском развития повторных неоплазий, среди которых саркомы, опухоли ЦНС, гемопоэтические опухоли встречались наиболее часто. Показано, что вторые неоплазии могут появляться в любом возрасте. Пациенты, излеченные от злокачественных новообразований в

детском возрасте, должны проходить ежегодную диспансеризацию.

**Ключевые слова:** первично множественные злокачественные опухоли, мутации в генах *TP53*, *RB1*, *CHEK2*, *FANCN/PALB2*, *MLH1*, *PMS2*

Первично-множественными злокачественными опухолями (ПМЗО) называют развитие двух и более независимых друг от друга новообразований у одного пациента. Существование нескольких злокачественных новообразований в организме одного и того же больного является проблемой длительное время привлекающей внимание врачей-онкологов. Основоположником изучения этого феномена считается Т. Бильрот, который в 1869 г. ввел критерии определения ПМЗО: а) опухоли должны располагаться в разных органах, б) иметь различную морфологическую структуру, в) каждая опухоль должна иметь собственные метастазы. С течением времени признаки первично-множественного характера злокачественных опухолей неоднократно пересматривались. Согласно международным критериям, к первично-множественным новообразованиям относятся опухоли «одинаковой» или «различной» морфологической структуры. Основным для определения первичной множественности опухолей является то, чтобы они не были метастазами первичной опухоли [1, 2]. Обычно, ПМЗО по последовательности развития делятся на две категории: синхронные (развивающиеся в одно и то же время) и метакронные (развивающиеся последовательно). Критерием метакронности считается интервал не менее 6 мес. или одного года, а интервал до 6 мес. может быть достоверен лишь для рака *in situ* [3, 4, 5, 6].

Частота возникновения ПМЗО варьирует в широких пределах: от 1,5 до 35% — по клиническим данным и от 7 до 20% — при исследова-

нии патологоанатомического материала. Случаи тройной локализации встречаются в 5–8% наблюдений, и реже четырех и более неоплазий у одного больного [7]. По результатам многолетних клинических наблюдений за пациентами, излеченных в детстве от онкологических заболеваний, частота вторых опухолей составляет от 3,5% до 8% [8-10]. В тоже время данные многочисленными исследованиями показывают, что за последние десятилетия во всем мире наблюдается интенсивный рост первично множественного рака как у взрослых, так и у детей [9]. Принято считать, что основной причиной роста заболеваемости ПМЗО является интенсивность канцерогенного воздействия, включая лучевую терапию, цитотоксическую химиотерапию, а также увеличение выживаемости после успешного лечения онкологических заболеваний. Помимо методов лечения, позволяющих больному дожить до развития второй опухоли, другой причиной может быть улучшение диагностики онкологических заболеваний. Как оказалось, при целенаправленном обследовании пациентов с применением новейших диагностических методов, частота обнаружения ПМЗО значительно превысила частоту их выявления при рутинном клиническом наблюдении за онкологическим больным и на вскрытии [11-12]. Кроме того, было показано, что многие пациенты, которые не подвергались лучевой или химиотерапии склонны к развитию последующих опухолей, особенно носители герминальных мутаций [11].

С развитием молекулярной генетики открылись новые возможности изучения механизмов развития рака. Однако все еще остается неясным, обусловлено ли возникновение второй неоплазии биологическими свойствами некоторых злокачественных опухолей или это результат комплексного взаимодействия многих факторов с генетическими системами детерминации. Недавние изучения клинических данных носителей герминальных мутаций в гене *BRCA* показали, что такие мутации как делеции, ассоциируются с высоким риском развития вторых первичных неоплазий разных локализаций [13, 14].

Этиологическая роль генетических факторов, влияющих на риск развития ПМЗО, хорошо прослеживается у пациентов с моногенными наследственными синдромами. Известно более 50 синдромов обусловленных специфическими высоко-пенетрантными мутациями, которые ассоциированы с высоким риском развития рака. Ранний возраст развития рака в сочетании с высоким риском возникновения последующей первичной неоплазии определенного фенотипа, характерен для таких синдромов, как МЭН2 типа (медуллярный рак и феохромоцитома), Ли-Фраумени (адренкортикальный рак и саркома),

фон Хиппель-Линдау (гемангиобластома и рак почки). При наследственных синдромах у детей конституциональные варианты мутаций в генах, ассоциированных со злокачественными опухолями, могут предрасполагать к развитию широкого спектра злокачественных опухолей и к высокому уровню риска развития ПМЗО.

На сегодняшний день фенотип множественных злокачественных неоплазий в педиатрической практике недостаточно изучен. Знания о возможности развития других новообразований у онкологических пациентов с впервые выявленной неоплазией позволят клиницистам не допустить диагностики на поздних стадиях. Основными факторами, побуждающими к их изучению, является время возможного развития другого новообразования, наиболее вероятный тип второй неоплазии и причины их возникновения.

**Цель работы** изучить особенности клинических проявлений первично-множественных спорадических и наследственно детерминированных злокачественных опухолей у детей.

## Материалы и методы

Проведено изучение клинических данных и анализ частоты возникновения вторых первичных опухолей среди 5875 больных (мальчиков — 54,3%, девочек — 45,7%) с впервые диагностированными злокачественными опухолями. Все пациенты обследовались, лечились и наблюдались в НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 1998 по 2012 гг. Из всей когорты больных обнаружено 104 пациента с ПМЗО. Изучены: клинические данные; фенотип развившихся первичных опухолей; проведенное лечение; генетические данные. Анализ частоты возникновения вторых опухолей, интервал их появления от первичного диагноза проведен как в группе в целом, так и по отдельным нозологиям.

Молекулярный анализ ДНК проведен у 12 больных с ПМЗО и у 29 их родственников. ДНК — диагностика проводилась на лимфоцитах периферической крови в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр». Образцы крови у всех пациентов были собраны после подписания информированного согласия самих пациентов и/или их родителей. ДНК из цельной периферической крови выделялась с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) на автоматической станции QIAcube (Qiagen). Поиск точковых мутаций, делеций/инсерций в генах проводился с использованием комплексной ДНК — диагностики: высокопроизводительного параллельного секвенирования (N GS). В качестве набора мультитиплексных праймеров применяли коммерчески доступную панель олигонуклеотидов Comprehensive Cancer Panel (LifeTechnologies). Панель включала смесь из 16000 пар праймеров для одновременной амплификации участков 409 генов, вовлеченных в канцерогенез. Подготовка библиотек для секвенирования и формирование библиотек фрагментов генома, содержащих кодирующие последовательности генов и прилежащие интронные участки, выполнялись с использованием технологии AmpliSeq по рекомендуемому производителем протоколу, на приборах Thermo Fisher Scientific. Высокопроизводительное секвенирование проводили на приборе IonTorrent PGM (LifeTechnologies, США) и IonS5 (Thermo Fisher Scien-

tific) по протоколам производителя. С целью валидации выявленных мутаций применялся метод секвенирования по Сэнгеру. Для анализа количества копий изучаемых генов, с целью выявления протяженных делеций, использовался метод мультиплексной лигазозависимой амплификации (MLPA).

Статистический анализ частоты возникновения вторых опухолей, интервал их появления от первичного диагноза проведен как в группе в целом, так и по отдельным нозологиям. Достоверность параметрических данных сравнивалась по методу Стьюдента, непараметрических по методу Х2. Для анализа полученных результатов применялась программа SPSS 21.

### Результаты

Изучение клинических данных 5875 пациентов показало, что при среднем периоде наблюдения 9,1 (1,3-17,6) лет, вторая неоплазия диагностирована у 1,8% (104) из них, у 42,3% мальчиков и 57,7% девочек. Возраст пациентов на момент возникновения второй злокачественной опухоли варьировал от 2,8 до 28 лет и в среднем составил 15,6 года. Изучение диагностированных у пациентов клинических фенотипов опухолей показало, что наблюдается спектр комбинаций разных типов неоплазий, которые были распределены на две группы: солидные опухоли и опухоли гемопоэтической природы. Из 104 больных с ПМЗО у 61 (58,6%) пациента первыми возникшими неоплазиями были солидные опухоли, а у 43 (41,4%) — опухоли гемопоэтической природы.

Из 4521 больных с впервые выявленными солидными опухолями вторые злокачественные опухоли развились у 61 (1,4%) пациента. Причем, у 44 (72,1%) из них, они были также солидными (остеосаркома — 13, опухоль семейства саркомы Юинга — 3, рак щитовидной железы (РЩЖ) — 7, рак молочной железы (РМЖ) — 4, рак шейки матки — 4, нейрогенные опухоли

ли — 2, саркомы мягких тканей- 6, опухоли ЦНС — 2, нефробластома — 2, рак слюнной железы — 1). У 17 больных (27,9%) вторая опухоль была представлена гемобластозом: острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) — 5, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — 7, неходжкинская лимфома — 2, лимфома Ходжкина (ЛХ)-1, гистиоцитоз из клеток Лангерганса — 1).

Из 1351 больных с впервые выявленными опухолями кроветворной системы, вторые злокачественные опухоли обнаружены у 43 пациентов (3,2%). Анализ показал, что вторые солидные опухоли разных локализаций развились у 35 из них (рак щитовидной железы — 17; молочной железы — 5; шейки матки — 1; желудка — 1; опухоли костей — 5; нейрогенные опухоли -2; ЦНС-1; мезотелиома — 1; меланома — 1; базалиома — 1), а у 8 из этих пациентов с первичными гемобластозами вторыми неоплазиями были опухоли также кроветворной ткани (27,9%) (табл. 1).

В связи с тем, что терапия острых лейкозов (ОЛ) и неходжкинских лимфом (НХЛ) проводилась по единым протоколам, рекомендованным группой ВФМ, и несла идентичные риски развития вторых неоплазий, эти нозологии объединены в группу ОЛ/НХЛ, в которую вошли 1090 пациентов. В группе ЛХ (183 пациента) из 18 развившихся вторых опухолей — 3 были гемобластозами (табл. 1).

На момент первичной диагностики средний возраст у детей с гемобластозами составил 8,2 (0,15-19,6) года и достоверно отличался от среднего возраста пациентов с солидными опухолями — 6,0 (0,01+20,8) лет (p=0,028). При этом, по мере увеличения срока наблюдения, отмечалась тенденция к нарастанию возникновения вторых неоплазий от 0,5% — в первые 0-5 лет до 4,2% в последующие 10–15 лет.

**Таблица 1. Вторые опухоли у пациентов с первично солидными опухолями и у детей с первыми гемопоэтическими опухолями**

Нозологическая форма первой злокачественной опухоли	Количество пациентов с последующими вторыми солидными(гемопоэтическими)неоплазиями (абс.ч.)	Средний период наблюдения за больными
Опухоли костей	8 (из них гемобластозы у 5)	9,1(1,6-17,6) г.
Опухоли мягких тканей	17 (из них гемобластозы у 5)	9,2(1,3-16,4) г.
Нейрогенные	6	9,2 (2,4-16,8) г.
Опухоли почек	11 (из них гемобластозы у 2)	9,6(1,3-17,0) г.
Герминогенные	6 (из них гемобластозы у 1)	8,6(2,6-17,2) г.
Ретинобластома	13 (из них гемобластозы у 4)	8,5(2,2-16,9) г.
Всего	61 (из них гемобластозы у 17)	
Вторые неоплазии, развившиеся у детей с первичными гемобластозами		
Нозологическая форма первой злокачественной опухоли	Количество последующих вторых первичных неоплазий	Интервал от момента диагностики первичной опухоли
ОЛ/НХЛ	25 (из них ОМЛ у 2, ЛХ у 3)	8,2 (0,15-19,6) г.
ЛимфомаХоджкина	18 (из них гемобластозы у 3)	8,4 (1,8-15,8) г.
Всего	43	

**Таблица 2. Возраст и последовательность развития ПМЗО у детей с наследственными синдромами, обусловленными герминальными мутациями**

Герминальные мутации выявленные у больных	Локализация первичной опухоли	Локализация второй первичной опухоли	Локализация третьей первичной опухоли	Локализация четвертой первичной опухоли	Локализация пятой первичной опухоли
Мутация в гене TP53 синдром Ли-Фраумени (OMIM #151623):					
№1. Экзон 7, миссенс мутация:с.С742Т (р.Р248W)	Паравerteбральная эмбриональная опухоль PNET/RMSTh10-11в 3 г.	Опухоли: из периваскулярных эпителиоидных клеток(PEComa) печени в 10 лет и синхронно	остеосаркома нижней стенки правой орбиты в 10 лет		
№2. Экзон 10, протяженная внутригенная делеция: с.[1195+1_1196-1]_(1302+1_1303-1)del, р.(Ile332 ProfsTer14)].	Эмбриональная рабдомиосаркома левой орбиты диагностирована в 4 г.	Диффузная В-крупноклеточная лимфома кишечника обнаружена в 9 лет	Остеосаркома (хондробластный вариант) левой ключицы в 11 лет 11 мес.	Эмбриональная рабдомиосаркома области шеи и синхронно Остеосаркома (хондробластный вариант) кресца в 16 лет	Острый миелоидный лейкоз в 16 лет 3 месяца, Миелодиспластический синдром в 16 лет 8 мес.
Мутация в гене CHEK2. Синдром Ли-Фраумени тип 2(OMIM #609265):					
№3 Экзон 3, миссенс-мутация (с.470Т>С), р.1157Т (замена изолейцин на треонин в 157 положении)	Острый лимфобластный лейкоз в 5 лет	Анапластическая менигеома в 22 г.	Паравариальная киста левого яичника, фиброзно-кистозная мастопатия в 25 лет	Базально-клеточный рак солидного строения затылочной области в 29 лет	
№ 4. Экзон 11, сдвиг рамки считывания (с.1100delC) (р.Thr367MetFSTer15)	Нефробластома правой почки в 1 год 8 мес.	Острый лимфобластный лейкоз в 3 г.	Карцинома левой почки в 18 лет		
№5.Экзон 11, сдвиг рамки считывания, (с.1100delC) (р.Thr367MetFSTer15)	Мультикистозные изменения в обеих молочных железах с преобладанием в околососковой области в 12 лет				
Мутация в гене PMS2 Синдром Тюрко (Turcot) (OMIM — 276300):					
№6. Экзон11, нонсенс мутация (с.А1939Т) (р.К647*) в гетерозиготном состоянии	Анапластическая астроцитома головного мозга в 5 лет. Множественные пятна «кофе с молоком» на коже	Множественные полипы толстой кишки перстневидноклеточная аденокарцинома, исходящая из тубуловилезной аденомы слепой кишки в 13 лет 4 мес.	Аденокарцинома прямой кишки в 17 лет		
Мутация в гене MLH 1 синдромТюрко (Turcot) (OMIM — 276300)					
№7 Экзон 13, (с.1558+1G>A) (мутация сайта сплайсинга) и Экзон 9 с.683delТ (р.L228FS) (сдвиг рамки считывания)в компаунд гетерозиготном состоянии	Астроцитома головного мозга в 3 г. 8 мес. Множественные пятна «кофе с молоком» на коже				
Мутация в гене PALB2 Синдром хромосомной нестабильности Фанкони, тип N(OMIM:610832)					
№8 Экзон 13,миссенс-мутация(с3512 Т>С) (рLeu1171Ser) изэкзон3 (с.172_175delTTGT), (р.Leu 58FS) в компаунд- гетерозиготном состоянии	Нефробластома левой почки в 3 г. 1 мес.	Медуллобластома мозжечка в 4 г. 1 мес.	Миелодиспластический синдром в 4 г.		
Мутация в генеRB1, синдром наследственной ретинобластомы					
№9. Экзон 7, нонсенс-мутация (с.Т653G) (р.L218X) de novo	Синхронные билатеральная ретинобластома и нейробластома – левого надпочечника в 2 мес.	Опухоль хиазмально-селлярной области головного мозга, опухоль мостомозжечковой области в 2 г.			
№10. Делеция гена по внутригенным микросателлитным маркерам Rb2int и Rb20int	Билатеральная ретинобластома 1г 5 мес.	Остеома лев теменной кости в 25 лет			
№11.Экзон 19,мутация-сдвиг рамки считывания: 1937del 4N (р.S646FS) de novo	Бинокулярная РБ, диагностированная в 10 мес.	Альвеолярная рабдомиосаркома мягких тканей левой височной области в 4 г. 11 мес.			
№12 .Экзон16, сдвиг рамки считывания с.1448delAT (р. Н483FS) в гетерозиготном состоянии	Врожденная билатеральная ретинобластома	Остеосаркома левой орбиты в 5 лет 7 мес.			

Исследование клинических особенностей проявления ПМЗО у пациентов, в зависимости от типа и локализации опухоли, показало, что у одного и того же пациента первичные неоплазии встречаются в разных комбинациях, однако некоторые опухоли встречались с наибольшей частотой. Рак щитовидной железы (23%) был наиболее частым среди всех вторых неоплазий, а среди группы больных с солидными вторыми опухолями частота его составила 30,2%. Большая часть первичных неоплазий у детей встречались в комбинации с опухолями костей — у 20,1% больных среди всех вторых опухолей и у 26,3% больных среди вторых солидных опухолей. Кроме того, у пациентов с большой частотой возникали вторые гемобластозы, которые среди всех вторых опухолей составили 17,2%. В тоже время второй рак молочной железы (РМЖ) развился у 8,7% от всех пациентов, а среди солидных вторых опухолей — у 11,3% больных. Следует отметить, что средний возраст больных на момент диагностики РМЖ варьировал от 16 до 28 лет, в среднем составив 22,8 года.

Канцерогены в окружающей среде и специфическое лечение, которое получали большинство из пациентов — это факторы которые могут индуцировать риск возникновения ПМЗО. Поскольку химиотерапию и лучевую терапию на ложе первичной опухоли первоначально получили 96% пациентов, такое совместное возникновение неоплазий у одного и того же пациента может быть обусловлено специфическим лечением. Однако у 10 (9,6%) пациентов, которые получали только минимальную ХТ, без лучевой терапии, также развились вторые злокачественные опухоли. Кроме того, вторые первичные неоплазии развились у 8 (7,7%) пациентов, которые получили только хирургическое лечение.

Интерес представляет комбинация типов первичных неоплазий, которая у некоторых пациентов различалась в зависимости от типа первой развившейся злокачественной опухоли. Так у больных ретинобластомой (РБ) достоверно чаще встречалась остеосаркома ( $p=0,026$ ) по сравнению с другими, диагностированными у них вторыми опухолями. И в то же время у больных с РБ отмечался статистически значимо более высокий риск развития разных типов вторых неоплазий, по сравнению с пациентами, имеющими другие типы солидных опухолей, — 11,2% против 3,3%, соответственно ( $p=0,009$ ). Увеличенный риск развития второй неоплазии среди пациентов с РБ может быть обусловлен генетической предрасположенностью у некоторых больных. Интересным является и тот факт, что для па-

циентов с лимфомой Ходжкина, по сравнению с другими гемопоэтическими опухолями, риск развития вторых опухолей был достоверно выше — 21,3% ( $p=0,0003$ ).

В целом, изучение частоты возникновения ПМЗО в исследуемых группах больных показало, что вторая неоплазия достоверно чаще возникала в группе первичных гемопоэтических опухолей, по сравнению с группой солидных опухолей — 8,7% против 3,4%, соответственно ( $p<0,0001$ ). Среди изучаемых пациентов обнаружено 12 больных с синхронными и метасинхронными первично-множественными опухолями, клинические и генеалогические данные которых позволили идентифицировать наследственные формы злокачественных опухолей (табл. 2). Известно, что причиной их развития являются герминальные мутации, которые формируют клиническое проявление болезни. Эти синдромы являются результатом специфических наследственных мутаций, предопределяющих риск развития рака. Все пациенты были тестированы на наличие мутаций в генах, ассоциированных с наследственно обусловленными синдромами (табл. 2).

Как видно из табл. 2, особенностью проявления первично-множественных неоплазий, ассоциированных с герминальными мутациями, является клинический полиморфизм и генетическая гетерогенность. У **пациента № 1** в 3 года впервые диагностирована паравертебральная эмбриональная злокачественная опухоль сложного строения уровня Th10-11 (рис.1) и далее в 10 лет синхронно диагностированы РСoma печени и остеосаркома орбиты. ДНК-тестирование онкопанели NGS выявила мутацию в гене *TP53*, которую он унаследовал от отца с ПМЗО (раком прямой кишки/В-клеточной лимфомой/опухолью ЦНС). У пациента диагностирован синдром Ли-Фраумени 1 типа.

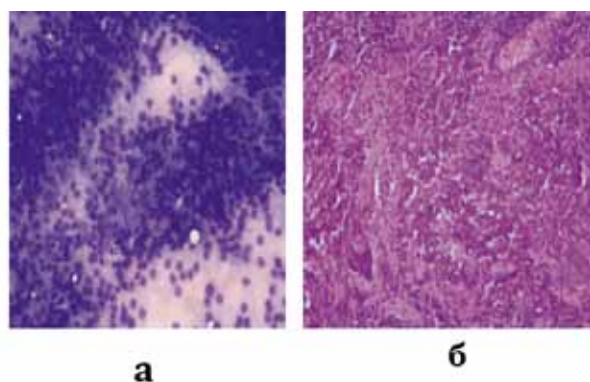


Рис. 1. (а, б). Пациент №1, (а) цитологическая и (б) гистологическая картина (+40) паравертебральной эмбриональной злокачественной опухоли (PNET/RMS) носителя мутации в гене TP53

У пациента №2 наблюдалась клиническая манифестация разных неоплазий. Начиная с 4-х лет он получил 8 курсов полихимиотерапии и лучевое лечение. К 16 годам диагностировано шестикратное появление опухолей, из которых две гистологические формы повторялись дважды (рис. 2). Поиск мутаций в гене TP53 с использованием NGS был негативным. Использование технологии MPLA позволило обнаружить обширную внутригенную делецию в экзоне 10 гена TP53, в гетерозиготном состоянии. Выявленная мутация стала причиной агрессивного течения заболевания.

Мутации в гене *CHEK2* выявлены у пациентов № 3-5 — диагностирован синдром Ли-Фраумени 2 типа. Они обусловили предрасположенность к развитию разных неоплазий, включая гемопэтические и солидные опухоли, поражающие почки, кожу, ЦНС и доброкачественные опухоли яичников и молочных желез. Согласно литературным данным, мутации в гене *CHEK2* ассоциированы с синдромом семейного рака молочной железы. Пациентка №5 наблюдалась с подозрением на синдром Элерса-Данло, в 12 лет ей проведено исследование ДНК методом секвенирования экзона — обнаружена мутация сдвига рамки считывания в 11 экзоне гена *CHEK2*. Мутаций, ассоциированных с синдромом Элерса-Данло, выявлено не было. Мутация в гене *CHEK2* унаследована от матери. При обследовании у ребенка диагностированы мультикистозные изменения в обеих молочных железах. Из-за носительства герминальной мутации в гене *CHEK2*, ассоциированного с высоким риском развития рака молочной железы в раннем возрасте, ребенок находится под наблюдением онколога и маммолога.

При кажущейся фенотипической однородности генетическая гетерогенность наследственных форм опухолей может включать в себя несколько клинически и генетически самостоятельных форм. Так, у пациентки № 6 с опухолью ЦНС и множественными кофейного цвета пятнами на коже предположительным диагнозом был ней-

рофиброматоз. В возрасте 5 лет ей проведено хирургическое лечение и тестирование ДНК генов нейрофиброматоза (*NF1/NF2*), мутаций в которых выявлено не было. В 13 лет обнаружен множественный полипоз и рак толстой кишки. Молекулярный анализ онкопанели NGS выявил нонсенс-мутацию в гене *PMS2* в гетерозиготном состоянии. Аналогичная мутация обнаружена у бессимптомной 38-летней матери. Клиническая картина заболевания у ребенка ассоциировалась с синдромом Тюрко (OMIM-276300). Моноаллельная мутация в гене *PMS2* и возникновение множественных опухолей у ребенка (гетерозиготного носителя) стало причиной поиска мутаций во втором аллеле гена методом MLPA, но обнаружить мутацию не удалось. У другого пациента №7 с опухолью головного мозга/множественными «кофейными» пятнами на коже, симптомы были характерными для нейрофиброматоза, как и в случае пациента №6. Выполненный молекулярный анализ расширенной онкопанели NGS обнаружил мутацию в гене *MLH1* в компаунд-гетерозиготном состоянии. Одна мутация сайта сплайсинга в экзоне 13 гена *MLH1* и вторая мутация в экзоне 9 гена *MLH1*, приводящая к сдвигу рамки считывания. Мутаций в генах нейрофиброматоза (*NF1/NF2*) не обнаружено. Брат пациента умер от опухоли ЦНС в 4 года, имел два кофейных пятна на коже. На основании полученных данных у ребенка носителя выявленных мутаций диагностирован синдром Тюрко с аутосомно-рецессивным типом наследования. Пациент имеет высокий риск развития полипов в кишечнике и их малигнизации в детском возрасте, ему в возрасте 6 лет рекомендовано проведение колоноскопии [15].

У пациента №8 с ПМЗО с нефробластомой/опухолью ЦНС выявлено гетерозиготное носительство компаунд-гетерозиготной мутации в гене *PALB2*, ассоциированной с анемией Фанкони N(*FANCN*). Диагностированное заболевание является синдромом хромосомной нестабильности (OMIM:610832), для которого характерна высокая гетерогенность, переменная экспрес-

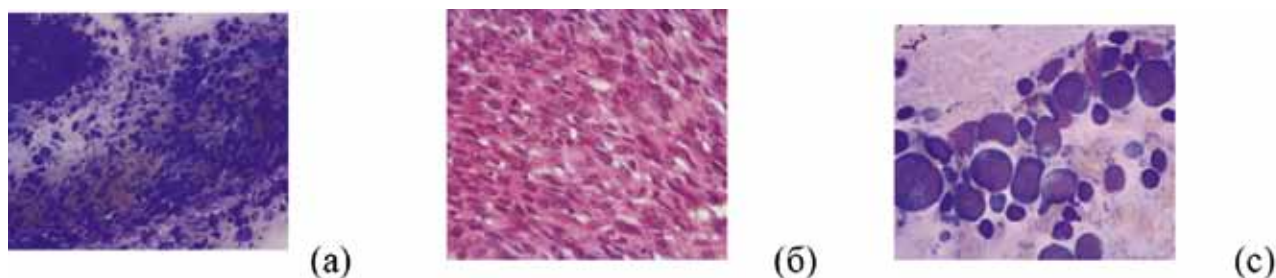


Рис. 2 (а, б, с).

Пациент №2. (а) цитологическая картина эмбриональной рабдомиосаркомы ×20 (в 4 года); (б) гистологическая картина эмбриональной рабдомиосаркомы ×40; (с) цитологическая картина диффузной В-крупноклеточной лимфомы (в 9 лет) ×100, у носителя мутации в гене TP53



сивность и аутосомно-рецессивный тип наследования. Нонсенс – мутация и делеции в гене *RBI* выявлена у больных РБ № 9-12 и ассоциировалась с билатеральной РБ/саркома/опухолью ЦНС/нейробластомой. Как было установлено — у многих пациентов с ПМЗО, в случаях, подозрительных на наличие наследственного синдрома, выявить мутацию простым секвенированием оказалось сложно. Для их диагностики было необходимо использование новых молекулярных технологий — онкопанели NGS и метода MLPA.

### Обсуждение

Этиология последующих первичных опухолей включает в себя такие факторы как генетическую детерминацию, тип лечения первого злокачественного новообразования, влияние факторов окружающей среды и комбинацию любых из этих факторов. В ходе изучения клинических признаков первично множественных злокачественных опухолей было показано, что вторые первичные неоплазии развиваются у 1,8% пациентов. Результаты, полученные в настоящем исследовании, коррелируют с данными мировой литературы, свидетельствующими о частоте развития ПМЗО у детей, в первые 10 лет наблюдения оценивается от 2,2 до 6% [7]. Установлено, что вторая неоплазия достоверно чаще возникает в группе первичных гемопэтических опухолей по сравнению с группой солидных опухолей ( $p < 0,0001$ ). Обращает на себя внимание тот факт, что интервал между развитием первой и второй неоплазиями у больных гемопэтическими опухолями короче по сравнению с солидными опухолями.

Сравнение частоты возникновения вторых первичных неоплазий среди всех больных показало, что наиболее часто они возникают в щитовидной железе (30,2%), костной ткани (20,1%), в кроветворной ткани (17,2%) и молочной железе (8,7%). Возникновение метакронных неоплазий могло быть индуцировано специфическим лечением и как следствие генетическими изменениями в окружающих опухоль тканях. Однако вторые злокачественные опухоли развились также у 9,6% пациентов, получавших только минимальную ХТ без лучевой терапии и у 7,7% пациентов, получавших только хирургическое лечение. Исходя из этих данных, щитовидная железа, костная, кроветворная ткани и молочные железы имеют специфический риск развития рака и являются органами — мишенями для контроля наиболее вероятного развития последующих новообразований среди излеченных больных.

Интересным является и тот факт, что для пациентов с лимфомой Ходжкина, по сравнению с

другими гемопэтическими опухолями, риск развития вторых опухолей статистически значимо выше ( $p = 0,0003$ ). Кроме того, было обнаружено, что при некоторых типах впервые возникшего рака наблюдается ассоциация с типом метакронно развивающейся второй неоплазии. Так, при сравнении частоты возникновения неоплазий у больных с лимфомой Ходжкина, был обнаружен повышенный риск развития лейкозов. Как уже упоминалось, различные типы множественных опухолей могут встречаться случайно, быть результатом проведенного специфического лечения или результатом общих факторов предрасположенности к их развитию. С другой стороны, в совместном развитии этих неоплазий может быть заметный, еще не идентифицированный генетический вклад в их этиологию. Как, например, у больных ретинобластомой, саркомы наблюдаются наиболее часто, и риск развития вторых первичных опухолей также повышен по сравнению с другими типами первых опухолей. В этой связи обращают внимание данные, полученные в недавних исследованиях, где на основе методологии полногеномного скрининга ассоциаций (GWAS, Genome-Wide Association Study) с использованием новой смешанной модели была изучена генетическая связь между однонуклеотидными полиморфизмами — *SNP (single-nucleotide polymorphism)* и наблюдаемой ко-сегрегацией рака некоторых локализаций, включая парные органы и рака в отдаленных областях, возникающими у пациентов. В результате, у детей была выявлена статистически значимая корреляция между комбинацией пар неоплазий, таких как: диффузная В-крупноклеточная лимфома и остеосаркома, диффузная В-крупноклеточная лимфома и острый лейкоз [14,15]. Таким образом, лейкозы и остеосаркомы, возникшие у исследуемых больных с лимфомой Ходжкина, могут иметь общие факторы предрасположенности. Следовательно, дети с гемопэтическими неоплазиями могут быть кандидатами для интенсивного обследования с прицельной диагностикой лейкоза и опухолей костной ткани.

В группе исследованных больных у 12 пациентов идентифицированы наследственные синдромы, ассоциированные со специфическими генами, предрасполагающими к развитию неоплазий, возникающих в раннем возрасте. Причиной большинства наследственных синдромов являются мутации в генах-супрессорах и тип мутации, повреждающий ген и влияющий на его функцию, что обуславливает тяжесть проявления заболевания. Изучение ПМЗО возникших у 12 носителей разных герминальных мутаций показало, что у пациентов с мутациями в гене *TP53* и *RBI* саркомы/опухоли ЦНС/гемопэтические опухоли возникали последовательно и

наиболее часто. У пациента №1 (синдром Ли-Фраумени, тип 1) выявлена мутация в экзоне 7. Известно, что миссенс-мутации, затрагивающие экзоны 5–8, обнаруживаются наиболее часто [16,17]. Они кодируют центральный сайт-специфический ДНК-связывающий домен, мутации в этих экзонах нарушают способность белка p53 связываться с ДНК и активировать транскрипцию генов, вовлеченных в репарацию поврежденной ДНК, что является основанием отказаться от ЛТ у носителей этой мутации, способствующей накоплению мутаций. Отмечена также потенциальная устойчивость к стандартным схемам химиотерапии у лиц с наличием мутантного *TP53*-генотипа.

Вариант мутации — протяженная делеция в гене *TP53* у пациента №2 с синдромом Ли-Фраумени тип 1 привела к потере большей части тетрамеризационного домена и почти всего С-концевого регуляторного домена протеина p53. Это дестабилизировало тетрамерную структуру белка и привело к инактивации онкосупрессорной функции гена *TP53*. При таком типе мутации, для потери супрессорной функции гена *TP53*, достаточно мутации в одном аллеле гена (гетерозиготного состояния), чтобы он действовал как онкоген. Патогенная мутация *TP53* стала причиной генетической уязвимости, ассоциированной с шестикратным появлением опухолей, из которых 2 гистологические формы повторялись дважды. В этой работе не представилось возможность изучить, являются ли эти повторяющиеся формы опухолей моноклональными. В литературе такая возможность пока только обсуждается. Однако обширные внутргенные делеции гена *TP53* отмечены в 7% случаев синдрома, что необходимо учитывать при выборе методов ДНК-диагностики этого гена.

У анализируемых больных РБ нонсенс-мутация и делеции (сдвиг рамки считывания) в гене *RBI* ассоциировались с развитием билатеральной РБ/полифокусным поражением сетчатки/саркомой, которая была наиболее частой второй опухолью. Следует отметить, что ранее было обнаружено, что у больных РБ тяжесть заболевания зависит от типа выявленной мутации [18, 19]. Исходя из полученных данных, саркомы костей и мягких тканей, гемопоэтические опухоли являются высоко гетерогенной группой неоплазий и могут встречаться у детей, и быть результатом как функции измененных мутациями генов, так и специфического лечения.

Мутации в гене *CHEK2* могут predispose к широкому ряду неоплазий разных типов. У пациентов №3-5 с диагностированным синдромом Ли-Фраумени 2 типа, выявленные мутации в гене *CHEK2* обусловили predisposition к развитию разных опухолей,

включая гемопоэтические, солидные опухоли, поражающие почки, кожу, ЦНС и доброкачественные опухоли яичников и молочных желез. Известно, что ген *CHEK2* является одним из основных цепей АТМ-киназы, участвует в фосфорилировании белков опухолевых супрессоров, включая p53 и *BRCA1*, в ответ на повреждение ДНК [20]. Кроме того, было показано, мутации *CHEK2* играют более глобальную роль в predisposition к раку [20].

Интересным является и то, что в рамках одних и тех же нозологических типов неоплазий, генетическая природа их развития может быть различной. Так, мутации в генах *PMS2* и *MLH1* из группы микросателлитной нестабильности (MSI), стали причиной развития у пациентов синдрома Тюрко [21, 22]. У пациентки №6 на основании четких признаков: опухоль ЦНС/множественный полипоз толстой кишки с ранней малигнизацией полипа/кофейные пятна на коже/герминальная мутация в гене *PMS2*/мать (38 лет) — асимптомный носитель аналогичной мутации, установлен синдром Тюрко с аутосомно-рецессивным типом наследования.

У пациента №7 с опухолью головного мозга/множественными «кофейными» пятнами на коже обнаружены две мутации в гене *MLH1* в компунд-гетерозиготном состоянии и также диагностирован синдром Тюрко. Следует отметить, что в семьях, где встречается пациент с синдромом Тюрко, моноаллельная мутация в этих генах ассоциируется с неполной пенетрантностью неполипозного колоректального рака (синдромом Линча) [23]. В данном случае важен скрининг сибсов (братьев и сестер), которые могут подвергаться 25% риску развития синдрома Тюрко с генотипом *PMS2*, *MLH1* [23-25]. Поэтому сибсам-носителям мутации рекомендуется колоноскопия, которую следует рекомендовать на 5 лет раньше возраста проявления рака кишечника у пробанда.

Следует отметить, что обнаружение мутации в гене *FANCN/PALB2* является фактором риска развития в раннем возрасте острого миелоидного лейкоза. Анемия Фанкони — высокогетерогенное заболевание — известно 19 генов, связанных с его развитием, которые участвуют в процессе репарации ДНК, когда клетка не способна исправлять повреждения генома.

### Заключение

Изучение ПМЗО у пациентов с наследственными синдромами, обусловленными вариантами мутаций в специфических генах и в спорадических случаях, выявило схожие типы наиболее часто совместно возникающих опухолей у детей. Мутации в генах *TP53*, *RBI*, *CHEK2*, *FANCN/*



*PALB2*, *PMS2*, *MLH1* ассоциируются с увеличенным риском развития вторых первичных неоплазий, среди которых саркомы, опухоли ЦНС, гемопоэтические опухоли встречаются наиболее часто и возникают в раннем возрасте с разной периодичностью. Молекулярные изменения, модулирующие опухолевый фенотип заболевания, пока до конца не установлены, однако тяжесть течения заболевания и опухолевый фенотип у пациентов может зависеть от типа мутации. Несмотря на то, что для синдромов, ассоциированных с неоплазиями характерна широкая вариабельность клинических проявлений, исходя из полученных данных, знание мутационного статуса пациента может позволить оценить индивидуальный риск развития второго первичного рака.

Анализ возраста возникновения вторых первичных неоплазий показал, что после удаления первой опухоли они могут возникать в любое время. Таким образом, родители детей, перенесших лечение злокачественной опухоли должны знать о риске развития ПМЗО и необходимости ежегодного мониторинга в течение последующей жизни. Среди излеченных от первой опухоли детей мишенями для контроля наиболее вероятного появления последующих новообразований являются: щитовидная железа, костная ткань и молочные железы, как имеющие специфический риск развития метакронного рака. Дети с впервые возникшими гемопоэтическими опухолями могут быть кандидатами для метакронного развития лейкоза и опухолей костной ткани.

Выявлять носителей герминальных мутации, помогает использование новых молекулярных технологий — онкопанели NGS и метода MLPA. Идентификация индивидов со специфической наследственной предрасположенностью к раку значительно влияет на возможность определения риска развития неоплазии, время её возникновения и формирование рекомендаций для потенциального профилактического лечения.

*Конфликт интересов*

*Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки/конфликта интересов, который необходимо обнародовать.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Петров Н.Н. Руководство по общей онкологии. — Л.: Медгиз, 1961. — С. 48-51.
2. Шунько Е.Л. Сравнительный анализ особенностей развития вторых опухолей после химиотерапии, лучевой терапии и химиолучевой терапии первой опухоли // Фундаментальные исследования. — 2015. — № 1 (часть 8). — С. 1539-1543.
3. Ханов А.М. Эпидемиология, факторы риска и оптимизация диагностики при выявлении первично-множе-

ственных злокачественных опухолей: //Дисс. ... канд. мед. наук. Москва, 1994.

4. Billroth T. Die Allgemeine Chirurgische Pathologie and Therapie. 51 Vorlesungen // Ein Handbuch fur Studierende and Arzte. Berlin: G Reimer. — 1889. — P. 934-953.
5. Петров Н.Н. Первичная одиночность и множественность злокачественных опухолей // Злокачественные опухоли. — 1947. — Т. 1. — С. 260-263.
6. Гореликова О.Н. Первично-множественные злокачественные опухоли // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. — 1992. — Т. 3. — № 4. — С. 53-61.
7. Jazbee J., Fraumeni J.F., Curtis R.E. et al. Chapter 1: Introduction. In: Curtis R.E. Freedman D.M., Ron E., Ries L. et al. New Malignancies among Cancer Survivors: SEER Cancer Registries, 1973-2000 // National Cancer Institute; Bethesda, MD. — 2006. — NIH Publ. — No. 05-5302.
8. Мерабишвили В.М. Регистрация и учет больных с первично-множественными злокачественными новообразованиями // Вопросы онкологии. — 2000. — Т. 46. — № 1. — С. 40-43.
9. Howlander N., Noone A.M., Krapcho M. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011 // National Cancer Institute. — Bethesda, MD, 2015. — <http://seer.cancer.gov/csr/>
10. Соркин В.М. К вопросу о регистрации учета больных с первично-множественными новообразованиями // Онкология. — 2001. — № 3. — С. 136-138.
11. Старинский В.В., Петрова Г.В., Харченко Н.В., Грецова О.П. Основные показатели онкологической помощи населению России в 2000 г. // Новые информационные технологии в онкологической статистике / под ред. В.М. Мерабишвили, 2001. — С. 8-9.
12. Haffty B.G., Choi D.H., Goyal S. et al. Breast cancer in young women (YBC): prevalence of BRCA1/2 mutations and risk of secondary malignancies across diverse racial groups // Ann Oncol. —2009. — Vol. 20. — P. 1653-1659.
13. Noh J.M., Choi D.H., Baek H., Nam S.J. et al. Associations between BRCA Mutations in High-Risk Breast Cancer Patients and Familial Cancers Other than Breast or Ovary // J. Breast Cancer. —2012. — Vol. 15. — № 3. — P. 283-287.
14. Sampson J.N., Wheeler W.A., Yeager M., Panagiotou O. et al. Analysis of Heritability and Shared Heritability Based on Genome-Wide Association Studies for Thirteen Cancer Types // J. Natl. Cancer Inst. — 2015. — Vol. 107. — № 12. — P. 279-281.
15. Fritsche L.G., Gruber S.B., Wu Z., Schmidt E.M. et al. Association of Polygenic Risk Scores for Multiple Cancers in a Phenome-wide Study: Results from The Michigan Genomics Initiative // Am J. Hum Genet. — 2018. — Vol. 102. — № 6. — P. 1048-1061.
16. Luberti D., Schwartz D., Almog N. et al. Epithelial cells of different organs exhibit distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis following DNA insult // Exp. Cell Res. — 1999. — Vol. 10. — № 252. — P. 123-133.
17. Li X., Kang J., Pan Q. et al. Genetic analysis in a patient with nine primary malignant neoplasms: a rare case of Li-Fraumeni syndrome // Oncol Rep. — 2016. — Vol. 18. — № 1. — P. 13-19.
18. Казубская Т.П., Козлова В.М., Ушакова Т.Л. и др. Изучение пенетрантности и фенотипа ретинобластомы // Вопросы онкологии. — 2018. — № 2. — С. 234-241.

19. Tomar S., Sethi R., Sundar G. et al. Mutation spectrum of RB1 mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications for genetic management and counselling // *PLoS One*. — 2017. — Vol. 12. — № 6. — P. 1-2.
20. Nevanlinna H., Bartek J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility // *Oncogene*. — 2006. — Vol. 25. — P. 5912–5919.
21. Cybulski C., Górski B., Huzarski T., Masojć B. et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene // *Am. J. Hum. Genet.* — 2004. — Vol. 75. — P. 1131–1135.
22. De Rosa M., Fasano C., Panariello L. et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene // *Oncogene*. — 2000. — Vol. 19. — № 13. — P. 1719–1723.
23. Goodenberger M.L., Thomas B.C., Riegert-Johnson D., Boland C.R. et al. PMS2 monoallelic mutation carriers: the known unknown // *Genet. Med.* — 2016. — Vol. 18. — № 1. — P. 13-19.
24. Walsh T., Casadei S., Lee M.K., Pennil C.C. et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. — 2011. — Vol. 108. — P. 8032–8037.
25. Chadwick R.B., Meek J.E., Prior T.W., Peltomaki P., de La Chapelle A. Polymorphisms in a pseudogene highly homologous to PMS2 // *Hum. Mutat.* — 2000. — Vol. 16. — № 6. — P. 530.

Поступила в редакцию 20.05.2019 г.

*S.N. Mikhaylova<sup>1</sup>, T.P. Kazubskaya<sup>1</sup>, V.M. Kozlova<sup>1</sup>, T.T. Kondrat'eva<sup>1</sup>, E.I. Trofimov<sup>3</sup>, T.S. Belysheva<sup>1</sup>, E.A. Alekseeva<sup>2</sup>, V.V. Strel'nikov<sup>2</sup>, T.L. Ushakova<sup>1</sup>, T.T. Valiev<sup>1</sup>, M.V. Rubanskaya<sup>1</sup>, A.A. Malakhova<sup>1</sup>, E.S. Babij<sup>4</sup>*

#### **Sporadic and hereditary forms of multiple primary malignant tumors in children**

<sup>1</sup>NN Blokhin's National Medical Research Center of Oncology,

<sup>2</sup>Research Center for Medical Genetics,

<sup>3</sup>Scientific Clinical Center of Otorhinolaryngology of FMBA,

<sup>4</sup>First Moscow State Medical University named after IM Sechenov, Moscow

The article presents the features of the clinical manifestation of multiple primary sporadic and heritable malignant tumors in 104 children who observed at Pediatric Oncology and Hematology Research Institute of «NN Blokhin's National Medical Research Center of Oncology» from 1998 to 2012. The age of patients at the time of occurrence of the second malignant tumor ranged from 2.8 to 28 years and averaged 15.6 years. The second neoplasia occurred significantly more frequently in the group of primary hemoblastosis, compared with the group of solid tumors — 8.7% versus 3.4%, respectively ( $p < 0.0001$ ). In children with multiple primaries, were found tumors that occur in common the most frequency. Retinoblastoma patients have an increased risk of developing sarcoma. Patients with Hodgkin's lymphoma have an increased risk of developing leukemia. In surviving children after treatment of the first neoplasia the thyroid, bone tissue and breast have a specific risk for the development of metachronous cancer and are target organs for control. Children with new hematopoietic tumors may be candidates for metachronous development of leukemia and bone tissue tumors. The using methods Next Generation Sequencing (NGS) and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) revealed germinal mutations in 12 children with of multiple primary tumors. The mutations in the *TP53*, *RB1*, *CHEK2*, *FANCN/PALB2*, *MLH1*, *PMS2* genes identified in patients were associated with hereditary syndromes and an increased risk of developing second tumors, among which: sarcomas, brain tumors, hematopoietic tumors were the most frequent. It was shown that the second tumors can appear at the any age. Children who survived the treatment of the first tumor in later life should be monitored annually. Clinical management of children with multiple primary tumors requires a multidisciplinary approach.

**Key words:** primary multiple malignant tumors, mutations *TP53*, *RB1*, *CHEK2*, *FANCN/PALB2*, *MLH1*, *PMS2*