

Генетические аспекты ретинобластомы.

Валентина Михайловна Козлова –врач генетик,
Т.П. Казубская, *Е.А. Алексеева,
* В.В. Стрельников, Т.Л. Ушакова, О.В. Горовцова,
Л.Н. Любченко, В.Г. Поляков.

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». МЗ РФ
*ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

Ретинобластома (РБ) —

детская злокачественная опухоль сетчатки глаза, развивается из недифференцированных эмбриональных тканей (нейроэктодермы).

Частота РБ 1:15 000–30 000 новорожденных.

Наследственные формы РБ встречаются у 40-45% больных, среди них большую часть составляют мутации «de novo».

Частота семейных случаев при этой опухоли довольно высока, по данным литературы - 10-12%.

- Этиология наследственных и большинства ненаследственных форм ретинобластомы обусловлена мутацией онкосупрессорного гена *RB1*, локализованного на длинном плече хромосомы 13 (13q14.2).
- Ген *RB1* клонирован в 1986 г., состоит из 27 экзонов и занимает 200 kb геномной ДНК, кодирует ядерный фосфопротеин (pRb), который играет важную роль в регуляции клеточного цикла, контролируя переход клетки из G1-фазы в S-фазу при ее делении.
- Белок pRb в активном гипофосфорилированном состоянии способен связывать фактор инициации транскрипции E2F — регулятор транскрипции большого числа ответственных за пролиферацию клеточных генов.

Канцерогенез ретинобластомы

В 1971 г. Knudson et al. предложил двухступенчатую модель канцерогенеза ретинобластомы, согласно которой необходимо повреждение (мутация) обоих аллелей гена RB1 «1 локус – 2 удара».

Мутации в гене RB1 могут быть соматическими, т. е. только в клетках сетчатки глаза. Такая опухоль чаще всего односторонняя, монофокусная, не наследуется и составляет около 55-60% от всех случаев ретинобластомы.

Канцерогенез ретинобластомы

В другом случае – мутация одного аллеля гена происходит в половой клетке одного из родителей, она может быть унаследованной или возникнуть «de novo», тогда каждая клетка будущего ребенка носит гетерозиготную мутацию гена RB1. Такая герминальная гетерозиготная мутация гена RB1 предрасполагает к мутации второго аллеля гена. Вторая мутация уже соматическая и происходит в одной или нескольких клетках сетчатки глаза.

Переход мутации гена из гетерозиготного в гомозиготное состояние приводит к инактивации гена-супрессора RB1, что ведет к утрате его функции - контроля перехода клетки из G1- в S-фазу

В результате происходит сбой в регуляции деления клетки, что приводит к неконтролируемому размножению клеток, накоплению мутаций, злокачественной трансформации и опухолевой прогрессии.



Виды мутаций

ГЕННЫЕ

затрагивают
структуру ДНК гена
RB1.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ

нарушается функция
гена – экспрессия белка

ХРОМОСОМНЫЕ

затрагивающие длинное
плечо хромосомы 13,
включающее локус гена *RB1*
(13q14.2)

Основные клинико-генеалогические признаки наследственных форм ретинобластомы:

- 1 - полифокусность,
- 2 - двусторонность опухолевого процесса,
- 3 - ранний детский возраст клинической манифестации,
- 4 - наличие аналогичной опухоли у других членов родословной,
- 5 - сочетание опухоли с врожденными аномалиями,
- 6 - первично-множественные неоплазии.

Клинико-генеалогический анализ **393** пациента с ретинобластомой из **351** семьи с1994 по 2014гг (НИИ ДОГ)

| | |
|--|------------------------------|
| Двусторонние формы РБ | 38% (134 пробанда) |
| Семейная форма РБ | 9,7% (33 семьи – 77 больных) |
| Семейные формы среди больных с двусторонней РБ | 13% (17 семей) |
| Семейные формы при односторонней РБ | 7,4% (16 семей) |
| Клиническая манифестация РБ до 1 года | 73% при двусторонней РБ |
| | 42% при односторонней РБ |

Молекулярно-генетические исследования
структуры ДНК гена RB1 проведено у 84 пациентов (НИИ
ДОГ) с ретинобластомой и 155 их родственников

- **Материал для исследования** - ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови ребенка и его родителей и из клеток парафинизированной ткани опухоли (парафиновые блоки)
- **Методы:** 1. ПЦР, SSCP (информативность 50%)
- 2. секвенирование кодирующей последовательности гена RB1 (1-27экзон), микросателитный анализ с использованием внутригенных маркеров: RB2int (D13S153), RB4int, RB20int и фланкирующих ген маркеров: D13S168, D13S164, D13S165, D13S1307. (85%)
- 3. Секвенирование кодирующих и прилежащих интронных областей экзонов гена RB1 (NGS). Метод MLPA. (90-95%)

Исследование ДНК гена RB1(пациенты НИИ ДОГ)

| | |
|--|---|
| <p>Обследовано 44 пробанда с билатеральной ретинобластомой и 73 родственника (7 семейные формы)</p> | <p>Герминальные мутации в гене <i>RB1</i> выявлены в 72,7% случаев, (32 дет и 11 их родственников)</p> |
| <p>Обследовано 40 пробанда с односторонней ретинобластомой и 68 родственников (2 семейные)</p> | <p>В 16 случаях (методы ПЦР, SSCP)- герминальные мутации в гене <i>RB1</i> обнаружены у 8 из 16 пробандов (50%), методом секвенирования - у 24 из 28 (85,6%) только соматические мутации обнаружены в 4 случаях</p> <p>Герминальные мутации в гене <i>RB1</i> выявлены в 12,5% семей (5 дет и 5 их родственников) только соматические мутации выявлены в 9 случаях из 12.</p> |

Спектр мутаций ДНК гена RB1 в лейкоцитах периферической крови (пациенты НИИ ДОГ)

При двусторонней ретинобластоме:

Герминальные мутации выявлены в 32 случаях (72,7%):

Нонсенс-мутации – 16 дет (6 сем)

Инсерции – 3

Внутригенные делеции – 7 (1сем)

Мутации сайта сплайсинга – 5

Миссенс-мутации – 1 (сем с Н/П).

При односторонней ретинобластоме

Герминальные мутации выявлены в 5 семьях (12,5%):

Миссенс-мутации – 2дет (1 сем + 1 Н/П)

Мутации сайта сплайсинга –1 сем с Н/П

Внутригенные делеции - 2

Генотип-фенотип корреляция в результате анализа ДНК гена RB1(пациенты НИИ ДОГ)

- При нонсенс-мутациях, больших в/генных делециях, инсерциях выявляется более тяжелая клиническая картина: билатеральное, полифокусное поражение сетчатки, ранняя клиническая манифестация, нередко появление новых фокусов РБ на фоне стандартной химио-лучевой терапии.
- При миссенс-мутациях, мутации сайта сплайсинга выявлена неполная пенетрантность и экспрессивность признаков. В 3-х семьях выявлены здоровые носители мутации гена *RB1*.
- При мутации сайта сплайсинга в 2 случаях и при нонсенс-мутациях у 3-х выявлено метакхронное развитие опухоли.

Вторые опухоли у больных с ретинобластомой, обратившихся в НИИ ДОГ

(12 детей и 4 родственников):

- - гистиоцитоз (3г),
- - глиобластома мозга (2г) - сем,
- - остеосаркома теменной кости (25лет) - сем,
- - рабдомиосаркома м/тк височной области у двух детей (в 3г 7м и 4г11м),
- - фиброзная дисплазия б/б кости (4г),
- - пилоидная астроцитома правой гемисферы мозжечка синхронная манифестация в 2,5г.,
- - нефробластома правой почки (12л),
- - остеосаркома скуловой кости (29л) - сем,
- - остеосаркома верхней челюсти (17л),
- - папиллярный рак щит железы у трех детей (в 11 лет, 13 л, 16л)
- - менингеома в 22г - сем,
- - врожденная фиброма прав ягодицы,
- - ПМЗО – аденома щит железы в 37л, рак матки в 40 лет, ангиофибросаркома мягких тканей ягодицы в 47 лет - сем.

(Опухоли голова/шея составили 75%)

Частота наследственной ретинобластомы

В результате клинико-генеалогического анализа, цитогенетических и молекулярно-генетических исследований больных с ретинобластомой опухоли с наследственной предрасположенностью составили **44%**.

Среди односторонних форм ретинобластомы –
13,9%

Заключение

Молекулярно-генетические исследования больных с ретинобластомой внесли существенный вклад в повышение эффективности медико-генетического консультирования, затрагивая практически все составные части этого процесса:

- уточнение этиологии ретинобластомы позволяет прогнозировать течение заболевания (риск метакхронного поражения глаз, ПМЗО), конкретизировать контрольное обследование больных после излечения первичного очага,
- конкретизация прогноза потомства, здоровья других лиц родословной,
- профилактика ретинобластомы, возможно провести доклиническую, дородовую диагностику предрасположенности к ретинобластоме в семьях с высоким риском, что поможет родителям планировать деторождение,
- предотвратить рождение потенциально больного ребенка с помощью методик экстракорпорального оплодотворения и ПГД.

Изучение ассоциации спектра молекулярно-генетических мутаций в гене *RB1* и клинических проявлений ретинобластомы позволит определить генотип – фенотип корреляцию, что уточняет прогноз течения заболевания, эффект лечения и сроки наблюдения.

Спасибо за внимание!

