

Т.П. Казубская<sup>1</sup>, В.М. Козлова<sup>1</sup>, Т.Л. Ушакова<sup>1</sup>, Е.А. Алексеева<sup>2</sup>,  
В.В. Стрельников<sup>2</sup>, В.А. Яровая<sup>3</sup>, Е.И. Трофимов<sup>4</sup>, С.Н. Михайлова<sup>1</sup>,  
Л.Н. Любченко<sup>1</sup>

## Изучение пенетрантности и фенотипа ретинобластомы

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,  
<sup>2</sup>«Медико-генетический научный центр» РАМН,  
<sup>3</sup>«МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ,  
<sup>4</sup>ФГБУ «Научно-клинический центр оториноларингологии» ФМБА,  
Москва

В статье представлена клиничко-генетическая характеристика наследственных форм ретинобластомы (РБ). Тестирование мутаций в гене *RB1* было проведено у 85 детей с РБ и 156 их родственников. Использование секвенирования нового поколения (NGS), тест-системы MLPA (мультиплексной лигазозависимой амплификации) позволило выявить герминальные мутации у 96,4% (27/28) детей с бинокулярной РБ и у 21% (12/57) с монокулярной РБ. У больных обнаружены различные типы мутаций в гене *RB1* и изучена соответствующая им клиническая картина заболевания. В большинстве случаев наследственная РБ развивается с высокой пенетрантностью и заболевание протекает в тяжелой форме. Однако при некоторых типах мутаций РБ имеет неполную пенетрантность и экспрессивность и может протекать в более мягкой форме. В семьях носителей мутаций сайта сплайсинга: с.607+1G>T (интрон 6); с.1422-8delT (экзон 16); g.61807 G>A (экзон 9); миссенс-мутации: с.1364 G >C (14 экзон); с.1981 C >T (20 экзон), унаследованных от непораженных отцов, носителей этих мутаций, отмечалась неполная пенетрантность проявления заболевания. Среди всех протестированных детей герминальные мутации выявлены в 45,8% (39/85), которые в 41% (16/39) случаев локализовались в экзонах 12-18,19-23. Один случай мозаичной мутации в гене *RB1* был обнаружен у ребенка с монокулярной РБ. Спектр выявленных мутаций указывает на важность генетического тестирования всех пациентов с РБ, которое позволяет выявлять бессимптомных носителей низкопенетрантных мутаций, герминальный мозаицизм, осуществлять раннюю диагностику и индивидуальное планирование лечения.

**Ключевые слова:** ретинобластома, мутации в гене *RB1*, пенетрантность

## Введение

Злокачественные новообразования у детей являются одной из наиболее сложных медико-социальных проблем. Они могут быть наследственными и ненаследственными, могут быть компонентом синдромов с различными типами наследования. Ретинобластома (РБ) наиболее распространенная первичная интраокулярная злокачественная опухоль сетчатки глаза нейроэктодермального происхождения. Характеризуется высокой степенью злокачественности, являясь истинно детской опухолью, возникает чаще всего у детей до трёх — пяти лет или внутриутробно. Распространённость в мире колеблется от 1:18000 до 1: 30000 новорожденных детей, однако в последнее время отмечается увеличение количества больных с РБ, причем возрастает и частота билатерального поражения глаз [1]. Развитие наследственной РБ и большинство ненаследственных её форм обусловлено мутацией онкосупрессорного гена *RB1*, который играет ключевую роль в контроле клеточного цикла, локализуется на длинном плече хромосомы 13(13q14.2).

При наследственной РБ мутация в одном аллеле гена *RB1* происходит в половой клетке одного из родителей, она может быть унаследованной или возникнуть *de novo* и наследуется по аутосомно-доминантному типу. Мутация *de novo* в гене *RB1* является причиной 15% случаев односторонних ретинобластом и каждый носитель передает эту мутацию 50% потомкам [2, 16, 17]. Чаще мутации *de novo* могут возникать в процессе сперматогенеза и эмбриогенеза. Во время сперматогенеза, будущие половые клетки активно делятся, начиная превращаться в сперматоциты, и, как полагают, в это время высока возможность мутации, но этого не происходит во время оогенеза [8,26]. В процессе эмбриогенеза мутации происходят на ранних этапах постзиготических рекомбинаций развития эмбриона, в результате только часть его клеток несет мутацию в гене *RB1*. Такие мутации имеют мозаич-

ный характер, так как первоначальные мутации имеются не во всех, а только в некоторых клетках тела [6]. Согласно литературным данным, мозаичные мутации гена *RB1*, при билатеральной РБ встречаются с частотой 5,5%, при монолатеральной — в 3,8% [3, 20].

В наследственном случае каждая клетка будущего ребенка несет мутантный аллель гена *RB1*. Если такую мутацию находят в периферической крови ребенка, это подтверждает наследственный характер РБ. При таких мутациях опухоль может развиваться, только если во втором аллеле этого гена произойдет независимая мутация в клетках сетчатки глаза. Схематически это можно представить так, как например, инактивирующая мутация обоих аллелей гена приводит к потере онко-супрессорной функции гена *RB1*, далее к утрате контроля деления клетки, к активации протоонкогенов, в конечном итоге к опухолевой прогрессии. При ненаследственной РБ мутации в обоих аллелях гена *RB1* происходят только в клетках сетчатки глаза, которые обнаруживаются в опухолевой ткани (соматические мутации). Недавние исследования показали, что мутация гена *RB1* в опухолевой ткани является причиной 97% РБ и не обнаруживается в остальных 3% заболевания [6]. Было установлено, что в инициации или прогрессии РБ определенную роль могут играть другие гены [13, 19]. Так у 2% детей с несемейной унилатеральной РБ и неизменным геном *RB1* была обнаружена амплификация онкогена *MYCN* (вместо двух копий ДНК наблюдается от 28 до 120 копий). Возраст развития РБ у этих детей был в среднем 4,5 месяцев [15, 19]. Кроме того, у пациентов с РБ при гистологическом исследовании находят элементы ретином и было показано, что развитие доброкачественной ретиномы может вызывать потеря обоих аллелей *RB1* и модифицирующей причиной её прогрессии к ретинобластоме являются другие гены [7].

Указанием на комплексность молекулярных изменений в развитии РБ являются обнаруженные эпигенетические изменения в экспрессии разных генов. Установлено нарушение регуляции протоонкогена *SYK* (spleen tyrosine kinase) и было предположено, что эпигенетическая модификация экспрессии (метилование) гена *SYK* требуется для выживания клеток РБ [18, 25]. Полногеномное секвенирование опухолевой ткани РБ обнаружило специфические изменения в числе копий других генов, увеличение до 4-10 копий в онкогенах *MDM4*, *KIF14* (1q32), *MYCN* (2p24), *DEK*, и *E2F3* (6p22) и потерю гена-супрессора *CDH11* (16q22-24) [5,22].

У гетерозиготных носителей мутации в гене *RB1* РБ развивается в 90% (ген с высокой пенетрантностью) и в этих случаях рак возникает в

раннем возрасте, поражает два глаза и опухоль имеет много (4-5) фокусов. В некоторых семьях наблюдается снижение пенетрантности и экспрессивности заболевания. В этих случаях РБ протекает в более мягкой форме, опухоль ограничена одним глазом, возникает в более позднем возрасте (после года жизни) и у части носителей мутации заболевание не развивается. Диагностика заболевания у носителей таких мутаций особенно важна из-за необходимости определения риска передачи заболевания потомкам.

Используемая цитогенетическая диагностика позволяла выявлять видимые структурные изменения (делеции) в длинном плече хромосомы 13q только у 6–10% больных РБ. Совершенствованием методов молекулярных исследований значительно улучшили идентификацию носителей мутации, облегчили генетическую консультацию. У носителей мутаций *RB1* имеется высокий риск метастазирования, развития вторых первичных опухолей. Качество жизни больных РБ зависит от ранней диагностики опухоли. Использование генетического тестирования открывает возможность выявлять заболевание на ранней стадии, выбрать тактику ведения больного, осуществлять профилактику наследственных форм РБ.

Цель работы изучить особенности клинического проявления РБ в зависимости от выявленных у них молекулярно-генетических изменений на примере детей, наблюдаемых в ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина» с 2010 по 2016 гг.

## Материалы и методы

Проведено полное клинико-генетическое обследование и изучена офтальмоскопическая картина РБ у 235 больных детей, которые лечились и наблюдались в НИИ ДОиГ РОНЦ им. Н.Н. Блохина между 2010 и 2016 гг. Получены клинико-генеалогические данные 256 родственников из 235 семей этих больных. Молекулярно-генетический анализ гена *RB1* проведен на образцах ДНК у 85 пробандов (57 с монокулярной и 28 с бинокулярной РБ) и у 156 родственников 1-й степени родства (родителей, сибсов — братьев и сестер) из этих семей. Диагностика РБ проводилась стандартными офтальмологическими и гистологическими критериями. Молекулярный анализ ДНК гена *RB1* проводился на лимфоцитах периферической крови. Образцы крови у всех пациентов были собраны с информированного согласия самих пациентов и/или их родителей. ДНК из цельной периферической крови выделялась с помощью набора QIAampDNA Blood Mini Kit (Qiagen) на автоматической станции QIAcube (Qiagen). Поиск точковых мутаций, делеций/инсерций в гене *RB1* проводился с использованием секвенирования нового поколения (NGS). Подготовка библиотек для секвенирования и формирование библиотек фрагментов генома, содержащих кодирующие последовательности генов и прилежащие интронные участки, выполнялись с использованием технологии AmpliSeq по рекомендуемым производителем протоколам, на приборах Thermo Fisher Scientific. Высокопроизводительное секвенирование проводили на приборе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США) и IonS5 (Thermo Fisher Scientific) по протоколам производи-

теля. С целью валидации выявленных мутаций применялся метод секвенирования по Сэнгеру. Для анализа количества копий гена *RBI*, с целью выявления протяженных делеций в гене, использовался метод мультиплексной лигазависимой амплификации (MLPA).

### Результаты и обсуждение

Изучение клинико-генеалогических данных родственников из семей 235 пробандов позволило диагностировать 256 больных РБ. Из них бинокулярные формы заболевания выявлены у 34,8% (89 больных). Семейная форма РБ идентифицирована в 23 из 235 семей, что составило 9,7%. Из 167 больных с монокулярной РБ, у которых предполагался спорадический характер заболевания, дальнейшее обследование у 5 из них выявило семейную форму. Возраст диагностики РБ в группе анализируемых детей представлен в табл. 1. Возраст манифестации монокулярной РБ составил 18,6 месяца и варьировал от 0,1 до 54 мес. и у одного из них — до 97 мес. (18,6±1,6 мес.). Возраст диагностики первых признаков заболевания в группе с бинокулярной РБ составил 8,7 месяца (8,7±2,1 мес.) и заболевание манифестировало до 1 года в 78% случаев. У четырех детей во время наблюдения спустя 8-14 мес. развилось метакхронное поражение второго глаза, что не учитывалось при изучении возраста диагностики заболевания.

Изучение клинической картины заболевания у детей показало, что при односторонней РБ наблюдаются врожденные пороки развития, такие как врожденный гидронефроз, тетрада Фалло (2/167). Кроме того, у 5 из всех обследованных детей, монокулярная РБ возникла на

фоне наследственных заболеваний и хромосомных синдромов: синдрома Дауна (трисомная форма), синдрома Орбели [del(13q)(q12;q14)], терминальной делеции длинного плеча хромосомы 15q24, синдрома Картагенера и болезни Жильбера. Клиническое обследование детей с хромосомной патологией выявило характерные изменения в фенотипе: долихоцефалия, лицевые дизморфии, умеренный микрофтальм, сходящийся страбизм, гипотония, задержка психомоторного развития, степень выраженности которых, как предполагается, связана с изменениями в других генах [11]. Предположительно в этиологии совместного возникновения РБ и наследственных болезней связанных с хромосомными аномалиями и врожденными пороками развития имеют значение мутагенные и тератогенные факторы [17]. Кроме того, клинически симулировать РБ, как например, при синдроме Норри, и при синдроме Блоха-Сульцбергера, тип II может врожденная псевдоглиома сетчатки глаза, или при туберозном склерозе — гамартомы на глазном дне, которые могут локализоваться на диске зрительного нерва в виде «тутовой ягоды» [2, 4].

Молекулярно-генетическое обследование больных РБ показало, что носительство герминальной мутации возможно и при семейной, и при спорадической форме заболевания. Тестирование мутаций в гене *RBI* было проведено в 85 семьях, обследованные пробанды включали 28 бинокулярных и 57 монокулярных РБ. Выявленные мутации в гене *RBI* в основном были точковыми и с меньшей частотой обнаруживались протяженные внутригенные делеции.

Таблица 1. Возраст диагностики РБ в зависимости от латерального поражения глаз в ненаследственных и наследственных случаях

Возраст диагностики (месяцы)	Форма РБ (бинокулярная)	Форма РБ (монокулярная)	Наследственная РБ (Герминальная мутация RB1)	
			бинокулярная	монокулярная
0-5	31	26	*16	*1
6-11	17	17	8	3
12-17	9	35	3	1
18-23	2	39	-	3
24-29	1	16	-	1
30-35	3	9	-	1
36-41	-	4	-	-
42-47	1	4	-	-
48-53	-	2	-	1
54-59	-	2	-	-
60-119	-	1	-	1
Всего	64	155	27	12
Средний возраст диагностики	8,7	18,6	5,4	12,8

\*У трех пробандов с двусторонней и у одного с односторонней РБ заболевание диагностировано в течение первых 2-3 недель жизни

**Таблица 2. Спектр герминальных мутаций в гене RB1, выявленных в крови пробандов**

Тип мутации	монокулярная	бинокулярная	*всего
Нонсенс	1	15	16/39 (41%)
Сдвиг рамки	0	6	6/39 (15,4%)
Сайта сплайсинга	3	5	8/39 (20,5%)
Миссенс	4	1	5/39 (13%)
Протяженные внутригенные делеции	4	0	4/39 (10,2%)
Всего	12	27	39
Распределение мутаций среди всех обследуемых детей в зависимости от латеральности РБ (%)	21% (12/57)	96,4% (27/28)	45,8% (39/85)

\*Всего 39 герминальных мутаций выявлено у пробандов с монокулярной и бинокулярной РБ

**Таблица 3. Типы герминальных мутаций гена RB1, идентифицированных у больных с бинокулярной и монокулярной ретинобластомой**

№0	Мутация	Протеин	Тип мутации	Экзон/интрон
Бинокулярная ретинобластома				
1	c.1399C>T	p.R467X	Нонсенс	15
2	c.1072C>T	p.R358X	Нонсенс	11
3	c.1064delGA	p.R355	Сдвиг рамки, делеция	11
4	c.1814+1G>A	p.IVS+1G>A	Сайта сплайсинга	18
5	c.380+1G>T	p.IVS3+1G>T	Сайта сплайсинга	3
6	c.1937del4N	p.S646	Сдвиг рамки, делеция	19
7	c.1072C>T	p.R358X	Нонсенс	11
8	c.1399C>T	p.R467X	Нонсенс	15
9	c.380+1G>A	p.IVS3+1G>A	Сайта сплайсинга	3
10	c.221insAG	p.A74	Сдвиг рамки, инсерция	2
11	c.2370C>G	p.Y790X	Нонсенс	23
12	c.160G>T	p.E54X	Нонсенс	2
13	c.952insT	p.L317	Сдвиг рамки, инсерция	10
14	c.2473insA	p.K824	Сдвиг рамки, инсерция	23
15	c.1399C>T	p.R467X	Нонсенс.	15
16	c.2014G>T	p.E672X	Нонсенс	20
17	c.1331A>G	p.Q444R	Миссенс	13
18	c.958C>T	p.R320X	Нонсенс	10
19	c.2034insT	p.H678	Сдвиг рамки, инсерция	20
20	c.1215+1G>A	p.IVS12+1G>A	Сайта сплайсинга	11
21	c.540-2A>G	p.IVS6-2A>G	Сайта сплайсинга	6
22	c.1363C>T	p.R455X	Нонсенс	14
23	c.C1735T	p.R579X	Нонсенс	18
24	c.A460T	p.K154X	Нонсенс	4
25	c.1072C>T	p.R358X	Нонсенс	11
26	c.763C>T	p.R255X	Нонсенс	8
27	c.C1030T	p.Q344X	Нонсенс	10
Монокулярная ретинобластома				
1	c.235G>T,	p.E79X	Нонсенс	12
2	g.61807G>A		Сайта сплайсинга	9
3	c.1422-8delT	p.IVS16-8delT	Сайта сплайсинга	16
4	c.A2069G	p.N690S	Миссенс	20
5	c.607+1G>T,	p.IVS6+1G>T	Сайта сплайсинга	6
6	c.C1981T	p.R661W	Миссенс	20
7	c.1364G>C	p.R455P	Миссенс	14
8	c.T2134C;	p.C712R	Миссенс	21
9			Делеция внутригенная протяженная	2-20инт
10			Делеция внутригенная протяженная	1-27эк
11			Делеция внутригенная протяженная	2-20инт
12			Делеция внутригенная протяженная	1-17эк

**Рис. 1. Семья А**

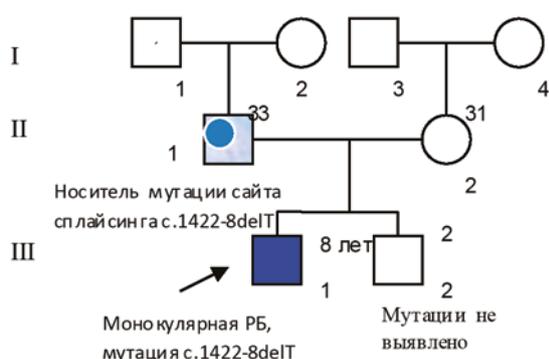
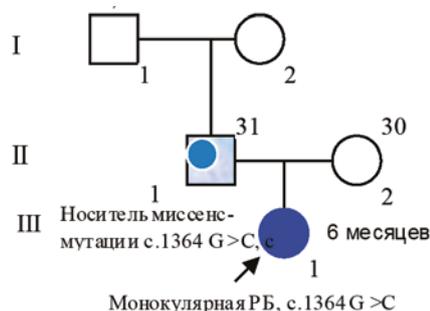


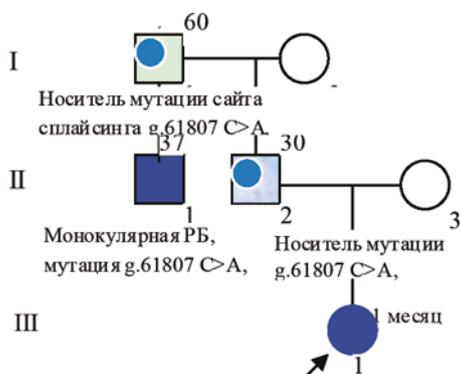
Рисунок 1. Схемы наследования мутаций в родословных семьях с неполной пенетрантностью мутаций в гене RB1  
Семья А. Отец 33 лет (II-1) непораженный носитель мутации сайта сплайсинга с.1422-8delT (p.IVS16-8delT), экзон 16 в гетерозиготном состоянии, сын (III-1) (пробанд) с той же гетерозиготной мутацией имеет монокулярную РБ, диагностирована в 8 лет.

**Семья Г**



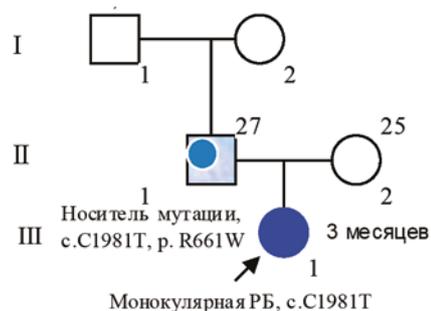
Семья Г. Отец (II-1) непораженный носитель миссенс-мутации с.1364 G>C (p.R455P), экзон 14 в гетерозиготном состоянии, его дочь (III-1) с той же мутацией имеет РБ OD диагностированную в возрасте 6 месяцев.

**Семья Б**



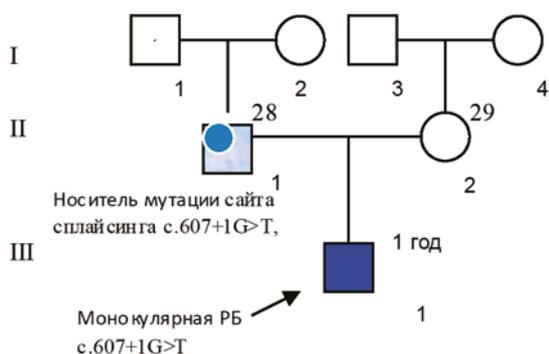
Семья Б. Пробанд (III-1), её отец (II-2), дедушка (I-1) и дядя (II-1) носители мутации сайта сплайсинга g.61807 C>A, экзон 9 в гетерозиготном состоянии. Только дядя (II-1) и пробанд (III-1), с той же самой мутацией, имеют монокулярную РБ.

**Семья Д**



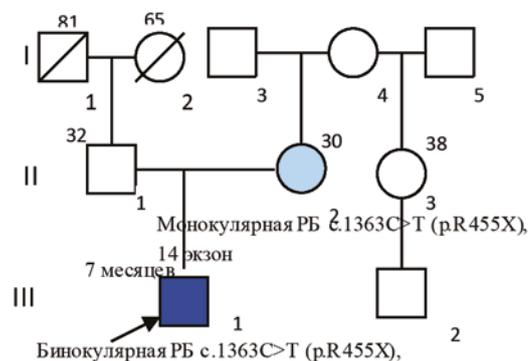
Семья Д. Отец (II-1) непораженный носитель миссенс-мутации с.C1981T (p.R661W), экзон 20 в гетерозиготном состоянии, его дочь (III-1) с той же мутацией имеет РБ OS диагностированную в возрасте 3 месяца.

**Семья В**



Семья В. Отец (II-1) непораженный носитель мутации сайта сплайсинга с.607+1G>T (p.IVS6+1G>T) интрон 6 в гетерозиготном состоянии. Пробанд (III-1) носитель той же мутации, имеет монолатеральную РБ диагностированную в 1 год.

**Рис. 2.**



Семья с неполной экспрессивностью ретинобластомы



Рис. 3. Картина УЗИ-сканирования глазного дна матери про- банда (рис.2) (II-2). Ретинома в стадии инволюции. Видны очаги кальцификации и очаги хориоретинальной дистрофии вокруг них с переходом на сетчатку.

Спектр выявленных точковых мутаций *RB1* по типам представлен в таблице 2. Из них, у детей с бинокулярной РБ, мутации выявлены в 96,4% (27/28), а с монокулярной РБ — в 21% (12/57). Кроме того, мозаичность мутации в гене *RB1* выявлена у одного пациента. Важным является то, что такая герминальная мутация также может передаваться его потомству. Как видно из табл., у больных с бинокулярной РБ наиболее часто возникают нонсенс мутации, тогда как, с монокулярной — миссенс-мутации и протяжен- ные внутригенные делеции.

Обнаруженные точковые мутации рассеива- лись по гену с 2 по 23 экзоны, встречались в экзонах: 2–4, 10,11, 14–16, 18, 20, 23 (табл. 3). Мутации также накапливались в дискретных мес- тах, в экзонах 10, 11, 14 и 15, которые были выявлены у 13 из 39 пациентов. У обследован- ных пациентов с РБ не наблюдались мутации в экзонах 1, 5, 7 и 22. Экзоны участвующие в ре- гуляции транскрипции белка pRb — это экзоны 12-18 (домен А) и 19-23 (домен В), известные как горячие точки мутаций гена *RB1* [23, 24], включали 41% (16/39) от всех точковых мута- ций, идентифицированных у наших больных. Спектр различных типов мутаций, обнаружен- ный у наших пациентов, расширяют предыду- щие наблюдения и подтверждают данные, полу- ченные в других исследованиях [10, 14].

В целом, у тестированных больных с би- нокулярной РБ герминальные нонсенс мутации в гене *RB1* возникали наиболее часто, что со- ставило 55% (15/27). Из всех бинокулярных РБ 3 принадлежали семейным случаям, среди ко- торых 2 семьи были носителями нонсенс мута- ций (2 и 10 экзонах) и одна — сдвиг рамки считывания (2 экзон). Среди монокулярных слу- чаев РБ более частыми были миссенс-мутации и протяженные внутригенные делеции по 33%

(4/12). Использование секвенирования нового поколения (NGS) увеличивает степень обнару- жения разных мутаций (известных и ранее неиз- вестных и мозаичных), однако крупные делеции, включающие многие или все экзоны гена *RB1* выявить секвенированием ДНК невозможно. Для их идентификации был использован метод мультиплексной лигазозависимой амплификации (MLPA). Это позволило выявить у четырёх па- циентов с монокулярной РБ крупные внутриген- ные делеции хромосомы 13q, которые составили 10,2% (табл. 3).

В целом среди всех обследуемых пациентов наследственные формы РБ выявлены в 45,8% (39/85) случаев. Изучение семей больных РБ по- казало, что не у всех носителей герминальных мутации в гене *RB1* возникает ретинобластома. Молекулярное тестирование гена *RB1* у род- ственников из семей больных носителей мута- ции позволило выявить 5 семей, где не было ука- заний на заболевание РБ у родственников и где отцы детей с монокулярной РБ оказались носи- телями аналогичной мутации, но без признаков заболевания. Клинические фенотипы семейной РБ с неполной пенетрантностью представлены на рисунке 1. У всех детей была изолированная, односторонняя РБ. В семье с мутацией сайта- сплайсинга g.61807G >A ретинобластома была у пробанда и у сводного дяди по отцовской линии, здоровыми носителями мутации были её отец и дедушка (рис. 1, семья Б.). Но только у пробанда и её дяди возникла монокулярная РБ. Другие му- тантные аллели сайта-сплайсинга с.1422-8delT и с.607+1G>T выявленные в семьях (рис. 1, семья А и — В), также отцовского происхождения, имели неполную пенетрантностью и низкую экспрессивность. У детей, в этих семьях, наблю- далась поздняя манифестация РБ (в одном слу- чае в возрасте 8 лет). Неполная пенетрантность и низкая экспрессивность опухоли отмечалась в двух семьях с миссенс-мутацией (с.1981C<T, p.R661W и с.1364G>C, p.R455P) (рис. 1, семья Г и Д), где непораженными носителями герми- нальных мутаций также были отцы пробандов с монокулярной РБ. Все отцы-носители герми- нальных мутаций в гене *RB1* были обследованы у онкоофтальмолога (офтальмоскопия в прямом и обратном видах, УЗИ орбит, шеи, предушных областей) — патологии глазного яблока у них обнаружено не было.

Интересной является семья (рис. 2), где у 7 месячного ребенка (III-1) была диагностиро- вана бинокулярная РБ. Тестирование гена *RB1* выявило у ребенка и её матери (II-2) нонсенс- мутацию (с.1363C>T, (p.R455X) экзон 14) в ге- терозиготном состоянии. В анамнезе матери не отмечалось заболеваний глаз, но наблюдалось непостоянное косоглазие OD. В 30-летнем воз-

расте, при обследовании глазного дна, у нее были обнаружены по периферии сетчатки очаги кальцификации и хориоретинальной дистрофии вокруг них с переходом на сетчатку, что расценены как ретинома в стадии инволюции возможно ещё в детском возрасте, о которой она не знала (рис. 3).

В настоящее время молекулярные изменения, модулирующие фенотип заболевания, пока до конца не установлены. В литературе обсуждается возможная причина неполной пенетрантности мутантных аллелей в зависимости от какого родителя унаследована мутация. Предполагается, что два специфических мутантных аллеля, которые могут иметь эффект родительского влияния, это мутация сайта сплайсинга с.607+1G>T и миссенс мутация с.1981C>T аналогичные мутации выявлены и у наших больных с неполной пенетрантностью [9, 21]. Объяснением этому стало предположение, что различное метилирование интрона 2 *CpG85* влияет на экспрессию гена *RB1* в пользу материнского аллеля. И в случае наследования мутированного аллеля по материнской линии, имеющейся опухольевой супрессорной активности достаточно, чтобы ограничить развитие РБ у 10% носителей. Когда мутированный аллель передается от отца, экспрессии pRb недостаточно, чтобы предотвратить развитие РБ у 68% носителей [9,12,21]. В семьях наших пациентов с неполной пенетрантностью и низкой экспрессивностью были выявлены такие специфические мутации как, три мутации сайта сплайсинга: с.607+1G>T (интрон 6), с.1422-8delT (экзон 16), g.61807 G>A (экзон 9) и две миссенс-мутации с.1981C>T, p.R661W (20 экзон) и с.1364G>C, p.R455P(14 экзон), которые были унаследованы от непораженных отцов.

Наблюдение за пациентами с различными типами мутаций, показало, что у многих носителей нонсенс-мутаций сдвига считывания рамки отмечалась полная пенетрантность и более тяжелая клиническая картина заболевания (билатеральное, полифокусное поражение сетчатки, ранняя клиническая манифестация, появление новых фокусов РБ, несмотря на проведенную органосохраняющую терапию). У одного ребенка с бинокулярной РБ, диагностированной в 10 мес. развилась вторая опухоль — альвеолярная рабдомиосаркома мягких тканей левой височной области в 4 года 11 мес., мутация гена *RB1*: с.1937del4N, p.S646FS (19 экзон).

Таким образом, РБ это детская эмбриональная опухоль, генетически гомогенная, сегрегирует в семьях как высокопенетрантное заболевание, часто ассоциируется с риском развития у пациентов более чем одной опухоли. Однако в некоторых семьях мутации имеют неполную пенетрантность, заболевание может протекать в

менее тяжелой форме, возникать в более позднем возрасте, и у некоторых носителей мутации заболевание не развивается. Идентификация причины заболевания в таких семьях позволяет выявлять непораженных носителей мутации в гене *RB1* и определить индивидуальный риск передачи заболеванию РБ потомкам. С появлением новых методов молекулярного исследования, в частности NGS, значительно повысилась эффективность выявления мутаций в гене *RB1*. В нашей работе использование метода NGS и MLPA в поиске мутаций в гене *RB1* позволило выявить мутации у 96,4% (27/28) детей с бинокулярной РБ и у 21% (12/57) с монокулярной РБ. У больных РБ обнаружен спектр различных типов мутаций (нонсенс, миссенс, сайта сплайсинга, сдвига считывания рамки, крупных внутригенных делеций) и изучена соответствующая им клиническая картина заболевания РБ. В семьях носителей таких специфических мутации как, сайта сплайсинга, миссенс-мутаций, унаследованных от отцов, отмечалась неполная пенетрантность проявления заболевания. Среди всех тестированных детей герминальные мутации выявлены в 45,8% (39/85) из них, которые в 41% (16/39) случаев локализовались в экзонах 12-18,19-23, участвующих в регуляции транскрипции белка pRb, и известные как горячие точки мутаций гена *RB1*. Спектр различных типов мутаций, выявленный у наших пациентов, расширяют и дополняют наблюдения, имеющиеся в литературе. Молекулярное тестирование ДНК гена *RB1* способствует идентификации носителей мутаций, облегчает генетическое консультирование по прогнозу потомства. Выявление генетически детерминированных форм РБ позволяет своевременно лечить, индивидуально планировать и осуществлять профилактику этого заболевания, и что особенно важно, требует междисциплинарного подхода офтальмологов, онкологов, генетиков и молекулярных биологов.

#### *Конфликт интересов*

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2011 году (заболеваемость и смертность) // под ред. В. И. Чиссова, В. В. Старинского, Г. В. Петровой — М., 2013.
2. Козлова В.М., Казубская Т.П., Соколова И.Н., Алексеева Е.А и др. Ретинобластома: диагностика и генетическое консультирование // Онкопедиатрия. — 2015. — Т. 2. — № 1. — С. 30-38.
3. Babenko O., Nermtsova M., Kozlova V., Brovkina A. Molecular analysis of RB1 gene mutations, loss of heterozygosity

- and methylation pattern on retinoblastoma patients // Abstr of ESHG. Amsterdam, Netherlands, 2000. — P. 159.
4. Bojinova R.I., Schorderet D.F., Addor M.C. et al. Further delineation of the facial 13q14 deletion syndrome in 13 retinoblastoma patients // *Ophthalmic Genet.* — 2001. — Vol. 22. — P. 11–18.
  5. Corson T.W., Gallie B.L. One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma // *Genes Chromosomes Cancer.* — 2007. — Vol. 46. — P. 617–634.
  6. Dimaras H., Corson T.W., Cobrinik D. et al. Retinoblastoma // *Nat. Rev. Dis. Prim.* — 2015. — P. 15062.
  7. Dimaras H., Khetan V., Halliday W. et al. Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma // *Hum. Mol. Genet.* — 2008. — Vol. 17. — P. 1363–1372.
  8. Dryja T.P., Morrow J.F., Rapaport J.M. Quantification of the paternal allele bias for new germline mutations in the retinoblastoma gene // *Hum Genet.* — 1997. — Vol. 100. — P. 446–449.
  9. Eloy P., Dehainault C., Sefta M. et al. A parent-of-origin effect impacts the phenotype in low penetrance retinoblastoma families segregating the c.1981C>T, p.Arg661Trp mutation of RB1 // *PLoS Genet.* — 2016. — Vol. 12. — № 2.
  10. Harbour J.W. Overview of RB gene mutations in patients with retinoblastoma // *Ophthalmology.* — 1998. — Vol. 105. — P. 1442–1447.
  11. Kivela T., Tuppurainen K., Riikonen P., Vapalahti M. Retinoblastoma associated with chromosomal 13q14 deletion mosaicism // *Ophthalmology.* — 2003. — Vol. 110. — P. 1983–1987.
  12. Klutz M., Brockmann D., Lohmann D.R. A parent-of-origin effect in two families with retinoblastoma is associated with a distinct splice mutation in the RB1 gene // *Am. J. Hum Genet.* — 2002. — Vol. 71. — P. 174–179.
  13. Kooi I.E., Mol B.M., Massink M.P., De Jong M.C. et al. A meta-analysis of retinoblastoma copy numbers refines the list of possible driver genes involved in tumor progression // *PLoS One.* — 2016. — № 11. — e0153323.
  14. Lohmann D.R. RB1 gene mutations in retinoblastoma // *Hum. Mutat.* — 1999. — Vol. 14. — P. 283–288.
  15. McEvoy J., Nagahawatte P., Finkelstein D., Richards-Yutz J. et al. RB1 gene inactivation by chromothripsis in human retinoblastoma // *Oncotarget.* — 2014. — Vol. 30. — № 5. — P. 438–450.
  16. Moreno F., Sinaki B., Fandino A. et al. A population-based study of retinoblastoma incidence and survival in Argentine children // *Pediatr Blood Cancer.* — 2014. — Vol. 61. — P. 1610–1615.
  17. Mulvihill J.J. Childhood cancer, the environment and heredity. Principles and Practice of Pediatric Oncology. — Second Edition, 1993. — P. 11.
  18. Murphree A.L., Triche T.J. An epigenomic mechanism in retinoblastoma: the end of the story? // *Genome Med.* — 2012. — Vol. 4. — P. 15.
  19. Rushlow D.E., Mol B.M., Kennett J.Y. et al. Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: Genomic, gene expression, and clinical studies // *Lancet Oncol.* — 2013. — Vol. 14. — № 4. — P. 327–334.
  20. Rushlow D., Piovesan B. et al. Detection of mosaic RB1 mutations in families with retinoblastoma // *Hum Mutat.* — 2009. — Vol. 30. — № 5. — P. 842–851.
  21. Schuler A., Weber S., Neuhauser M. et al. Age at diagnosis of isolated unilateral retinoblastoma does not distinguish patients with and without a constitutional RB1 gene mutation but is influenced by a parent-of-origin effect // *Eur. J. Cancer.* — 2005. — Vol. 41. — P. 735–740.
  22. Theriault B.L., Dimaras H., Gallie B.L. et al. The genomic landscape of retinoblastoma: a review // *Clin. Exp. Ophthalmol.* — 2014. — Vol. 42. — P. 33–52.
  23. 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. 1–23.
  24. Valverde J.R., Alonso J., Palacios I. et al. RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database // *BMC Genet.* — 2005. — Vol. 6. — P. 53.
  25. Zhang J., Benavente C.A., McEvoy J. et al. A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses // *Nature.* — 2012. — Vol. 481. — P. 329–334.
  26. Zhu X.P., Dunn J.M., Phillips R.A. et al. Preferential germline mutation of the paternal allele in retinoblastoma // *Nature.* — 1989. — Vol. 340. — P. 312–313.

Поступила в редакцию 29.09.2017 г.

*T.P. Kazubskaya<sup>1</sup>, V.M. Kozlova<sup>1</sup>, T.L. Ushakova<sup>1</sup>, E.A. Alekseeva<sup>1</sup>, V.V. Strelnikov<sup>2</sup>, V.A. Yarovaya<sup>3</sup>, E.I. Trofomov<sup>4</sup>, S.N. Mikhailova<sup>1</sup>, L.N. Lyubchenko<sup>1</sup>*

### Study of retinoblastoma penetrance and phenotype

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology

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

<sup>3</sup>S.N. Fedorov Interbranch Scientific and Technical Complex "Eye Microsurgery"

<sup>4</sup>Scientific Clinical Center of Otorhinolaryngology Moscow

In this study we characterized hereditary forms of retinoblastoma (RB). Mutational analysis was conducted among 85 RB patients and 156 their relatives. Using a combination of NGS (next generation sequencing) and MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) assays we found RB1 germinal mutations in majority of RB patients (96,4% - 27/28) with binocular disease and in 21% (12/57) with monocular RB. A relationship between different types of RB1 germline mutations and clinical manifestation was analyzed. Mainly, hereditary RB developed into severe binocular clinical form with high penetrance. However in some families low penetrance was observed (when patients carrying germline mutation didn't develop RB). We confirmed that 3 mutations at splice sites: c.607 + 1G>T (intron 6); c.1422-8delT (exon 16); g.61807 G>A (exon 9); and 2 missense mutations: p. 1364 G>C (14 exon); c.1981 C>T (20 exon) were inherited from not affected fathers. These RB cases were less severe (unilateral RB developed later in life). Of the 85 tested RB patients, germline mutations were detected in 45.8% (39/85), 41% (16/39) among which were localized in exons 12–18, 19–23. Hence, different RB mutations were associated with various phenotype. We suggest conducting genetic testing among all RB patients. This will allow identification of asymptomatic carriers with low penetrance mutations, germline mosaicism, lead to early diagnosis, facilitate development of individual treatment plans and determine genetic risk among affected families.

Key words: retinoblastoma, RB1 mutations, penetrance