УДК 616-006.487-092:575.113

Гурьянова И.Е.¹, Макаревич О.О.¹, Литвинова Д.Ю.², Мигас А.А.¹, Конопля Н.Е.³¹ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь² Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь³ Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, Минск, БеларусьGuryanova I.¹, Makarevich O.¹, Litvinova D.², Migas A.¹, Konoplya N.³¹ Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus² Belarusian State University, the Biological faculty, Minsk, Belarus³ N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk, Belarus

Роль генетических нарушений гена RB1 в патогенезе ретинобластомы

The Role of Genetic Disorders of the RB1 Gene
in the Pathogenesis of Retinoblastoma

Резюме

Введение. Ретинобластома – это злокачественная внутриглазная нейроэктодермальная опухоль (внутренней оболочки глаза), чаще поражающая детей в возрасте от 0 до 9 лет. 90% случаев диагностируются в возрасте до 5 лет, из них две трети – в возрасте до 2 лет. Ретинобластома представлена двумя различными клиническими формами: наследственной формой (40% случаев), при которой опухоли двусторонние и мультифокальные, проявляющиеся в более раннем возрасте; и ненаследственной формой (60% случаев), при которой опухоли односторонние и унифокальные, проявляющиеся в более позднем возрасте. Этиология формирования ретинобластомы обусловлена возникновением мутаций в онкосупрессорном гене RB1. Ген RB1 кодирует ядерный фосфопротеин pRb, который играет важную роль в регуляции клеточного цикла.

Целью написания данной статьи было повышение осведомленности о клинической картине ретинобластомы и обоснование важности внедрения молекулярно-генетического исследования гена RB1 в диагностический процесс.

Заключение. Своевременная клиническая диагностика позволяет раньше начать лечение, снизить риск развития тяжелого течения заболевания и сохранить глазное яблоко и зрительные функции пациентов с ретинобластомой. Молекулярная диагностика генетических нарушений гена RB1 помогает дифференцировать врожденную и соматическую формы ретинобластомы, дает возможность пациентам и их кровным родственникам принимать информированные решения в области планирования семьи, проводить прогностическую оценку в семьях с низкой пенетрантностью.

Ключевые слова: ретинобластома, эпидемиология, ген-онкосупрессор, структура гена RB1, метилирование ДНК.

Abstract

Introduction. Retinoblastoma is a malignant intraocular neuroectodermal tumor (inner lining of the eye) that most commonly affects children aged from 0 to 9 years. Two-thirds of cases are diagnosed before the age of 2 years, and 90% of cases are diagnosed before the age of 5 years. Retinoblastoma presents in two distinct clinical forms: a heritable form (40% of cases), in which tumors are bilateral and multifocal, presenting at an earlier age; a non-heritable form (60% of cases), in which tumors are unilateral and unifocal, presenting at a later age. The etiology of retinoblastoma formation is caused by the occurrence of mutations in the tumor suppressor gene (RB1). The RB1 gene encodes a nuclear phosphoprotein (pRB) that is found in a mutated form in a wide range of human tumors.

Purpose. To raise awareness of the clinical picture of retinoblastoma and demonstrate the importance of including molecular genetic analysis into the diagnostic process.

Conclusion. Timely clinical diagnostics lets to conduct early treatment, reduces the risk of development of severe course of disease, and improves eyeball condition in patients with retinoblastoma. Genetic diagnostics helps to distinguish hereditary and somatic forms of retinoblastoma, enables patients and their relatives to make informed reproductive choices regarding subsequent pregnancies and to conduct prognostic assessment in families with low penetrance.

Keywords: retinoblastoma, epidemiology, tumor suppressor gene, RB1 gene structure, DNA methylation.

■ ВВЕДЕНИЕ

Ретинобластома – это злокачественное новообразование сетчатки, вызванное биаллельной инактивацией гена RB1. Манифестация, как правило, происходит в раннем детстве вследствие особенностей постнатального формирования зрительной системы [1]. Ретинобластомы составляют 6% среди всех злокачественных опухолей у детей до 5 лет, отсутствие лечения которых приводит к слепоте или смерти по причине метастазирования в другие ткани и органы пациента [2]. В то же время при условии ранней диагностики и адекватного лечения смертность из-за ретинобластомы составляет 8% [3]. Системная химиотерапия в сочетании с лазерной гипертермией, местной химиотерапией и брахитерапией является наиболее важным методом лечения и, при условии ранней диагностики, обеспечивает сохранение пораженного глаза. В запущенных случаях, как правило, применяется энуклеация, т. е. удаление глазного яблока [2]. Несмотря на то что ретинобластома излечима при своевременно начатой терапии, наследственная форма заболевания способствует высокому риску возникновения вторичных первичных онкологических заболеваний [4].

На данный момент общемировая частота диагностирования ретинобластомы составляет 1 случай на 13–18 тыс. новорожденных [5–8], с частотой встречаемости 2,4–11 случаев на миллион без половой принадлежности [9, 10]. В мультицентровом исследовании, включающем данные 2190 пациентов из 18 онкологических центров, рассредоточенных по всему миру, средний возраст на момент постановки диагноза составил 21,6 месяца (медиана 17,0 месяца; диапазон от 1 месяца до 30,4 года) [11].

Первоначальные клинические проявления ретинобластомы включают лейкокорию (белый зрачковый рефлекс), косоглазие, снижение остроты зрения, глаукому, гифему, буфтальм, проптоз и массивное экстраокулярное распространение [9]. Согласно литературным данным, наиболее частым показанием к направлению на обследование для исключения или подтверждения ретинобластомы является лейкокория (62,8%), косоглазие (10,2%) и проптоз (7,4%) [12]. Лейкокория, косоглазие и снижение остроты зрения представляют собой проявления болезни на ранней стадии, в то время как проптоз, глаукома, тотальная отслойка сетчатки, катаракта обычно наблюдаются на более поздних стадиях развития ретинобластомы [9].

Статистически ретинобластома в 5–10% случаев унаследована от родителей (наследственная форма); в 20–30% случаев возникает по причине герминальных мутаций, т. е. *de novo* (врожденная форма); и 60–70% случаев приходится на соматические мутации (спорадическая форма) [1].

Анализ спорадической и врожденной ретинобластомы привел к появлению гипотезы о двух совпадениях Кнудсона [13]. Ретинобластома возникает из-за инактивации обоих аллелей гена RB1. Ген RB1 кодирует белок ретинобластомы, который является ключевым регулятором клеточной репликации через его связывание с фактором транскрипции E2F и белками ремоделирования хроматина [14]. Белок pRb, находясь в активном гипофосфорилированном состоянии, связывает фактор инициации транскрипции E2F и подавляет транскрипцию генов, необходимых для S-фазы клеточного цикла, и выступает в качестве негативного регулятора, подавляющего опухолевый рост [10, 15]. Фактор инициации транскрипции E2F, в свою очередь, является регулятором многих ответственных за пролиферацию клеточных генов [16]. Отсутствие или недостаточная активность белка pRb приводит к нарушению регуляции деления клетки, что провоцирует ее опухолевую трансформацию.

Исследования ретинобластомы показывают, что эти опухоли быстро развиваются в результате некорректной эпигенетической регуляции, что является прямым результатом потери функций белка pRb [17, 18]. Исследования последнего десятилетия обнаружили существенные доказательства взаимосвязи между белком pRb и белками ремоделирования хроматина. Белок pRb участвует в эпигенетической регуляции, включая мобилизацию нуклеосом, ацетилирование гистонов, метилирование гистонов, метилирование ДНК и некодирующих РНК [18].

Ретинобластома формируется из клеток-предшественников колбочек и характеризуется высокой степенью злокачественности, инвазивностью и способностью быстро метастазировать в соседние ткани и органы [19]. Если лечение оттягивается, опухоли становятся прогрессирующими с высоким риском метастазирования, затрудняя сохранение зрения и глазного яблока. Ранняя диагностика ретинобластомы может спасти как жизнь пациента, так и зрение [12, 20]. Таким образом, расшифровка молекулярной основы ретинобластомы имеет первостепенное значение как для исследователей, так и для клиницистов [21].

■ ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Повышение осведомленности о ретинобластоме и обоснование важности внедрения молекулярно-генетического исследования гена RB1 в диагностический процесс.

■ КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕТИНОБЛАСТОМЫ

Основные симптомы ретинобластомы – это лейкокория (белый зрачковый рефлекс) и косоглазие, которые по возможности всегда необходимо проверять на наличие ретинобластомы, в течение 1 недели после их манифестации [22]. Ретинобластома может проявляться и другими признаками, такими как кровоизлияния в стекловидное тело (гемофтальм), переднюю камеру (гифема), скопление опухолевых клеток в передней камере (псевдогипопион), повышение внутриглазного давления, развитие катаракты и др. [1].

Две трети от общего числа диагностируются в возрасте до 2 лет, а 90% – в возрасте до 5 лет [14]. Также имеются данные о том, что наследственная ретинобластома манифестирует в более раннем возрасте по сравнению со спорадической формой [19]. Пациенты с врожденными генетическими изменениями (семейными и несемейными) диагностируются раньше (чаще до года), чем пациенты со спорадическими мутациями [10]. Ретинобластома может проявиться и в более позднем возрасте, например, 10% ретинобластом диагностируется среди детей старшего возраста или взрослого населения [1].

Существует три типа ретинобластомы: монолатеральной, билатеральной и трилатеральной. Монолатеральная унифокальная ретинобластома, как правило, не наследуется, проявляется в более позднем возрасте и ассоциирована с соматической мутацией обоих аллелей гена RB1 непосредственно в клетках сетчатки глаза [13, 14, 23]. Также были описаны монолатеральные несемейные случаи ретинобластомы, при которых мутации в гене RB1 не были обнаружены, возникновение опухоли было обусловлено мутацией в гене MYCN [14].

Билатеральная форма чаще всего является результатом герминальной мутации (вызвана гетерозиготной мутацией зародышевой линии на одном аллеле и соматической мутацией на другом аллеле гена RB1) или возникает при наследовании одного либо обоих мутантных аллелей от родителей. Считается, что большинство случаев билатеральной ретинобластомы являются врожденными, из которых около 10% были унаследованы от родителей [10]. Страдающие билатеральной наследственной формой ретинобластомы в 6 раз более склонны к развитию других видов рака в дальнейшей жизни [24].

В 1984 г. Броунштейн и др. впервые описали пациентов детского возраста с двусторонней ретинобластомой и морфологически схожей опухолью в области шишковидной железы – трилатеральная (трехсторонняя) ретинобластома [25]. Трехсторонняя форма характерна при наследственном типе ретинобластомы и обычно поражает второе или третье поколение [26]. Частота встречаемости трехсторонней ретинобластомы составляет 3,2% от всех пациентов с наследственной ретинобластомой (двусторонними и односторонними опухолями пациентов с

семейным анамнезом или с патогенным герминальным генетическим нарушением в гене RB1) и 2,9% среди пациентов с двусторонней ретинобластомой [27]. В исследовании Фанг и др. (2020) средний возраст на момент постановки диагноза трилатеральной ретинобластомы составил 21,8 месяца (диапазон – 10,8–41,4 месяца) [26].

■ КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА РЕТИНОБЛАСТОМЫ

В основе молекулярных событий, приводящих к развитию ретинобластомы, лежит биаллельная инактивация супрессорного гена RB1 [19]. Потеря функции гена RB1 является лимитирующим шагом в иницировании как наследственной, так и спорадической формы ретинобластомы [18]. В 1971 году Кнудсон предложил гипотезу двух совпадений, объяснив, что два мутационных события в развивающейся клетке сетчатки приводят к образованию ретинобластомы. Формирование опухоли обычно начинается с генетического нарушения одной аллели гена-супрессора RB1, за которым следует ряд других генетических изменений, которые коррелируют с клинической стадией и патологическими данными ретинобластомы.

При врожденной ретинобластоме у пациентов есть наследственная мутация или мутация в зародышевой линии (первый «удар»), за которой следует приобретенная вторая мутация (второй «удар») по мере развития сетчатки. При ненаследственной ретинобластоме есть две различные мутации, приобретенные в обоих аллелях гена RB1 в соматических клетках развивающейся сетчатки [14]. Таким образом, для развития ретинобластомы необходимы два последовательно происходящих события. Первым событием является мутация одного из аллелей, приводящая к образованию клетки с высоким риском злокачественной трансформации. Подобные мутации могут возникать как в соматических, так и в половых клетках. При локализации первой мутации в клетках сетчатки возникает ретинома. Трансформация клетки с повышенным риском канцерогенеза в раковую происходит в результате мутации второго аллеля гена RB1. Клетка начинает безостановочно делиться, что приводит к возникновению злокачественной опухоли. Если от одного из родителей пациент унаследовал мутантный аллель гена RB1, то возникающая в ретинOME вторая мутация в 90% случаев приведет к развитию ретинобластомы [16].

Потеря обеих копий гена RB1 может привести и к доброкачественному варианту ретинобластомы – ретинOME или ретиноцитоме, а прогрессирующая геномная нестабильность приводит к ретинобластоме – злокачественному новообразованию [28]. Считается, что ретиномы представляют собой регрессию ретинобластомы либо являются доброкачественной опухолью [1]. РетинOMA также может сосуществовать с ретинобластомой. Клетки ретиномы продуцируют белки старения и не способны к пролиферации, тем самым блокируют злокачественную трансформацию. Стабильная форма ретиномы в клинической картине наблюдается достаточно редко [29].

При спорадической (ненаследственной) ретинобластоме, которая составляет 60% от общего числа случаев ретинобластомы, обе мутации являются соматическими, то есть происходят в одной и той же клетке-предшественнице сетчатки [19]. Врожденная ретинобластома составляет

40% случаев заболевания [19]. Мутантный аллель передается пробанду от родителей (в 6–10%) или же возникает спонтанно в гаметах (герминальные мутации), тогда как вторая мутация на другом аллеле является соматической и обычно приобретается в процессе развития сетчатки после рождения [23, 30]. Таким образом, герминальная мутация в одном из аллелей гена RB1 первоначально обуславливает предрасположенность к заболеванию и впоследствии уже может передаваться потомкам пациента.

■ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА RB1

Ген RB1: структура, функции и роль в патогенезе ретинобластомы

Ген RB1 кодирует белок pRb, который взаимодействует более чем с 300 протеинами, и многие белковые взаимодействия связаны с белками-модификаторами хроматина [18, 31]. Ген RB1 локализован на длинном плече 13-й хромосомы (13q14.2) и занимает 178 139 пар нуклеотидов, которые включают в себя промоторную область (около 1,5 тыс. пар нуклеотидов), 27 экзонов, кодирующие регионы которых содержат 4768 пар нуклеотидов и интронные области [32].

Белок pRb состоит из 928 аминокислот, которые можно разделить на три домена: N-концевой домен (RBN), карманный домен (RBP) и C-концевой домен (RBC) (см. рисунок) [18]. Домен RBP содержит сайт, связывающий Leu-X-Cys-X-Glu (LxCxE), который опосредует взаимодействия с сотнями белков, включая онкобелки и факторы транскрипции. Взаимодействие между белком pRb и другими белками зависит от структуры и ее посттрансляционных модификаций, которые играют центральную роль в регуляции функции pRb во многих процессах развития [18]. Домен RBN по структуре напоминает карман, он может взаимодействовать с доменом RBP. Домен RBC необходим для взаимодействия между белком pRb и комплексом E2F/DP [18].

Схема структуры гена RB1, доменов и посттрансляционных модификаций

Структурированные домены изображены в виде цветных прямоугольников, неструктурированные домены – в виде линий черного цвета. Сайты фосфорилирования (P) показаны черным, сайты метилирования (M) – фиолетовым, а сайты сумоилирования (S) – красным

Scheme of the RB1 gene structure, domains, and post-translational modifications

Structured domains are depicted as colored boxes, unstructured domains are depicted as a line in black. Phosphorylation (P) sites are shown in black, methylation (M) sites – in blue, acetylation (A) sites – in purple, and sumoylation (S) sites – in red

Три домена гена RB1 связаны линкерными последовательностями, которые обеспечивают гибкость белка. Эти линкерные последовательности подвергаются посттрансляционным модификациям, в первую очередь CDK-зависимому фосфорилированию, влияющему на взаимодействие pRb с другими белками и его функциональной активности [18]. Фосфорилирование pRb приводит к инактивации функциональной активности, что в свою очередь приводит к активации транскрипции и потере контроля над клеточной пролиферацией. Белок pRb имеет 14 сайтов фосфорилирования, 2 ацетилирования и 6 сайтов метилирования, а также подвергается убиквитинированию и сумоилированию (см. рисунок) [18]. Эти посттрансляционные модификации регулируют возникновение других модификаций, контролируя функциональную активность белка pRb, включая способность рекрутировать факторы ремоделирования хроматина.

Ген RB1 играет центральную роль в поддержании стабильности генома, а инактивация гена RB1 может приводить к нестабильности хромосом, позволяя быстро приобретать вторичные и третичные мутации в ключевых путях онкологических заболеваний. Последующие изменения в генах, таких как BRCA2 на 13-й хромосоме, CDKN2 на 9-й хромосоме и TP53/BRCA1 на 17-й хромосоме, способствуют прогрессированию опухоли ретинобластомы. Структурно родственные ретинобластомоподобные гены RBL1 и RBL2 кодируют белки p107 и p130 соответственно, которые выполняют ту же функцию, что и белок pRb. Белок pRb вместе с белками p107 и p130 составляет семейство белков ретинобластомы [33].

Спектр мутаций гена RB1

Большинство мутаций гена RB1 уникальны и распределены равномерно по всей продолжительности гена без горячих точек [22]. Частота встречаемости новых мутаций составляет от 20% до 53,3% среди всех мутаций, детектируемых в гене RB1 [10, 34]. В опухолях оба аллеля RB1 могут быть инактивированы с помощью различных механизмов, включая точечные мутации, небольшие и крупные вставки и делеции, большие перестройки, гиперметилирование промотора и хромотрипсиса [21, 22, 35].

Чаще всего в обзорах приводится следующая статистика: мутации в гене RB1 обнаруживаются у 92% билатеральных и/или пациентов, имеющих наследственную форму заболевания, и в 10% ненаследственных монолатеральных случаев. Герминальные мутации обнаруживаются в 43% всех случаев [1] и составляют 19,5% всех монолатеральных случаев [10]. Ломанн и др. (1996) изучили 119 пациентов с наследственной ретинобластомой на предмет мутаций зародышевой линии гена RB1. Для всей выборки из 119 пациентов мутации выявлены у 99 (83%). Спектр включал 15% крупных мутаций, 26% мутаций малой протяженности и 42% точечных замен оснований [36]. В исследовании Томар и др. (2017) все случаи двусторонней ретинобластомы, кроме одной, имели герминальные мутации RB1 зародышевой линии клеток в гене RB1 (94,4%) [10]. В исследовании Зоу и др. (2021) в 90,3% случаев двусторонней ретинобластомы были выявлены герминальные мутации в гене RB1 (86,5% – точечные нарушения, небольшие делеции и инсерции, 13,5% – вариации числа копий гена) [34].

В исследовании Францис и др. (2021) при исследовании 83 образцов энуклеированной ретинобластомы методом высокопроизводительного секвенирования (таргетная панель, включающая 468 генов для соматического анализа, 88 генов для анализа герминальных нарушений), инактивация RB1 обнаружена у 79 (97,5%) пациентов [22].

Изучение аномалий 13q22 в исследовании Риккарди и др. (2008) показало, что делеции несут в себе большую угрозу развития ретинобластомы, в то время как дупликация этого сегмента имеет лишь умеренно пагубные последствия [37]. Почти у 20% пациентов с двусторонней или мультифокальной односторонней ретинобластомой при генетическом тестировании обнаруживаются делеции [1].

В общей сложности точечные мутации выявляются в 84,7% случаев ретинобластомы [10]. В гене RB1 чаще всего встречаются нонсенс мутации – 55,74%, за которыми следуют мутаций сдвига рамки считывания, составляющие 24,59%, далее – 9,83% приходится на мутации сайтов сплайсинга, 8,20% – миссенс-мутации и 1,64% – мутации промоторной области [6, 10].

Явления мозаицизма при ретинобластоме возникают, когда в какой-то момент эмбриогенеза происходит мутация в гене RB1 – «постзиготическая». Следовательно, мозаика может иметь начальную мутацию в некоторых, но не во всех клетках тела. В целом мозаицизм RB1 регистрируется в 10–20% всех случаев ретинобластомы. Он встречается среди 1,2% мутаций зародышевой линии. Частота возникновения мозаицизма зародышевой линии в спорадических односторонних случаях ретинобластомы составляет от 3,8% до 33% [10].

Роль белка-супрессора опухоли ретинобластомы pRb в эпигенетической регуляции

Роль белка pRb в мобилизации нуклеосом. Геномная ДНК упакована с помощью гистонов и негистоновых белков в нуклеосомы, структурные единицы эукариотического хроматина и хромосом. Комплексы SWI/SNF и их субъединицы BRM и BRG1 тесно связаны с клеточными процессами, регулируемые белком pRb. Комплексы SWI/SNF представляют собой мультибелковые ремоделирующие комплексы хроматина, которые реорганизуют нуклеосомы. Эти модификации могут включать изменение местоположения и/или изменение конформации нуклеосом, таким образом они реорганизуют структуру хроматина для облегчения связывания факторов транскрипции. Нуклеосомные изменения, опосредованные SWI/SNF, могут приводить к активации или репрессии транскрипции, в зависимости от компонентов комплекса. Комплексы SWI/SNF управляются субъединицами BRM и BRG1, которые содержат связывающий мотив LxCxE и взаимодействуют с белком pRb [18, 38].

Взаимодействие между pRb и SWI/SNF имеет ключевое значение для клеточного гомеостаза. Комплексы SWI/SNF считаются супрессорами опухолей и мутируют почти в 20% злокачественных новообразований человека. В частности, сообщается, что субъединица BRG1 является мишенью для мутации в 10–30% линий раковых клеток человека. Потеря BRG1 в сочетании с потерей pRb усиливает онкогенез ретинобластомы, подтверждая, что BRG1 действует как опухолевый супрессор сетчатки [18, 38].

Роль pRb в метилировании ДНК. Значительная часть патогенных мутаций в гене RB1 приводит к преждевременному прекращению синтеза белка, и большинство этих мутаций происходит из-за точечных замен цитозина на тимин в динуклеотидах CpG. Мутации в CpG в гене RB1 определяются несколькими факторами: конститутивное присутствие метилирования ДНК в цитозинах внутри CpG; определенный кодон, в котором расположен метилированный цитозин; и конкретная область гена, внутри кодона которой находится данный метилированный цитозин [1].

Генетические нарушения гена RB1 определяются в большинстве случаев ретинобластомы, но у части пациентов структурного изменения нуклеотидной последовательности в кодирующей области гена RB1 может не быть, в то время как в опухолевой ткани отсутствует белок pRb. При этом чаще всего обнаруживаются изменения в метилировании промоторной области, которая является одним из основных регуляторов экспрессии гена, это приводит к инактивации гена и рассматривается как функциональная делеция [13, 19, 39].

Метилирование ДНК катализируется ферментами семейства ДНК-метилтрансфераз (DNMT), включая DNMT1, который связан с поддержанием метилирования ДНК с DNMT3A и DNMT3B, которые отвечают за метилирование ДНК de novo [18]. Взаимодействие DNMT1 и pRb усиливает pRb-опосредованную репрессию клеточного цикла во время терминальной дифференцировки. Таким образом, потеря функционального pRb может способствовать aberrантной локализации DNMT1 и, как следствие, глобальным изменениям метилирования, наблюдаемым во многих линиях раковых клеток, включая ретинобластому. Инактивация пути pRb изменяет активность DNMT, что приводит к aberrантным паттернам метилирования геномной ДНК и злокачественному прогрессированию [18].

Метаанализ спектра мутаций гена RB1 в исследовании Томар и др. (2013) выявил 40% часто встречающихся мутаций в CpG-островках, из которых 79% вариантов были связаны с изменением С на Т в 11 кодонах CGA [10].

Эффекты родительского происхождения и низкой пенетрантности при ретинобластоме

В некоторых семьях с ретинобластомой (два и более носителя одинаковой герминальной мутации в родословной) имеют более мягкий фенотип с неполной пенетрантностью (у части носителей герминальной мутации заболевание не развивается) и вариабельной экспрессивностью (одинаковая мутация у разных членов семьи может проявляться моно- или билатеральной формой) [19].

«Эффект родительского происхождения» заключается в том, что низкопенетрантные герминальные мутации в гене RB1, унаследованные от отца, чаще приводят как к развитию ретинобластомы, так и к более тяжелой форме заболевания по сравнению с унаследованными от матери [19]. Сверхэкспрессированные унаследованные от матери аллели сохраняют достаточную опухолевую супрессорную активность для предотвращения развития ретинобластомы. В случае когда мутация передается от отца, низкая остаточная активность белка pRb приводит к развитию ретинобластомы [21].

Эпидемиологические исследования показали преимущественную отцовскую передачу мутантных аллелей ретинобластомы потомству. Имеются данные о том, что герминальные мутации в локусе ретинобластомы возникают чаще во время сперматогенеза, чем во время оогенеза, в результате различий между мужским и женским мейозом и разницей в паттернах метилирования ДНК [1].

Феномен семейных случаев наследования потенциально патогенных вариантов от здорового родителя, у которого отсутствует какой-либо связанный с заболеванием фенотип, также объясняет явление фенотипа с низкой пенетрантностью. Такие бессимптомные носители могут иметь клинический фенотип, который либо находится в пределах диапазона нормы, либо слишком незначителен, чтобы его можно было диагностировать, либо манифестирует в более поздние годы жизни [10].

Молекулярной основой ретинобластомы с низкой пенетрантностью являются мутации, вызывающие снижение количества продуцируемого нормального белка pRb (мутации класса 1) либо приводящие к продуцированию частично функционального мутантного белка pRb (мутации класса 2) [1].

Вероятность отсутствия развития ретинобластомы составляет 90,3%, когда генетическое нарушение с низкой пенетрантностью было унаследовано от матери, и 32,5% – при унаследовании генетического нарушения от отца. Таким образом, в семьях, несущих мутации с низкой пенетрантностью, у меньшего числа носителей развивается ретинобластома, чем ожидаемая частота >99%, которая обычно характерна для большинства типов мутаций в гене RB1 [10].

Помимо этого, вполне вероятно, что различная пенетрантность и отличия в возрасте на момент постановки диагноза, которые наблюдаются у пациентов с наследственной и ненаследственной ретинобластомой, являются следствием импринтированной экспрессии гена RB1 [40]. Например, импринтинг гена RB1 из-за дифференциально метилированного островка CpG в интроне 2 также приводит к специфическому для родительского происхождения метилированию ДНК и паттернам экспрессии генов [10].

Ген RB1 содержит импринтированные регионы – 3 CpG островка: CpG 106, CpG 42 и CpG 85. Островок CpG 106 захватывает промоторную область и 1-й экзон, биаллельно неметилирован. Островок CpG 42 располагается во 2-м интроне гена, биаллельно метилирован, не обладает регуляторной активностью. Во втором интроне также идентифицирован CpG 85-островок, который метилирован дифференциально, в зависимости от происхождения аллеля: материнский CpG 85 метилирован, отцовский – неметилирован. Островок CpG 85 может выступать в качестве промотора для экспрессии альтернативного транскрипта с геном RB1, который экспрессируется только с неметилированной отцовской хромосомой. Было показано, что уровень экспрессии гена RB1 от отцовского аллеля в 2–3 раза ниже, чем от материнского. Это объясняется явлением интерференции транскрипции, вызванной совместной экспрессией регулярного и альтернативного транскриптов [40]. Интерференция транскрипции – это механизм, при котором транскрипция одного гена подавляет транскрипцию другого гена [40]. Транскрипционный комплекс альтернативного транскрипта гена RB1 связывается с

неметилированным островком CpG 85 на отцовской хромосоме, таким образом он блокирует прохождение основной транскрипции на этом же аллеле, что приводит к уменьшению уровня экспрессии отцовского варианта аллеля [19].

Прогноз при лечении ретинобластомы

Пациенты с мутациями в гене RB1 имеют не только предрасположенность к развитию ретинобластомы, но и повышенный риск развития других видов опухолей: остеосаркомы [10, 41], опухолей головного мозга и носовых полостей [24], рака молочной железы, лейкоза [1], аденомы, мелкоклеточного рака легких, рака предстательной железы [18], рака мочевого пузыря [9]. Риск развития меланомы повышен в 50 раз по сравнению с популяцией, не имеющей мутации в данном гене. Нарушения в гене RB1 также связаны с формированием и прогрессированием астроцитом и мультиформных глиобластом. Почти две трети вторичных опухолей, возникающих у пациентов с ретинобластомой, имеют мезенхимальное происхождение [1].

Риск последующих онкологических заболеваний у наследственных пациентов превышает риск возникновения вторичных опухолей у ненаследственных пациентов с ретинобластомой [24]. Кумулятивная частота развития вторичного онкологического события через 50 лет после диагностирования ретинобластомы в исследовании, приведенном в статье Клейнерман и др. (2005), составила 36% при наследственном типе заболевания и 5,7% при ненаследственном [24].

Помимо предрасположенности к новым видам онкологических заболеваний ввиду врожденных генетических нарушений в гене RB1 существует риск канцерогенеза, возникающего как следствие лечения. Например, риск остеогенной саркомы увеличивается в 500 раз у пациентов с двусторонней ретинобластомой после лучевой терапии. При этом злокачественные новообразования костей находятся в местах, удаленных от мест, подвергшихся лучевой терапии опухоли [1]. Как показывает клиническая практика, лучевая терапия увеличивает риск формирования опухолей. Риск возникновения вторичного рака повышен в 6–7 раз у необлученных наследственных пациентов с ретинобластомой, тогда как лучевая терапия дополнительно увеличивает риск у наследственных пациентов в 3,1 раза.

В радиокарциногенезе задействовано несколько механизмов. Радиационно-индуцированная мутация второго аллеля RB1 является причиной возникновения остеосарком. В качестве доказательства данной теории были продемонстрированы гомозиготные делеции локуса RB1 при спорадических случаях лейомиосаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы и недифференцированной саркомы при отсутствии ретинобластомы в анамнезе [1]. Лейомиосаркомы и другие саркомы мягких тканей, в которых экспрессия продукта гена RB1 снижена, ведут себя более агрессивно, чем опухоли, в которых этот белок имеет более высокую экспрессию [15].

Химиотерапия является стандартом лечения пациентов с высоким риском метастазирования, но имеет неизбежную токсичность [29]. Было обнаружено повышение эффекта риска остеосарком после лучевой терапии с химиотерапией по сравнению с применением только лишь лучевой терапии [24].

Кроме этого, пациенты с ретинобластомой после лучевой терапии имеют повышенный риск возникновения липомы – доброкачественной опухоли жировой ткани [24]. Была проанализирована связь между наследственной ретинобластомой и возникновением карциномы слюнных желез у пациентов, прошедших лечение внешней лучевой терапией. Вероятность возникновения карциномы слюнных желез у 5-летних пациентов составила 87%. Следует отметить, что в статье Кивеля и др. (2001) [42] пришли к выводу, что карциномы слюнных желез могут возникать у пациентов с наследственной ретинобластомой независимо от первичного лечения, но особенно часто возникают в области проведения лечения дистанционной лучевой терапией через 5–15 лет после облучения [42].

Профиль экспрессии генов опухоли в энуклеированной ткани

Профили экспрессии генов можно использовать для определения гистогенеза опухолей и биологических путей, лежащих в основе канцерогенеза. Связанные с палочками гены активно экспрессируются в нормальной сетчатке человека, поскольку палочек количественно намного больше по сравнению с другими клетками сетчатки. Однако если окрасить опухолевые клетки маркерами палочек, то палочки почти отсутствуют, в отличие от большого количества колбочек [29]. Соответственно, опухоли характеризуются низким уровнем экспрессии генов палочек и высоким уровнем экспрессии генов колбочек по сравнению с нормальной сетчаткой. Функциональная аннотация профиля экспрессии генов ретинобластомы по сравнению с нормальной сетчаткой идентифицирует гены, связанные с клеточным циклом, репликацией и репарацией ДНК, ростом, а также гибелью клеток.

Было показано, что снижение экспрессии генов колбочек положительно коррелирует с тяжелой анаплазией, характерной для прогрессирующей ретинобластомы. Клетки-колбочки пролиферируют в ответ на потерю белка pRb. Было показано, что при уменьшении количества белка pRb в развивающейся сетчатке человека постмитотические колбочки повторно входят в клеточный цикл (пролиферируют) и становятся устойчивыми к апоптозу. Исследования корреляции показывают, что билатеральные опухоли связаны с увеличенной экспрессией генов колбочек, тогда как монолатеральные опухоли связаны с уменьшенной экспрессией генов колбочек [29].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании аналитического обзора литературы было определено, что выявление и аннотирование мутаций в гене RB1 необходимо для изучения характера наследования, понимания механизмов развития ретинобластомы, а в клинической практике – для медико-генетического консультирования и клинического наблюдения за семьями с наследственной формой заболевания.

Молекулярно-генетическое исследование позволяет выявлять группы высокого риска по ретинобластоме и прогнозировать течение заболевания, также выявление врожденных нарушений в гене RB1 может помочь носителям мутации в планировании деторождения.

Изучение патогенеза наследственных форм ретинобластомы позволяет верифицировать опухолевый рост у пациентов на досимптомной стадии заболевания и осуществлять мониторинг еще до появления опухоли. Ввиду чего детектирование манифестации заболевания с большей вероятностью произойдет на начальном этапе развития, что позволит сохранить зрительные функции, орган зрения, а также минимизировать применение системной химиотерапии у данной категории пациентов.

Молекулярно-генетическая диагностика также необходима для определения тактики лечения пациента. Пациенты с наследственной формой ретинобластомы или гетерозиготные носители мутации гена RB1 имеют существенный риск развития опухоли, а также подвержены высокому риску развития вторичных злокачественных новообразований, таких как остеосаркома, саркомы мягких тканей и меланомы.

Таким образом, сочетание клинических и генетических методов способствует оптимальному генетическому консультированию и офтальмологическому надзору пациентов с ретинобластомой.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. OMIM Entry – # 180200 – Retinoblastoma; RB1 [electronic resource]. Available at: <https://www.omim.org/entry/180200?search=Rb1&highlight=rb1>. (accessed April 25, 2021).
2. Bornfeld N., Lohmann D., Bechrakis N. (2020) Retinoblastoma. *Der Ophthalmologe*, vol. 117, no 4, pp. 389–402. doi:10.1007/s00347-020-01081-x.
3. Gallie B., Ellsworth R., Abramson D., Phillips R. (1982) Retinoma: spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation? *Br J Cancer*, vol. 45, no 4, pp. 513–521.
4. Balmer A., Zografos L., Munier F. (2006) Diagnosis and current management of retinoblastoma. *Oncogene*, vol. 25, no 38, pp. 5341–5349. doi: 10.1038/sj.onc.1209622.
5. Zaletaev D., Strelnikov V., Nemtsova M., Babenko O., Kuznetsova E., Zemlyakova V. (2013) Strukturno-funktsionalnyy analiz opukholevykh genomov i razrabotka test-sistem dlya rannej diagnostiki, prognoza techeniya i optimizatsii terapii zlokachestvennykh novoobrazovaniy [Structural and functional analysis of tumor genomes and the development of test systems for early diagnosis, prognosis and cancer therapy optimization]. *Annals RAMS*, vol. 68, no 9, pp. 7–14.
6. Alonso J., Garcia-Miguel P., Abelairas J., Mendiola M., Sarret E., Vendrell M. (2001) Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications: Novel RB1 Mutations in Retinoblastoma. *Human Mutation*; vol. 17, no 5, pp. 412–422. doi:10.1002/humu.1117.
7. Ishaq H., Patel B. (2021) *Retinoblastoma*; Florida: StatPearl. Treasure Island.
8. Nummi K., Kivelä T. (2021) Retinoblastoma in Finland, 1964–2014: incidence and survival. *Br J Ophthalmol*, vol. 105, no 1, pp. 63–69. doi: 10.1136/bjophthalmol-2019-315744.
9. Garza-Garza L.A., Ruiz-Lozano R.E., Rebolledo-Méndez G., Ibarra-Nava I., Morales-Garza H. J., Ancona-Lezama D. (2020) Challenge of Retinoblastoma in Mexico in 2020: Perspectives and Solutions. *Journal of ophthalmology*, vol. 2020, pp. 1–6. doi: 10.1155/2020/1953602.
10. Tomar S., Sethi R., Sundar G., Quah T.C., Quah B.L., Lai P.S. (2017) Mutation spectrum of RB1 mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications for genetic management and counselling. *PloS one*, vol. 12, no 6, pp. 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0178776.
11. Tomar A.S., Finger P.T., Gallie B., Kivelä T.T., Mallipatna A., Zhang C., Zhao J., Wilson M.W., Brenna R.C., Burges M., Kim J., Khetan V., Ganesan S., Yarovoy A., Yarovaya V. (2021) Global Retinoblastoma Treatment Outcomes: Association with National Income Level. *Ophthalmology*; vol. no 5, pp. 740–753. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.09.032.
12. Fabian I.D., Abdallah E., Abdullahi S.U., Abdulqader R.A., Adamou Boubacar S. (2020) Global Retinoblastoma Presentation and Analysis by National Income Level. *JAMA Oncol*, vol. 6, no 5, pp 685–695. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.6716.
13. Knudson A.G. (1971) Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 68, no 4, pp. 820–823. doi: 10.1073/pnas.68.4.820.
14. Mendoza P.R., Grossniklaus H.E. (2015) The Biology of Retinoblastoma. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 134, pp. 503–516. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.06.012.
15. Cordon-Cardo C., Richont V.M. (1994) Expression of the Retinoblastoma Protein Is Regulated in Normal Human Tissues. *The American Journal of Pathology*, vol. 144, no 3, pp. 500–510.
16. Kozlova V.M., Kazubskaya T.P., Sokolova I.N., Alekseeva E.A., Babenko O.V., Bliznetz E.A., Ushakova T.L., Mikhaylova S.N., Lubchenko L.N., Polyakov V.G. (2015) Retinoblastoma: diagnostika i geneticheskoe konsultirovanie [Retinoblastoma: Diagnostics and Genetic Counseling]. *Onkopediatria*, vol. 2, no 1, pp. 30–38.

17. Zhang J., Benavente C.A., McEvoy J., Flores-Otero J., Ding L., Chen X. (2012) A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. *Nature*, vol. 481, pp. 329–334. doi:10.1038/nature10733.
18. Guzman F., Fazal Y., Khuu M., Salcido K., Singh S., & Benavente C.A. (2020). Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein Roles in Epigenetic Regulation. *Cancers*, vol. 12, no 10, pp. 2807–2821. doi: 10.3390/cancers12102807.
19. Alekseeva E.A., Babenko O.V., Kozlova V.M., Ushakova T.L., Kazubskaya T.P., Sahakyan S.V., Tanas A.C., Zaletaev D.V., Strel'nikov V.V. (2019) Effekt roditelskogo proiskhozhdeniya mutatsii v gene RB1 pri nasledstvennoj retinoblastome s nizkoj penetrantnostyu [The effect of parental origin of RB1 mutations in hereditary retinoblastoma with low penetrance]. *Medical Genetics*, vol. 18, no 8, pp. 21–28. doi:10.25557/2073-7998.2019.08.21-28.
20. Wang Y.Z., Zhang Y., Huang D.S., Shi J.T., Ma J.M., Li B., Xu X.L., Zhou Y., Gu H.L. (2021) Clinical characteristics, treatment and prognosis of children with unilateral retinoblastoma and intracranial segment of Retrobulbar optic nerve invasion. *BMC Ophthalmol*, vol. 21, no 1, pp. 38–46. doi: 10.1186/s12886-020-01768-4.
21. Eloy P., Dehainault C., Sefta M., Aerts I., Doz F., Cassoux N., Lumbroso le Rouic L., Stoppa-Lyonnet D., Radvanyi F., Millot G.A., Gauthier-Villars M., Houdayer C. (2016) 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*, vol. 12, no 2, pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pgen.
22. Francis J.H.; Richards A.L.; Mandelker D.L.; Berger M.F.; Walsh M.F.; Dunkel I.J.; Donoghue M.T.A., Abramson, D.H. (2021) Molecular Changes in Retinoblastoma beyond RB1: Findings from Next-Generation Sequencing. *Cancers*, vol. 13, no 1, pp. 149–161. doi: 10.3390/cancers 13010149.
23. Hogg A., Bia B., Onadim Z., Cowell J.K. (1993) Molecular mechanisms of oncogenic mutations in tumors from patients with bilateral and unilateral retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci*, vol. 90, no 15, pp. 7351–7355. doi: 10.1073/pnas.90.15.7351.
24. Kleinerman R.A., Tucker M.A., Tarone R.E., Abramson D.H., Seddon J.M., Stovall M., Li F.P., Fraumeni J.F.Jr. (2005) Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up. *J Clin Oncol*, vol. 23, no 10, pp. 2272–2279. doi: 10.1200/JCO.2005.05.054.
25. Brownstein S., de Chadarévian J.P., Little J.M. (1984) Trilateral retinoblastoma. Report of two cases. *Arch Ophthalmol*, vol. 102, no 2, pp. 257–262. doi: 10.1001/archophth.1984.01040030207028.
26. Fang X., Wang Y., Yin J., Guo Y., Jia L., Zhang C., Jin M., Ni X., Zhao J. (2020). Clinical features and survival of Chinese children with trilateral retinoblastoma during 2006–2019: A retrospective multicenter study. *American Journal of Ophthalmology*, vol. 223, pp. 184–192. doi:10.1016/j.ajo.2020.10.002.
27. de Jong M.C., Kors W.A., Moll A.C., de Graaf P., Castelijns J.A., Jansen R.W., Gallie B., Soliman S.E., Shaikh F., Dimaras H., Kivelä T.T. (2020) Screening for Pineal Trilateral Retinoblastoma Revisited: A Meta-analysis. *Ophthalmology*, vol. 127, no 5, pp. 601–607. doi: 10.1016/j.ophtha.2019.10.040.
28. Dimaras H., Khetan V., Halliday W., Orlic M., Prigoda N.L., Piovesan B., Marrano P., Corson T.W., Eagle R.C. Jr., Squire J.A., Gallie B.L. (2008) Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Hum Mol Genet*, vol 17, no 10, pp. 1363–1372. doi: 10.1093/hmg/ddn024.
29. Kaewkhaw R., Rojanaporn D. (2020) Retinoblastoma: Etiology, Modeling, and Treatment. *Cancers*, vol. 12, no 8, pp. 2304–2327. doi: 10.3390/cancers12082304.
30. Onadim Z., Hogg A., Cowell J.K. (1993) Mechanisms of oncogenesis in patients with familial retinoblastoma. *Br J Cancer*, vol. 68, no 5, pp. 958–964. doi: 10.1038/bjc.1993.461.
31. Sanidas I., Morris R., Fella K.A., Rumde P.H., Boukhali M., Tai E.C., Ting D.T., Lawrence M.S., Haas W., Dyson N.J. (2019) A Code of Mono-phosphorylation Modulates the Function of RB. *Mol Cell*, vol. 73, no 5, pp. 985–1000. doi: 10.1016/j.molcel.2019.01.004.
32. Ensembl genome browser 95 [electronic resource]. Ensembl release 97. Available at: <http://www.ensembl.org/index.html> (accessed March 13, 2021).
33. Di Fiore R., D'Anneo A., Tesoriere G., Vento R. (2013) RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *J Cell Physiol*, vol. 228, no 8, pp. 1676–1687. doi: 10.1002/jcp.24329.
34. Zou Y., Li J., Hua P., Liang T., Ji X., Zhao P. (2021) Spectrum of germline mutations in RB1 in Chinese patients with retinoblastoma: Application of targeted next-generation sequencing. *Mol Vis*, vol. 27, pp. 1–16.
35. Blanquet V., Turleau C., Gross-Morand M.S., Sénamaud-Beaufort C., Doz F., Besmond C. (1995) Spectrum of germline mutations in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non-hereditary retinoblastoma. *Hum Mol Genet*, vol. 4, no 3, pp. 383–388. doi: 10.1093/hmg/4.3.383.
36. Lohmann D.R., Gerick M., Brandt B., Oelschläger U., Lorenz B., Passarge E., Horsthemke B. (1997) Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet*, vol. 61, no 2, pp. 282–294. doi: 10.1086/514845.
37. Riccardi V.M., Hittner H.M., Francke U., Pippin S., Holmquist G.P., Kretzer F.L., Ferrell R. (1979) Partial triplication and deletion of 13q: study of a family presenting with bilateral retinoblastomas. *Clin Genet*, vol. 15, no 4, pp. 332–345. doi: 10.1111/j.1399-0004.1979.
38. Allaman-Pillet N., Schorderet D.F. (2021) Piperlongumine promotes death of retinoblastoma cancer cells. *Oncotarget*, vol. 12, no 9, pp. 907–916. doi: 10.18632/oncotarget.27947.
39. Knudson A.G. Jr. (1986) Genetics of human cancer. *J Cell Physiol Suppl*, vol. 4, pp. 7–11. doi: 10.1002/jcp.1041290404.
40. Buiting K., Kanber D., Horsthemke B., Lohmann D. (2010) Imprinting of RB1 (the new kid on the block). *Briefings in Functional Genomics*, vol. 9, pp. 347–353.
41. Kleinerman R.A., Yu C.L., Little M.P., Li Y., Abramson D., Seddon J., Tucker M.A. (2012) Variation of second cancer risk by family history of retinoblastoma among long-term survivors. *J Clin Oncol*, vol. 30, no 9, pp. 950–957. doi: 10.1200/JCO.2011.37.0239.
42. Kivelä T., Asko-Seljavaara S., Pihkala U., Hovi L., Heikkonen J. (2001) Sebaceous carcinoma of the eyelid associated with retinoblastoma. *Ophthalmology*, vol. 108, no 6, pp. 1124–1128. doi: 10.1016/s0161-6420(01)00555-3.

Подана/Submitted: 24.05.2021

Принята/Accepted: 12.06.2021

Контакты/Contacts: guryanovairina1985@gmail.com