

Т.П. Казубская¹, В.М. Козлова¹, В.В. Стрельников², Н.И. Поспехова⁴,
Е.Н. Лукьянова³, Н.А. Широкова³, Т.Т. Кондратьева¹, И.Н. Соколова¹,
С.М. Михайлова², Е.И. Трофимов⁵

Молекулярная диагностика орфанных синдромов, ассоциированных с множественными неоплазиями у детей

¹«Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина»,

²«Медико-генетический научный центр» РАМН,

³Институт Стволовых Клеток Человека (ПАО «ИСКЧ»),

⁴Государственный научный центр колопроктологии имени А.Н.Рыжих,

⁵Научно-клинический центр оториноларингологии ФМБА,
Москва

Опухоли мозга и саркомы у детей являются гетерогенной группой неоплазий, 7% которых могут быть компонентом синдрома Ли-Фраумени и Ли-Фраумени-подобного синдрома. Установить эти синдромы до молекулярного анализа не всегда возможно, что приводит к поздней диагностике неоплазии и не всегда адекватному лечению. Представлены результаты молекулярно-генетической диагностики заболевания у четырех детей с неоплазиями, возникавшими у них в разных органах и в разные периоды жизни между 2000-2015 г.г. Использование технологий секвенирования нового поколения (NGS), тест-системы MLPA (мультиплексной лигазной пробозависимой амплификации) и секвенирования по Сэнгеру позволило выявить герминальные мутации в гене *TP53* у всех детей и у некоторых клинически здоровых родственников. У одного из детей выявлена мутация в гене *P53*, экзон 7 [с.С742Т (р.Р248W)], унаследованная от отца с первично-множественными злокачественными опухолями и вторая герминальная миссенс-мутация выявлена в гене *PPARG* [с.С254А (р.Р85Q)], которая была унаследована от матери. У второго ребенка выявлены две миссенс-мутации в гене *TP53* в экзоне 6 [с.619G>А (р.Д207N) и с.644G>Т (р.С215I)], унаследованные от матери, которая была здорова. У третьего - *TP53* мутация обнаружена в экзоне 4 [с.С328Т (р.Р110С)], аналогичные мутации выявлены у матери ребенка и ее младшей сестры 4-х лет, которые были здоровы. Обнаруженные мутации могут показывать неполную пенетрантность. У ребенка с внутривенной делецией экзона 10 [с.(1195+11196-(1302+1_1303-1)del,p.(He332 ProfsTer14)] заболевание протекало наиболее агрессивно, с развитием 6 первичных неоплазий. Все выявленные генотипы стали причиной разной тяжести проявления заболевания у детей. Показано, что основанием для тести-

рования мутаций в гене *TP53* у детей является ранний возраст развития сарком, опухолей мозга и первично-множественных неоплазий. Тестирование мутаций *TP53* следует проводить и их родственникам 1-й степени родства. Носители выявленных мутаций *TP53* из-за риска развития других первичных неоплазий должны находиться под активным врачебным наблюдением в течение жизни.

Ключевые слова: саркома, первично-множественные неоплазии, синдром Ли-Фраумени, мутации *TP53*

Введение

Неоплазии являются второй причиной смерти детей в возрасте от 0 до 14 лет и 5 - 10% из этих заболеваний ассоциировано с наследственными синдромами [14]. В отягощенных семьях у пораженных членов могут встречаться однотипные опухоли или опухоли, в локализации которых не удается выявить какой либо закономерности. Например, у детей отмечается склонность к развитию опухолей мозга, костей, рабдомиосарком, аденокарциномы, рака молочной железы, щитовидной железы и др. Такого рода семейные полиорганные раковые синдромы могут ассоциироваться с герминальными мутациями в разных генах, таких как *TP53*, *APC*, *MLH1*, *MSH2*, *CDKN2A*, *CHEK1,2* и *BRCA1,2* [2,5,8]. Одним из таких синдромов является синдром Ли-Фраумени, который был описан в 1969 году и назван по имени авторов. Для диагностики этого синдрома были выделены строгие критерии и определен аутосомно-доминантный тип наследования [9,10]. «Классическими» компонентами этого орфанного (редкого) синдрома являются мягкотканые саркомы, остеосаркомы, опухоли мозга (хориоидкарциномы, чаще глиобластомы), рак молочной железы, острые лейкозы, аденокарциномы, возникающие в раннем воз-

расте (до 45 лет) у родственников 1- и 2-й степени родства [9,10]. Примечательным является то, что компонентами синдрома могут быть другие опухоли, такие как рак желудка, лимфома, меланома, колоректальный рак, опухоль Вилмса, которые возникают в более раннем возрасте в отличие от их спорадических форм [3,6]. Семьи, не отвечающие «классическому» синдрому Ли-Фраумени, называют Ли-Фраумени – подобными [10]. Злокачественные опухоли у детей - наиболее частый признак синдрома Ли-Фраумени и его варианта Ли-Фраумени-подобного синдрома [6,9]. Однако в идентификации этого синдрома стандартной клинической четкости не существует. И при появлении в семье единичного случая саркомы или других редких опухолей установить синдром без молекулярного анализа трудно. Причиной развития синдрома Ли-Фраумени является герминальная (наследуемая) мутация в гене *TP53* (17p13.1). Ген *TP53* относится к классу онкосупрессоров, состоит из 11 экзонов, кодирует протеин p53, который состоит из 393 аминокислотных остатков и 5 доменов. Протеин p53 имеет целый спектр биологических функций, контролируя все клеточные процессы, которые изменяются во время канцерогенеза. У пациентов с синдромом Ли-Фраумени наиболее часто обнаруживаются миссенс-мутации, затрагивающие экзоны 5–8 этого гена, кодирующие центральный сайт-специфический ДНК-связывающий домен протеина p53 [20]. По данным литературы около половины злокачественных опухолей обнаруживают инактивирующие соматические мутации в гене *TP53* [16,18]. Однако герминальная мутация этого гена выявляется не всегда, а немного более чем у 50% семей с «классическим» типом (OMIM #151623) и только у 20-40% - при Ли-Фраумени-подобном синдроме [1,13]. Обнаружено также, что герминальные мутации в других генах могут предрасполагать к возникновению остеосарком и сарком других типов [4,7,11]. Таким образом, саркомы костей и мягких тканей являются высоко гетерогенной группой опухолей, которые редко встречаются у детей и взрослых. Учитывая редкость и гетерогенный характер их проявления, их ранняя диагностика является трудной задачей. Для некоторых пациентов риск продолжительности интервала от первичной медицинской помощи до диагностики может быть намного больше из-за отсутствия адекватного лабораторного тестирования. Было показано, что более чем 7% детей с саркомами могут быть носителями синдрома Ли-Фраумени [15]. Однако при появлении в семье единичного случая саркомы или других редких опухолей установить этот синдром без молекулярного анализа не всегда возможно.

Цель исследования – показать возможности клинического применения новых молекулярных технологий в медико-генетическом консультировании для диагностики орфанных синдромов у детей, ассоциированных с саркомами и первично-множественными неоплазиями. В работе представлены случаи редких злокачественных опухолей, возникающих у детей в разных органах и тканях в разные периоды жизни.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили данные клинико-генетического обследования четырех детей с редкими и первично-множественными неоплазиями, которые лечились в НИИ ДООГ РОНЦ им. Н.Н. Блохина с 2000 по 2015 г.г. Возраст проявления вторых первичных опухолей варьировал с интервалом 7 и 5 лет, третьи – с интервалом 3 года, четвертые - почти 4 года, интервал между пятой и шестой неоплазией занимал только несколько месяцев (таблица 1). Дети и их родители, доступные для обследования родственники были включены в изучение с их согласия.

Материалом для молекулярно-генетических исследований была периферическая венозная кровь. Экстракцию ДНК из лейкоцитов крови проводили стандартными фенол-хлороформным методом. Скрининг мутаций в генах, вовлеченных в канцерогенез, проводился с использованием секвенирования по Сэнгеру, секвенирования нового поколения (Next-Generation Sequencing, NGS), мультиплексной ПЦР лигазно-связанных проб - multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), позволяющей определять число копий фрагмента - делеций/дупликаций (дозу гена).

MLPA проводилась с использованием набора проб SALSA MLPA P056 TP53 (MRC-Holland) согласно протоколу. ДНК гибридизовалась с пробами специфичными к экзонам генов *TP53*, и референсным генам. Далее проводилось лигирование проб и последующая ПЦР с разделением продуктов амплификации на капиллярном электрофорезе. Делеция экзона определялась при отсутствии специфического пика на электрофореграмме и наличии характерных пиков для остальных экзонов и референсных генов.

NGS проводилось на платформе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). Библиотеки фрагментов ДНК готовили, используя технологию Ion Ampliseq, представляющую собой ультрамультиплексную ПЦР. Панель олигонуклеотидов Comprehensive Cancer Panel (Life Technologies) включала смесь из 16000 пар праймеров для одновременной амплификации участков 409 генов, вовлеченных в канцерогенез. Мультиплексную ПЦР и последующие этапы подготовки библиотек фрагментов проводили с использованием набора реактивов Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Life Technologies) по протоколу. Секвенирование проводили на геномном секвенаторе Ion Torrent PGM в чипах серии Ion 318 (Life Technologies). Результаты секвенирования анализировали с использованием программного обеспечения Torrent Suite, в составе: Base Caller (первичный анализ результатов секвенирования); Torrent Mapping Alignment Program - TMAP (выравнивание последовательностей относительно референсного генома NCBI build 37 - hg19); Variant Caller (анализ вариаций нуклеотидных последовательностей). Аннотацию функционального значения генетических вариаций и фильтрацию известных полиморфизмов с использованием базы данных dbSNP проводили с помощью компьютерной программы ANNOVAR. Визуальный анализ данных, ручную фильтрацию артефактов секвенирования и выравнивания последовательностей осуществляли с использованием программы Integrative Genomics Viewer – IGV. Для исклю-

чения артефактов геномного секвенирования проводили валидацию мутаций, выявленных при скрининге. Применяли метод прямого секвенирования индивидуальных ПЦР-продуктов праймеров, фланкирующих области конкретных мутаций, на автоматическом генетическом анализаторе ABI PRISM 3100 (Life Technologies) по протоколам производителя (рис.1).

Результаты и обсуждение

В нашем исследовании представлены 4 пациента с риском наследственного синдрома Ли-Фраумени (табл.1).

Пациент 1. У ребенка впервые диагностирована PNET/RMS (паравертебральная эмбриональная злокачественная опухоль сложного строения) уровня Th10-11 в 3 года 4 месяца (рис.2). Через 7 лет динамического наблюдения обнаружены синхронные вторые первичные опухоли: остеосаркома (хондробластный вариант) нижней стенки правой орбиты и редкая мезенхимальная опухоль из переваскулярных эпителиоидных клеток печени (ПЕКкома печени). У отца ребенка (рис.2) в 34 года синхронно диагностированы рак прямой кишки и В-клеточная лимфома (генерализованная форма), в 38 лет В-клеточная лимфома с поражением лимфоузлов шеи и средостения, а в 42 года обнаружена опухоль мозга. У деда по линии отца в 75 лет удалена аденома предстательной железы. По линии матери только прабабушка в 60 лет лечилась от рака поджелудочной железы.

И хотя в этой семье присутствовали клинические критерии для определения синдрома Ли-Фраумени, 7 лет назад молекулярное исследование у ребенка не проводилось. В настоящее время, с появлением новых технологий в молекулярных исследованиях, для тестирования мутаций стало возможным использование NGS-платформы. Для подтверждения наследственного характера малигнизации у ребенка была использована мультигенная онкопанель, позволяющая секвенировать одновременно 409 высоко- и низкопенетрантных генов. В результате у ребенка и его отца обнаружена патологическая мутация гена *TP53* в экзоне 7 [(с.С742Т (р.Р248W)] (OMIM 191170.0001). При этом, неожиданной находкой стала выявленная у ребенка вторая герминальная миссенс-мутация (с.С254А (р.Р85Q) в гене *PPARG* (*PPARGgamma* - peroxisome proliferators – activated receptor gamma) (OMIM 601487/0001). Ген *PPARG*, является гамма изоформой семейства активаторов рецепторов пролиферации пероксисом [12,19,21]. Ключевая функция этого гена заключается в дифференцировке адипоцитов, макрофагов, участии в глюкозном и жировом гомеостазе. Было показано, что, как фактор транскрипции, ген *PPARG*, участвует в процессе канцерогенеза соматических клеток, и мутация в

этом гене может играть роль в развитии опухоли мозга, рака толстой кишки [17,23]. Можно предположить возможность вовлечения нарушенной функции этого гена в инициацию и прогрессию заболевания у ребенка совместно с мутацией в гене *TP53*. Однако патогенность выявленной мутации не достаточно ясна, но известно, что изменения в *PPARG* ассоциированы с риском ожирения, начиная с детского возраста [12,19,22]. У клинически здоровой матери ребенка была выявлена аналогичная мутация. На момент обследования у нее имелись все клинические признаки ожирения 2-й степени.

Принимая во внимание носительство мутации в гене *PPARG*, ребенку также показан контроль уровня глюкозы и инсулина крови в динамике, рациональное питание с учетом индивидуальных особенностей организма. Патологическая мутация в гене *TP53* унаследована ребенком от отца и имеет доминантный тип наследования. Интересно отметить также наблюдаемую в семье выраженную генетическую «антиципацию» – возраст диагностики у отца первой неоплазии – 34 года, а у его сына в 3 года 4 месяца – опухоль PNET/RMS.

Пациент №2. У второго ребенка первая опухоль – эмбриональная рабдомиосаркома левой орбиты диагностирована в 4 года, вторая – В-клеточная диффузная лимфома кишечника

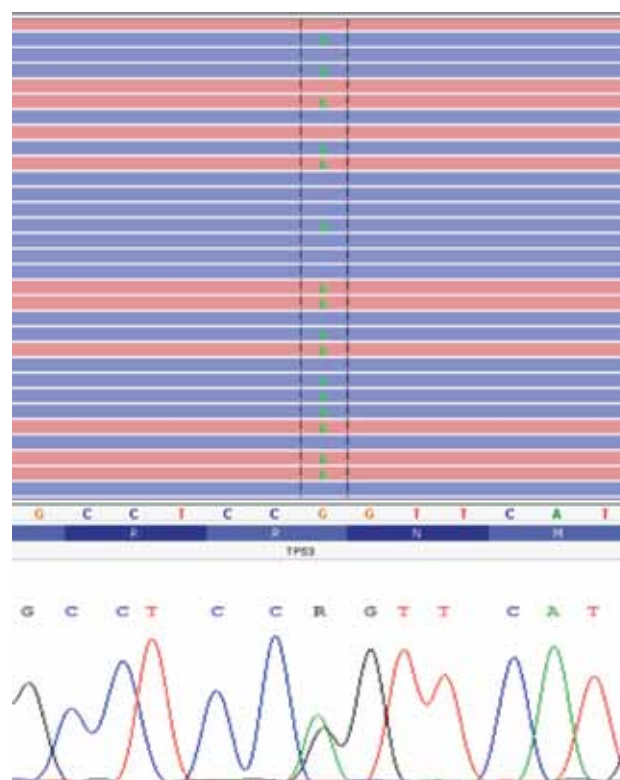


Рис. 1. Пример выявления мутации в гене *TP53* Мутации (TP53:NM_000546:exon7:c.С742Т:р.Р248W, гетерозигота) методом высокопроизводительного параллельного секвенирования на платформе Ion Torrent и валидации секвенированием по Сэнгеру.

Таблица 1. Тип опухоли у пациентов, возраст диагностики первых и последующих неоплазий, возраст к моменту тестирования и использованные методы генетического тестирования

№ пациента возраст развития неоплазии	Тип первой неоплазии	Тип второй неоплазии	Типы третьей и последующих опухолей	Генетическое тести- рование	Методы молекуляр- ного тестирования
№1 3 года 4 мес.	Паравертебраль- ная эмбриональная злокачественная опухоль сложного строения PNET/RMS уровня Th10-11				
10 лет 5 мес.		Синхронные остеосаркома (хондробласт-ный ва- риант) нижней стенки правой орбиты и ПЕКома печени		миссенс-мутация [с.С742Т (р.Р248W)] экзон 7 гена TP53 в гетерозиготном со- стоянии миссенс-мутация (р.Р85Q) в гене PPARG	Таргетное секвенирование ДНК мутаций в 409 генах
№2 4 года	Эмбриональная раб- домиосаркома левой орбиты.				
9 лет		В-клеточная диф- фузная лимфома кишечника			
11 лет 11 мес.			Хондробластичес- кая остеосаркома левой ключицы	мутаций не обнаружено	Секвенирование по Сэнгеру
15 лет 9 мес.			Эмбриональная рабдомиосаркома области шеи	мутаций не обнаружено	(NGS) расширенная онкопанель
16 лет			Хондробластичес- кая остеосаркома крестца	зарегистрирована одна копия экзона 10 гена TP53, - делеция экзона 10: с.(1195+1_1196-1) (1302+1_1303-1)del, р.(Ile332 ProfsTer14) в гетерозиготном состо- янии.	MLPA (мультип- лексная лигазная пробозависимая амплификация)
№3 2 года 5 мес.	Атипичная терато- идно-рабдоидная опухоль (АТРО)III желудочка мозга			две миссенс-мутации [(с.619G>А р.Д207N) и с.644G>Т (р.С215I)] в экзоне 6 TP53 в гетерозиготном со- стоянии	Секвенирование по Сэнгеру
16 лет 3 мес.			Миелодиспласти- ческий синдром		
№4 7 лет 9 мес	Хориоидкарцино-ма правого бокового желудочка мозга			миссенс-мутация [с.С328Т (р.Р110С)] экзон 4 гена TP53 в гетерозиготном со- стоянии	Секвенирование по Сэнгеру

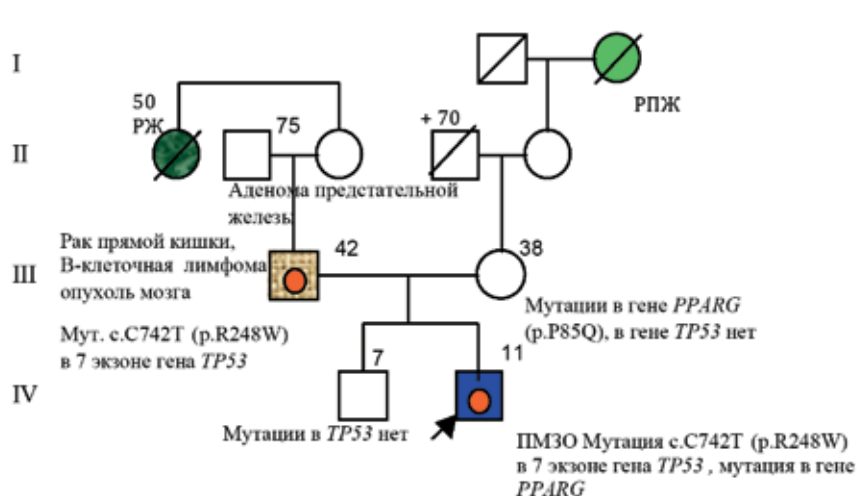


Рис. 2 (а)

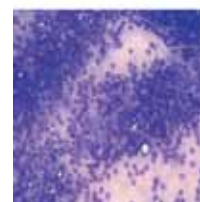


Рис.2 (б)

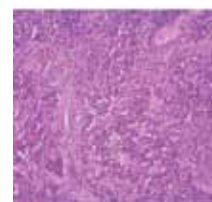


Рис. 2. Родословная пациента №1, результаты генотипирования, Легенда: РЖ- рак желудка; РПЖ- рак поджелудочной железы; ПМЗО – первично-множественная злокачественная опухоль

Рис. 2 (а). Цитологическая картина паравертебральной эмбриональной злокачественной опухоли к PNET/RMS X20
Рис. 2 (б). Гистологическая картина (PNET/RMS) у ребенка 3 лет 4 месяца – носителя мутации в гене TP53

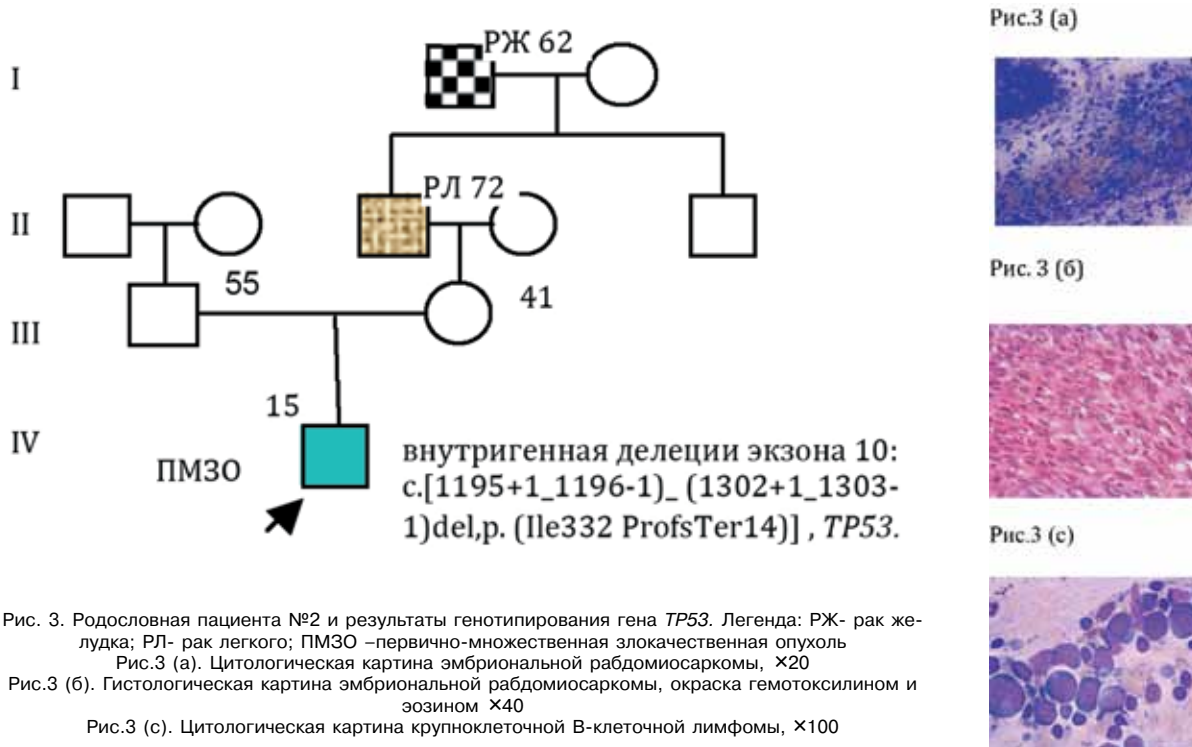


Рис. 3. Родословная пациента №2 и результаты генотипирования гена *TP53*. Легенда: РЖ- рак желудка; РЛ- рак легкого; ПМЗО –первично-множественная злокачественная опухоль
 Рис.3 (а). Цитологическая картина эмбриональной рабдомиосаркомы, $\times 20$
 Рис.3 (б). Гистологическая картина эмбриональной рабдомиосаркомы, окраска гематоксилином и эозином $\times 40$
 Рис.3 (с). Цитологическая картина крупноклеточной В-клеточной лимфомы, $\times 100$

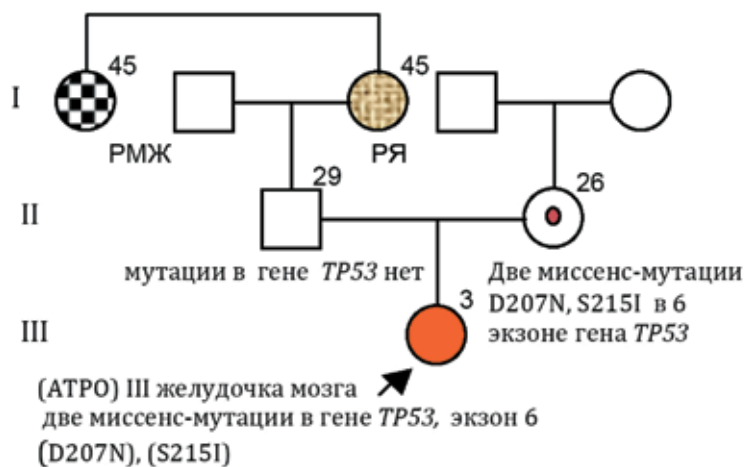


Рис. 4. Родословная пациента № 3 и результаты генотипирования гена *TP53*.
 Легенда: РМЖ- рак молочной железы; РЯ- рак яичников

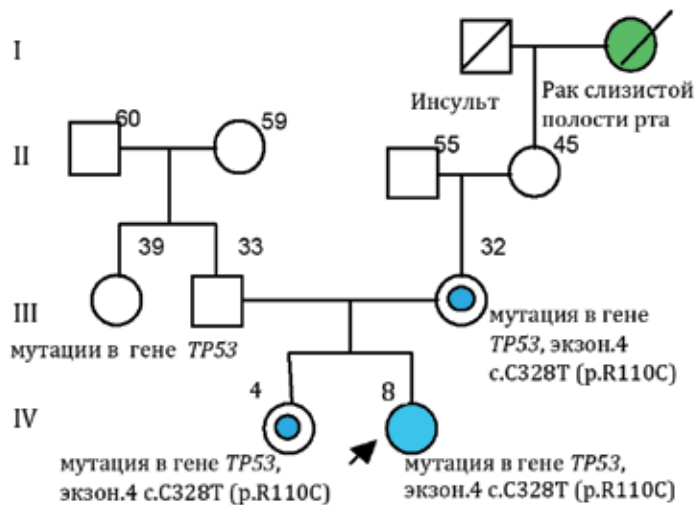


Рис 5. Родословная пациента №4 и результаты генотипирования гена *TP53*

обнаружена в 9 лет (табл.1). В 11 лет 11 месяцев диагностирована остеосаркома (хондробластный вариант) левой ключицы. Проведено исследование ДНК гена *TP53* методом секвенирования по Сэнгеру, мутации не было обнаружено. В 15 лет 9 месяцев диагностирована 4-я неоплазия - эмбриональная рабдомиосаркома области шеи и остеосаркома (хондробластный вариант) крестца в 16 лет, и в 16 лет 3 месяца диагностирован миелодиспластический синдром (рис.3). Исследование ДНК гена *TP53* с использованием высокопроизводительного секвенирования (NGS) проведено в 15 лет – мутаций у ребенка также не выявило. Несмотря на то, что тестирование гена *TP53* с использованием разных методов было негативным, имеющийся у ребенка полиорганный раковый синдром стал причиной дальнейшего поиска герминальных мутаций в гене *TP53*. Для этой цели был использован метод MLPA, позволяющий определять число копий фрагмента (дозу гена) всех экзонов гена *TP53*. В результате была выявлена редкая мутация в гене *TP53* – большая внутригенная делеция экзона 10: с.[1195+1_1196-1]_(1302+1_1303-1)del,p.(Pе332ProfsTer14)]. Выявленная делеция экзона 10 привела к потере большей части тетрамеризационного домена и почти всего С-концевого регуляторного домена протеина p53, что дестабилизировало тетрамерную структуру белка.

В семье пациента были указания на злокачественные опухоли по линии матери: у деда (рак легкого в 72 г.), у прадеда (рак желудка в 60 лет) (рис.3). Родители ребенка на момент обследования были клинически здоровы, от обследования отказались. Происхождение мутации неизвестно, однако с большей вероятностью можно предположить, что выявленная делеция у пробанда произошла *de novo*.

Пациент № 3. У ребенка в 2 года 5 месяцев диагностирована атипичная тератоидно-рабдоидная опухоль (АТРО) III желудочка мозга. Семейная отягощенность наблюдалась только по линии отца, рак яичников в 45 лет (у бабушки), рак молочной железы в 45 лет (у двоюродной бабушки), рак толстой кишки в 60 лет (у прадеда) (рис.4). Учитывая семейный анамнез и ранний возраст развития опухоли мозга, был заподозрен наследственный синдром. Ребенку и его родителям проведено молекулярное тестирование ДНК гена *TP53* методом секвенирования по Сэнгеру. У ребенка выявлены две миссенс-мутации в гене *TP53* в экзоне 6 [(с.619G>A p.D207N) и с.644G>T (p.S215I)] в гетерозиготном состоянии. К настоящему времени каждая из этих мутаций обнаружена только в соматических клетках и такие герминальные мутации в литературе не описаны. Биоинформатический анализ (IARC TP53 Database) указывает на пато-

генность данных аминокислотных замен в гене *TP53*. Тем не менее, клиническая значимость выявленных мутаций (D207N и S215I) пока недостаточно ясна, её предстоит установить в процессе наблюдения за семьей. У отца мутации не обнаружено. Интересным является то, что аналогичные миссенс-мутации в гене *TP53* обнаружены у матери 26 лет (рис. 4), которая на момент обследования была практически здорова. Это является важным признаком неполной пенетрантности проявления выявленных мутаций и вариабельности фенотипического проявления заболевания. С другой стороны, их патологическая реализация может проявиться в любом возрасте, поэтому мать нуждается в наблюдении врачей разных специальностей для раннего выявления неоплазий, характерных для этого синдрома, и определения тактики лечения.

Ребенок унаследовал патологические мутации от матери, которая имеет высокий риск развития неоплазий в течение жизни. В случае планирования в семье деторождения, возможно проведение пренатальной инвазивной диагностики – биопсии хориона на 9-10 неделе беременности с целью анализа ДНК на мутации гена *TP53* у плода.

Пациент 4. У пробанда в 7 лет 9 месяцев диагностирована хориоидкарцинома правого бокового желудочка мозга (рис.5). В семье указаний на злокачественные опухоли у родственников не было. Однако опухоль мозга в раннем возрасте является одним из критериев синдрома и ребенку выполнено тестирование гена *TP53*. Обнаружена патологическая мутация гена *TP53* в экзоне 4 [с.C328T (p.R110C)]. У матери ребенка и ее второй, младшей дочери 4-х лет при тестировании также обнаружена аналогичная патологическая мутация в гене *TP53*, экзон 4 [с.C328T (p.R110C)].

Мать и младшая сестра - носительницы герминальной мутации и отец на момент обследования были здоровы. Обе дочери унаследовали мутацию от матери. Следует отметить, что поскольку 32-летняя мать является клинически здоровой носительницей мутантного гена, выявленная у нее мутация имеет неполную пенетрантность. Однако носительство патологической мутации является маркером высокого риска предрасположенности к развитию различных злокачественных неоплазий. Родители должны быть проинформированы об имеющемся риске и необходимости регулярного врачебного наблюдения, модификации образа жизни, заключающейся в ограничении влияния негативных факторов среды, оптимизации двигательной активности и рационального питания.

Изученные пациенты и их семейный анамнез показали, что классическим критериям синдро-

ма Ли-Фраумени отвечала только одна из рассматриваемых семей. Развившиеся в раннем возрасте разные подтипы сарком, их множественное повторное появление у пациентов и редкие опухоли мозга, манифестировавшие в раннем возрасте, стали причиной тестирования гена *TP53*. Новые молекулярные технологии, использованные при идентификации мутаций в этих семьях, позволили выявить во всех четырех случаях синдром Ли-Фраумени, наследуемый по аутосомно-доминантному типу. Интересным является то, что у детей из анализируемых семей, обнаружены мутации в гене *TP53*, которые по своим функциональным последствиям, по тяжести проявления заболевания, не идентичны. Как видно из приведенных выше случаев, фенотип заболевания у пациента 2 – наиболее тяжелый, связан с делецией большей части тетрамеризационного домена и почти всего С-концевого регуляторного домена протеина p53. Это привело к многократному появлению неоплазий у ребенка, начиная с 4-х летнего возраста.

Результаты молекулярного тестирования необходимо использовать при принятии клинического решения об индивидуальном лечении пациентов. Большинство мутаций в гене *TP53* связаны с потенциальной устойчивостью к препаратам платины, метилирующим агентам, антрациклинам, винкаалкалоидам, подофиллотоксинам и чувствительны к таксанам, ингибиторам топоизомеразы I, эпотилонам и этилирующим агентам. Следует отметить, что лучевая терапия у носителей мутации с синдромом противопоказана из-за высокой чувствительности к ионизирующей радиации, которая может индуцировать вторые первичные опухоли у таких пациентов.

Заключение

Основанием для тестирования мутаций в гене *TP53*, ассоциированных с синдромом Ли-Фраумени и его подтипа, является ранний возраст развития разных типов сарком, других редких опухолей, в том числе опухоли мозга и первично-множественных опухолей у детей.

Все носители выявленных мутаций *TP53* должны находиться под активным врачебным наблюдением. Дети, у которых неоплазия излечена, из-за высокого риска вторых первичных неоплазий, должны оставаться под наблюдением онколога не менее 30 лет от момента диагностики первой опухоли.

Выявленная герминальная мутация у клинически здоровых матерей пациентов свидетельствует о том, что неполная пенетрантность является важным признаком этой мутации и диктует необходимость тестирования родственников из таких семей. Для ранней диагностики неоплазии

у клинически здоровых носителей патологических мутаций необходим клинический контроль с участием врачей разных специальностей.

Внедрение в клиническую практику современных молекулярно-генетических технологий, несмотря на их высокую стоимость, открывают новые возможности пресимптоматической идентификации лиц с наследственной предрасположенностью, ассоциированной с высоким риском развития рака. Кроме того, это позволяет своевременно выбрать стратегию наблюдения за ними для ранней и доклинической диагностики неоплазий, проведения адекватного лечения на различных этапах жизни, повысить качество медико-генетического консультирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ. et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families // *Cancer Res.* – 1994. – Vol.54. – P.1298-304.
2. Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E. et al. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification // *Br J Cancer.* – 2004. – Vol. 91. – №6. – P.1155-1159. – doi: 10.1038/sj.bjc.6602121.
3. Evans DG, Wu CL, Birch JM. BRCA2: A cause of Li-Fraumeni-like syndrome // *J Med Genet.* – 2008. – Vol.45. – P.62-63.
4. Foulkes WD, Priest JR, Duchaine TF. DICER1: mutations, micrnas and mechanisms // *Nat Rev Cancer.* – 2014. – V.10. – P.662-72. – doi: 10.1038/nrc3802.
5. Goncalves A, Ewald IP, Sapienza M. et al. Li-Fraumeni-like syndrome associated with a large BRCA1 intragenic deletion // *BMC Cancer.* – 2012. – Vol.12. – №1. – P.237-9. – doi: 10.1186/1471-2407-12-237.
6. Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF.Jr, Li FP. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome // *J Nat Cancer Inst.* – 1998. – Vol.90. – P.606-611.
7. Kansara M, Teng MW, Smyth MJ, Thomas DM. Translational biology of osteosarcoma // *Nat Rev Cancer.* – 2014. – Vol.14. – №-11. – P.722-35. – doi: 10.1038/nrc3838.
8. Krepsich AC, Pearson PL, Rosenberg C. Germline copy number variations and cancer predisposition // *Future Oncol.* – 2012. – Vol.8. – № 4. – P.441-450. – doi: 10.2217/fon.12.34.
9. Li FP, Fraumeni JF.Jr. Prospective study of a family cancers syndrome // *JAMA.* – 1982. – Vol.247. – P.2692-2694.
10. Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ. et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds // *Cancer Res.* – 1988. – V.48. – №18. – P.5358-5362.
11. Malkin D, Li F. et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms // *Science.* – 1990. – Vol.250. – P.1233-1238.
12. Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA. et al. Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol.277. – № 29. – P.26089-97.

13. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes // *Oncogene*. – 2004. – Vol.23. – №38. – P.6445–6470. – doi: 10.1038/sj.onc.1207714.
14. Narod SA, Stiller C, Lenoir GM. An estimate of the heritable fraction of childhood cancer // *Br J Cancer*. – 1991. – Vol.63. – P.993–999.
15. Nichols KE, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF, Jr, Li FP. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. – 2001. – Vol.10. – P.83–7.
16. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2008. – Vol.9. – №5. – P.402–12. – doi: 10.1038/nrm2395.
17. Sarraf P, Mueller E., Smith W. M., Wright H. M. et al. Loss-of-function mutations in PPAR-gamma associated with human colon cancer // *Molec. Cell*. – 1999. – №3. – P.799–804.
18. Soussi and C. B'eroud. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome // *Nature Reviews Cancer*. – 2001. – Vol.1. – № 3. – P. 233–240.
19. Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*. – 2002. – Vol.51. – № 7. – P.2045–55.
20. Uberti 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.123–33.
21. Valve R., Sivenius K., Miettinen R. et al. Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women // *J Clin Endocrinol Metab*. – 1999. – Vol.84. – №10. – P.3708–12.
22. Zhelankin A.V., Sazonova M.A., Khasanova Z.B. et al. Analysis of mitochondrial haplogroups in persons with subclinical atherosclerosis based on high-throughput mtDNA sequencing // *Patol Fiziol Eksp Ter*. – 2015. – Vol.59. – № 1. – P.12–6.
23. Zhou XP, Smith WM, Gimm O, Mueller E. et al. Overrepresentation of PPARgamma sequence variants in sporadic cases of glioblastoma multiforme: preliminary evidence for common low penetrance modifiers for brain tumour risk in the general population // *J Med Genet*. – 2000. – Vol.37. – №6. – P. 410–4.

Поступила в редакцию 30.08.2016 г.

T.P.Kazubskaya¹, V.M.Kozlova¹, V.V.Strel'nikov², N.I.Posp'ekhova⁴, E.N.Lukiyanova³, N.A.Shirokova³, T.T.Kondratieva¹, I.N.Sokolova¹, S.M.Mikhaylova¹, E.I.Trofimov⁵

Molecular diagnosis of orphan syndromes associated with numerous types of cancer in children

¹N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center

² Research Center for Medical Genetics

³ Human Stem Cell Institute

⁴ A.N.Ryzhikh State Scientific Center of Coloproctology

⁵ Scientific Clinical Center of Otorhinolaryngology, Moscow

Sarcomas and brain tumors in children are a heterogeneous group of tumors, more than 7% of which may be a component of the Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes. The recognition these syndromes prior the adequate molecular testing is not always possible. This leads to late the diagnosis of tumor and not always adequate treatment. There are presented results of the molecular genetics diagnosis of the disease in four children with neoplasm arising in different organs and different periods in their life, between 2000 and 2015. Based on next-generation sequencing (NGS), test systems multiplex ligation-dependent probe amplification, Segner's sequencing were detected a germline mutations of TP53 gene in all children and some their relatives. Mutation in the gene TP53, exon 7, c.C742T (p.R248W) was revealed in one of these children, which inherited from his father affected multiple primary tumors. Besides, in this child discovered the second germinal missense mutation in the gene PPARG c.C254A (p.P85Q), which inherited from the mother. Two missense mutations in the TP53 gene, exon 6 [c.619G> A (p.D207N) and c.644G> T (p.S215I)] identified in the second child, that inherited from the unaffected mother. The TP53 mutation exon 4, s.C328T (p.R110C) was revealed in the third child and the same mutations were detected in the child's mother and her 4 years old sister, who were healthy. Detected variants mutations indicated incomplete penetrance. The disease of the fourth child with intragenic deletion of exon 10 [c. (+ 11196- 1195 (1302 + 1_1303-1) del, p. (Ile332 ProfsTer14)] had the most aggressive course, with the development of 6 primary neoplasm. All identified genotypes had led to varying severity of disease symptoms in children. It is showed that the basis for the testing of mutations in the TP53 gene in children is early age of sarcomas, brain tumors and multiple primary neoplasms. Genetic TP53 testing should be offered their first-degree relatives. Because carriers of TP53 mutations have the risk of the other primary malignancy, they should be under active medical observing for life.

Key words: sarcoma, multiple primary neoplasm, Li-Fraumeni syndrome, TP53 mutations