

© 2022 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 20.01.2022
Принята к печати 23.03.2022

DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-2-78-88

Первые результаты проведения генетического скрининга и изучения генотип-фенотипических корреляций у пациентов с ретинобластомой из Беларуси

И.Е. Гурьянова¹, А.В. Любушкин¹, О.О. Макаревич¹, Д.Ю. Литвинова², В.Р. Вертёлко¹, Е.В. Волочник¹, Е.А. Полякова¹, А.А. Мигас¹, Н.Е. Конопля³

¹Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Республика Беларусь, Минск

²Белорусский государственный университет, Республика Беларусь, Минск

³Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Республика Беларусь, Минск

Контактная информация:

Гурьянова Ирина Евгеньевна, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии (Республика Беларусь)
Адрес: Республика Беларусь, 223053, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43
E-mail: guryanovairina85@gmail.com

Ретинобластома – это агрессивное онкологическое заболевание глаза, происходящее из клеток-предшественников фоторецепторов сетчатки, наиболее часто дебютирующее в детском возрасте. У 98% пациентов ретинобластома инициируется биаллельной инактивацией гена *RB1*, играющего важную роль в регуляции клеточного цикла и поддержании стабильности генома. Около 40% нарушений в гене *RB1* являются герминальными. Цель – провести анализ частоты герминальных нарушений гена *RB1* и их связи с клиническим фенотипом в группе белорусских пациентов с ретинобластомой. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). В исследование включены 20 пациентов из неродственных семей (9 – с монолатеральной ретинобластомой, 11 – с билатеральной). У 2 из 11 пациентов с билатеральной ретинобластомой отмечен семейный анамнез заболевания. Геномную ДНК выделяли из суспензии лейкоцитов периферической крови. С полученной ДНК ставили серию полимеразных цепных реакций для амплификации фрагментов, включающих последовательности всех экзонов, регионы сплайс-сайтов и промоторные области. Детектирование нуклеотидных последовательностей полученных ампликонов выполняли методом высокопроизводительного секвенирования. Наличие клинически значимых нарушений подтверждали методом автоматического секвенирования по Сэнгеру. Крупные поломки определяли методом мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции (MLPA) или флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). При выявлении нарушения у пробанда выполняли генетическое исследование его кровным родственникам (обследованы 5 семей). У 14 пациентов выявлено 13 различных генетических нарушений, 4 из которых ранее не были идентифицированы у пациентов с ретинобластомой среди других популяций (экзон 3: с.350_351delTT, p.Phe117TyrfsTer2; экзон 8: с.861+2T>G; экзон 24: с.2520+4A>G; делеция экзона 16, 17). Все нарушения детектированы в гетерозиготном состоянии. В зависимости от типа генетические нарушения распределились следующим образом: 38,5% ($n = 5$) дефектов в сплайс-сайтах; 15,4% ($n = 2$) миссенс; 15,4% ($n = 2$) небольших делеций, приводящих к сдвигу рамки считывания; 23% ($n = 3$) крупных делеций; 7,7% ($n = 1$) нонсенс. Герминальные нарушения определены в 33,3% (3/9) случаев с монолатеральной ретинобластомой и в 100% (11/11) – с билатеральной. У 10% пациентов определен наследственный характер ретинобластомы. При обследовании 5 семей у 3 пробандов выявленные нарушения определены как *de novo*. В статье представлены первые данные, полученные при генетическом исследовании белорусских пациентов с ретинобластомой. Методом секвенирования детектированы 78,6% нарушений, тогда как методами MLPA и FISH – 21,4%, что демонстрирует необходимость применения комплексного подхода. Среди спорадических нарушений в 66,6% (12/18) случаев была затронута герминальная линия, что подчеркивает важность использования генетического тестирования при диагностике и клиническом мониторинге пациентов с ретинобластомой.

Ключевые слова: ретинобластома, ген *RB1*, герминальные нарушения, молекулярно-генетическая диагностика, наследственная ретинобластома

Гурьянова И.Е. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2022; 21 (2): 78–88. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-2-78-88

© 2022 by «D. Rogachev NMRCPO»

Received 20.01.2022
Accepted 23.03.2022

The first results of genetic screening and exploration of genotype-phenotype correlations in retinoblastoma patients from Belarus

I.E. Guryanova¹, A.V. Liubushkin¹, O.O. Makarevich¹, D.Yu. Litvinova², V.R. Vertelko¹, A.V. Valochnik¹, E.A. Polyakova¹, A.A. Migas¹, N.E. Konoplya³

¹Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Republic of Belarus, Minsk

²Belarusian State University, Republic of Belarus, Minsk

³N.N. Alexandrov National Cancer Centre, Republic of Belarus, Minsk

Retinoblastoma is an aggressive eye tumor originating from maturing cone precursors in the developing retina and most commonly seen in childhood. In 98% of patients, retinoblastoma is caused by bi-allelic inactivation of the *RB1* tumor suppressor gene. Approximately 40% of disorders in the *RB1* gene are germline. This study aimed to analyze the frequency of germline *RB1* variants in a cohort of Belarusian patients with retinoblastoma and to correlate the variants with clinical phenotypes. The study was approved by an Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology. The study included 20 patients from unrelated families (9 patients with unilateral retinoblastoma, 11 – with bilateral). Two out of eleven patients with bilateral retinoblastoma had a positive family history. Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells. Using polymerase chain reaction, we obtained fragments including sequences of all exons, regions of splice sites and promoter regions of the *RB1* gene. Nucleotide sequences of the obtained amplicons were detected by next-generation sequencing. All clinically significant variants were confirmed by Sanger sequencing. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) or fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were used to detect gross alterations. A genetic analysis of blood relatives was carried out for five probands with detected germline variants. We identified 13 different variants in 14 patients: 38.5% ($n = 5$) of them were defects in splice sites; 15.4% ($n = 2$) – missense mutations; 15.4% ($n = 2$) – small deletions (frameshift); 23% ($n = 3$) – large deletions; 7.7% ($n = 1$) – nonsense mutations. Four of these variants had not been previously reported in patients with retinoblastoma from other populations (exon 3: c.350_351delTT, p. Phe117TyrfsTer2; exon 8: c.861+2T>G; exon 24: c.2520+4A>G; Del of exons 16, 17). Germline mutations were detected in 33.3% (3/9) of patients with unilateral retinoblastoma and in 100% (11/11) of patients with bilateral disease. A genetic screening of relatives showed that three variants were *de novo*, and two variants were inherited from parents in families with a positive history of retinoblastoma. Here we reported the first results of genetic examination of Belarusian patients with retinoblastoma. Seventy-eight point six per cent (78.6%) of variants were detected by sequencing, 21.4% were identified with the help of the MLPA and FISH methods. Among sporadic cases, germline *RB1* variants were detected in 66.6% (12/18) of cases. A full range of screening techniques is required to achieve high sensitivity of detection in retinoblastoma patients. Our study also provides new evidence that will inform patient management and genetic counseling.

Key words: retinoblastoma, *RB1* gene, germinal disorders, molecular genetic diagnosis, hereditary retinoblastoma

Guryanova I.E. et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2022; 21 (2): 78–88.
DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-2-78-88

Ретинобластома – это агрессивная внутриглазная злокачественная нейроэктодермальная опухоль, возникающая из дифференцирующихся клеток-предшественников колбочек в развивающейся сетчатке, наиболее часто дебютирующая в детском возрасте [1]. Ежегодно в мире диагностируется примерно 9000 новых случаев ретинобластомы, что составляет 1 случай на 15 000–20 000 новорожденных без половых различий [2, 3]. Несмотря на то, что ретинобластома является наиболее часто встречающейся первичной внутриглазной злокачественной опухолью, на ее долю приходится около 3% всех онкологических состояний у детей [4]. Большинство (90%) случаев, как правило, диагностируется в возрасте до 3 лет, однако частота выявляемости на ранней стадии колеблется в разных географических регионах (медианы 14–30 мес) [5–7].

У 98% пациентов ретинобластома вызвана двухэтапной биаллельной инактивацией гена *RB1*, расположенного на 295,7 килобазах 13-й хромосомы (13q14), содержащего 27 кодирующих экзонов, включающих 928 аминокислот [8, 9]. В оставшихся 2% случаев ретинобластомы нарушения детектируются в генах *MYCN*, *BCOR* и *CREBBP* [10, 11]. Ген-онкосупрессор *RB1* кодирует белок pRB, который выполняет функцию регулятора клеточной пролиферации, а инактивация такого белка влечет за собой потерю контроля над клеточным циклом и в дальнейшем приводит к развитию доброкачественной ретиномы или злокачественной ретинобластомы [12]. Инактивация белка pRB происходит по причине различных нарушений в гене *RB1*, включая однонуклеотидные изменения, небольшие и большие вставки/делеции, потерю гетерозиготности, транслокации, гиперметилирование промотора и нарушения, возникшие в результате хромотрипсиса [11]. В отдельную группу выделяют пациентов с синдромом делеции длин-

ного плеча 13-й хромосомы, так как помимо ретинобластомы они имеют характерные дисморфические черты: низко посаженные ушные раковины с направленными кверху мочками, широкую переносицу, задержку развития и др. [13].

Нарушения, приводящие к ретинобластоме, могут быть как соматическими, так и затрагивать герминальную линию. В случае двусторонней ретинобластомы вероятность того, что нарушение является герминальным, составляет 98% [14]. В 5–15% случаев ретинобластомы имеют семейный анамнез, в остальных случаях они носят спорадический характер [14, 15]. Среди спорадических нарушений выделяют соматические (~60%) и герминальные (~40%) [15, 16]. Спорадические герминальные нарушения являются *de novo*, т. е. впервые возникшие у пациента и отсутствующие у родителей.

Ретинобластома может затрагивать один глаз (односторонняя/монологатеральная) или сразу оба глаза (двусторонняя/билатеральная). Примерно 25–35% случаев ретинобластомы составляют билатеральные и 65–75% – монологатеральные [17–20]. Третья форма ретинобластомы – трехсторонняя – встречается в 5% наследственных случаев и проявляется опухолями сетчатки и эпифиза [21].

Наиболее часто встречающимися клиническими признаками ретинобластомы на ранней стадии являются лейкокория (белый зрачковый рефлекс) и косоглазие. Как правило, родители замечают лейкокорию при фотовспышке, но часто принимают за оптическую иллюзию и не придают этому большого значения [22]. В связи с этим ретинобластома зачастую диагностируется уже на развитой стадии заболевания, что свидетельствует о высоком риске метастазирования и низком проценте сохранения глазного яблока [13].

Пациенты с наследственной (врожденной) ретинобластомой имеют повышенный риск развития

Correspondence:

Irina E. Guryanova,
a senior researcher at the Laboratory of Molecular Genetic Research at the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology
Address: 43 Frunzenskaya St., Borovlyany 223053, Minsk District, Belarus
E-mail: guryanovairina85@gmail.com

вторичных злокачественных новообразований, таких как остеосаркома, саркомы мягких тканей, меланома и др. [6, 7]. Ранняя диагностика и лечение необходимы для сохранения зрения и жизни пациентов с ретинобластомой, а выявление патогенных генетических нарушений имеет важное значение для прогнозирования и определения риска развития опухоли у родственников [23, 24].

Цель исследования – провести анализ частоты герминальных нарушений гена *RB1* и их связи с клиническим фенотипом в группе белорусских пациентов с ретинобластомой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь).

Пациенты

В молекулярно-генетическое исследование включены 20 пациентов детского возраста из неродственных семей, которые проходили обследование в период с 2010 по 2021 г. в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь) и у которых был сохранен биологический материал для поиска герминальных нарушений. Медиана возраста пациентов на дату обращения составила 12 месяцев и 20 дней (диапазон: 1 месяц 20 дней – 41 месяц 9 дней). Соотношение пациентов мужского и женского пола составило 1:1,5. Среди представленной выборки 45% ($n = 9$) пациентов имели моностеральную форму ретинобластомы, 55% ($n = 11$) – билатеральную. У 2 пациентов присутствовал семейный анамнез заболевания. Информированное согласие было получено у всех пациентов и/или их официальных опекунов.

Молекулярно-генетические методы исследования

Материалом исследования послужила периферическая кровь с антикоагулянтом К2 ЭДТА, экстракцию геномной ДНК осуществляли из ядросодержащих клеток методом фенол-хлороформной экстракции.

Дизайн праймеров осуществляли с использованием программного обеспечения Primer-BLAST (Primer designing tool, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Отсутствие на 3'-конце стабильных петель, неспособность формировать праймер-димеры, отсутствие кластеров повторяющихся нуклеотидов, альтернативных сайтов отжига прямого и обратного праймеров на ДНК человека в пределах одной хромосомы проверяли с помощью программы OligoCalc

(Oligonucleotide properties calculator, <http://biotools.nubic.northwestern.edu>) и гетеродимерного анализа в программе OligoAnalyzer (IDT SciTools, <https://www.idtdna.com>). Праймеры были подобраны таким образом, чтобы в ходе полимеразной цепной реакции амплифицировались не только последовательности экзонов, но и сплайс-сайты, а также промоторные области (таблица 1).

С выделенной ДНК проводили серию полимеразных цепных реакций на программируемом термодиспетчере Verity (Life Technologies, США). Наличие специфического продукта и отсутствие контаминации проверяли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующей визуализацией в системе гель-документирования (BioRad Gel Doc 2000, США). Полученные ампликоны для каждого пациента смешивали в равном соотношении в зависимости от их концентрации и длины амплифицируемого фрагмента, очистку смеси выполняли набором реагентов PureLink PCR Purification Kit (Life Technologies, США).

Количественную оценку полученной смеси выполняли на флуориметре Qubit 3.0 (Life Technologies, США). Приготовление библиотеки для высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS) выполняли с использованием набора реагентов Nextera XT (Illumina, США). NGS осуществляли на генетическом анализаторе MiSeq (Illumina, США). Все клинически значимые изменения в нуклеотидной последовательности подтверждали с помощью автоматического секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Scientific, США) с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Определение больших генетических нарушений выполняли методом мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Scientific, США), используя набор реагентов SALSA MLPA Probemix P047 (MRC Holland, Нидерланды), включающий олигонуклеотидные зонды для гена *RB1*.

Молекулярно-цитогенетические методы исследования

Для молекулярно-цитогенетического исследования использовали метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH). Материалом послужили клетки периферической крови, фиксированные при помощи раствора Карнуа (ледяная уксусная кислота и метанол в соотношении 3:1). Исследования проводили с использованием одноцветного зонда LSI RB1 SpectrumOrange (Abbott Molecular, США) для определения хромосо-

Таблица 1

Последовательности праймеров для амплификации кодирующих регионов и прилегающих к ним сплайс-сайтов, промоторной области гена *RB1*

Table 1

Primer sequences for the amplification of exons, splice sites and the promoter region of the *RB1* gene

Название Name	Последовательность нуклеотидов (5'–3') Nucleotide sequence (5'–3')	Температура (t°) отжига праймеров Primer annealing temperature (t°)	Длина продукта (bp) Product length (bp)
RB1_Prom1_F	AAGTTCGGCACCTATCAGCG	60,46	334
RB1_Prom1_R	TAAACTGGGAAACCTGGCGT	59,52	
RB1_Prom2_F	TAGCCAGATATCCCTGCGG	59,02	418
RB1_Prom2_R	TCCCGACTCCCGTTACAAAA	58,95	
RB1_1ex_F	TCCGGTTTTTCTCAGGGGAC	59,60	468
RB1_1ex_R	CTCGCCAAAGAACCAGAAT	60,04	
RB1_2ex_F	TCACAGAAGTGTGTTGCTGCT	58,63	580
RB1_2ex_R	GTGCCCGGCCTCAAACATT	61,28	
RB1_3ex_F	CTGACCCCTAAAGTTCCACA	57,50	603
RB1_3ex_R	TCCAGGACACAACTGCTACC	59,93	
RB1_4ex_F	CTCTTCTTGACCCTTCGTTTTCT	58,62	501
RB1_4ex_R	AGCTAACATTAAAAGGGACAAGTCT	58,46	
RB1_5ex_F	TGGGAAAATCTACTTGAACTTTGTT	57,35	428
RB1_5ex_R	CTGTCCTGAATCAATCCACCTT	58,66	
RB1_6ex_F	TGCACAAAAAGAACACCCAA	57,31	386
RB1_6ex_R	GAAAGGGAGGGAAGATGGAAT	57,04	
RB1_7ex_F	ACTCTACCCTGCGATTTTCTCTC	59,87	428
RB1_7ex_R	TCTTGTCTCCAAACCTCCA	58,19	
RB1_8ex_F	GGGAGCAGAGTAGAAGAGGGA	60,06	566
RB1_8ex_R	TCAGTGATCCAGAGTGAGGG	58,82	
RB1_9ex_F	AGCCACTACACTTCAGCCTA	58,06	329
RB1_9ex_R	TCCTCCCTCCACAGTCTCAA	59,51	
RB1_10ex_F	ATTGCATGCGAACTCAGTGT	58,47	519
RB1_10ex_R	AGCCATTATCTTTGGTGCACAT	59,23	
RB1_11ex_F	ACATAATGGAAAGAGACCCACA	57,70	367
RB1_11ex_R	AACGTGAACAAATCTGAAACACT	57,44	
RB1_12ex_F	GAGACAAGTGGGAGGCGAGT	60,32	448
RB1_12ex_R	GGAAGAATGGTGAGCAAGGC	59,19	
RB1_13ex_F	TGCTTATGTTCAAGTAGTTGTGGT	58,03	414
RB1_13ex_R	CATACACAGGCAGCAGGGAT	59,82	
RB1_14ex_F	GCTTTTGTGTTGTCTTGCGG	58,80	452
RB1_14ex_R	ATGATCTTGATGCCTTGACCT	57,05	
RB1_15-16ex_F	AATTCAATGCTGACACAAATAAGG	56,48	489
RB1_15-16ex_R	ACTCAGAAGAGAAGCCTAGTG	56,49	
RB1_17ex_F	GCTTACACTCAAAATTGGAAGGCT	60,02	534
RB1_17ex_R	TTCCACTTGATCCTTGGGCT	58,92	
RB1_18ex_F	TTGCCACTGTCAATTGTGCC	59,61	480
RB1_18ex_R	GCCAACTCTGCCATGAAAACCT	59,38	
RB1_19ex_F	AGTAATCCCCAGGAAAAGCCA	59,00	543
RB1_19ex_R	TGAATAGTCAAGAAAAGATCTCGCA	58,03	
RB1_20ex_F	TGGGGGAAAGAAAAGAGTGGT	59,14	488
RB1_20ex_R	ACTGCACTCTAGCCTGGGTAA	60,55	
RB1_21ex_F	AATAACTCTGTAGATTAACCT	49,94	411
RB1_21ex_R	TTACCCTTATCTTTCCAATTCT	52,45	
RB1_22-23ex_F	AAGAGCAGCTATAATCCAAG	52,44	664
RB1_22-23ex_R	CTTATTTGAAATGAAGAATGC	49,48	
RB1_24ex_F	CAGTGGTTCTAGGGTAGAGGT	57,90	283
RB1_24ex_R	TGCAATATGCCTGGATGAGGT	59,50	
RB1_25ex_F	ATGGGAAAAGACAGGAGGAT	55,78	467
RB1_25ex_R	AATTGGTATAAGCCAGGAGC	55,17	
RB1_26ex_F	AACCACCTGTATTTGTGAGAACCA	58,80	381
RB1_26ex_R	TGCATAAACAACCTGCCAACT	59,30	
RB1_27ex_F	TGAGCGCCATCAGTTTGACA	60,25	506
RB1_27ex_R	CAGGCTGGGTTATCAGGAC	59,82	

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер.
Notes. F – forward primer; R – reverse primer.

много региона 13q14 (RB1) под флуоресцентным микроскопом Leica DMLB (Leica, Германия). При необходимости уточнения полученных результатов дополнительно использовали двухцветный зонд LSI 13q14 SpectrumOrange/13q34 SpectrumGreen (Abbott Molecular, США).

Анализ результатов молекулярно-генетических и цитогенетических методов исследования

Предобработку данных NGS (оценка качества, тримминг и фильтрация) проводили с использованием программных решений FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>) и Trimmomatic (<http://www.usadellab.org>). Референсную последовательность (сборка генома HG19) и все необходимые для анализа файлы брали с платформы/ресурса UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Процедуру выравнивания библиотеки на подготовленную референсную последовательность проводили с использованием программы BWA (версия 0.7.17, <http://bio-bwa.sourceforge.net>). Последующую обработку результатов (фильтрация, дедупликация, рекалибровка) проводили в программах Samtools (версия 1.7, <http://samtools.sourceforge.net>) и Picard (версия 2.26.7, <https://broadinstitute.github.io>). Для поиска и аннотации полученных вариантов использовали модули GATK (версия 4.2.3.0, <https://gatk.broadinstitute.org>) и Annovar (<https://annovar.openbioinformatics.org>) соответственно. Фильтрацию и форматирование результатов аннотации проводили с использованием разработанного модуля. Анализ патогенности выявленных нарушений осуществляли для вариантов с частотой встречаемости в популяции < 1%. Результаты NGS анализировали, используя облачный интерфейс BaseSpace (Illumina, США) и IGV (Broad Institute, Великобритания). Результаты автоматического секвенирования по Сэнгеру анализировали с использованием специализированных программных обеспечений Sequencing Analysis 7.0 (Applied Biosystems, США) и BioEdit (Bioedit Ltd, США). Выявленные однонуклеотидные варианты анализировали с применением онлайн-программ предсказания патогенности PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu>), Variant Effect Predictor (<http://www.ensembl.org/index.html>), SIFT (<http://sift.jcvi.org>), Varsome (<https://varsome.com>) и ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Полученные результаты MLPA интерпретировали с использованием программного обеспечения Coffalyser (версия 210604.1451, MRC Holland, Нидерланды). При цитогенетическом исследовании препарата суспензионной культуры анализировали 100–200 интерфазных ядер (в зависимости от клеточности и наличия клеток с aberrантным расположением сигналов). При определении делеции региона 13q14 (RB1) положительным

считали результат, при котором наблюдался только 1 сигнал флуорохрома в нуклеусах исследуемого образца. Анализ и регистрацию данных осуществляли в соответствии с рекомендациями ISCN2016 [25]. Уникальность полученных результатов определяли в публичных базах данных [8, 26, 27].

Поиск выявленного генетического нарушения у кровных родственников первой линии

Биологический материал для выполнения генетического исследования был сохранен от 11 кровных родственников первой линии (9 взрослых (мама/папа), 3 ребенка (братья)) и 5 пробандов, у которых в ходе исследования выявлены патогенетически значимые нарушения. У 2 из 11 родственников была диагностирована ретинобластома до выполнения генетического тестирования. Информированное согласие на выполнение исследований было получено. Генетический анализ в группе кровных родственников первой линии осуществляли методом автоматического секвенирования по Сэнгеру.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате нашего исследования выявлено 13 различных герминальных нарушений у 14 пациентов. Методом MLPA в гене *RB1* детектированы 2 крупные поломки: делеция экзонов 1–23 и делеция экзонов 16, 17, а методом FISH – делеция длинного плеча хромосомы 13 (Del13q14). NGS-исследование кодирующих областей гена *RB1* и прилегающих к ним сплайс-сайтов выявило 10 различных нарушений среди 11 пациентов. У 2 пациентов определено одинаковое однонуклеотидное нарушение в регионе сплайс-сайта экзона 6 (с.607+1G>T), описанное в литературе среди пациентов как с монолатеральной, так и с билатеральной ретинобластомой [14]. У 6 пациентов анализ данных проведенного генетического исследования клинически значимых нарушений не выявил. Таким образом, в 78,6% (11/14) случаев нарушения выявлены методом NGS, остальные – методами MLPA и FISH, что подчеркивает важность использования как методов для определения небольших нарушений, так и методов для детектирования крупных поломок (таблица 2).

Четыре нарушения ранее не были идентифицированы у пациентов с ретинобластомой среди других популяций: в экзоне 3 делеция 2 нуклеотидов, приводящая к преждевременному стоп-кодону (с.350_351delTT; p.Phe117TyrfTer2); однонуклеотидные замены в регионах сайтов сплайсинга экзона 8 (с.861+2T>G) и экзона 24 (с.2520+4A>G); делеция экзонов 16, 17. Все выявленные генетические нарушения детектированы в гетерозиготном состоянии. Впервые выявленные в когорте белорусских паци-

ентов нарушения в сплайс-сайтах находятся в регионах, изменения в которых уже были ассоциированы с ретинобластомой [8, 26, 27].

В зависимости от типа генетические нарушения распределились следующим образом: 38,5% ($n = 5$) дефектов в сплайс-сайтах; 15,4% ($n = 2$) миссенс; 15,4% ($n = 2$) небольших делеций, приводящих к сдвигу рамки считывания; 23% ($n = 3$) крупных делеций; 7,7% ($n = 1$) нонсенс (таблица 2).

Пациент (№20) с делецией длинного плеча хромосомы 13 имел явные фенотипические отличия, не свойственные пациентам с другими типами нарушений. Его клинический портрет включал низко посаженные ушные раковины, повернутые кверху мочки ушей, широкую переносицу, задержку психомоторного и речевого развития, наличие эпилепсии в анамнезе, увеличение шишковидной железы с мелкой кистой и с гетерогенным контрастированием,

признаки незавершенной миелинизации с наружной гидроцефалией.

Еще в 2005 г. J.R. Valverde и соавт. провели метаанализ, включающий 925 опубликованных нарушений, показавший, что доминирующим типом герминального нарушения в гене *RB1* является нонсенс, встречающийся в 43% (398/925) случаев [28]. Подобное распределение продолжает сохраняться в национальных исследованиях и за последние годы: у пациентов из Нидерландов нонсенс-нарушения описаны в 37% (69/187) случаев, из Иордании – в 42% (15/36), из Сингапура – в 54% (13/24) [29–31]. В когорте белорусских пациентов доминирующими явились сплайсинг-нарушения, встречающиеся у 42,9% (6/14) пациентов, а нонсенс-нарушения были определены всего в 7,1% (1/14) случаев. Возможно, это различие связано с небольшой выборкой пациентов с герминальными нарушениями в гене *RB1*

Таблица 2

Клинико-генетические данные, полученные по результатам исследования гена *RB1* в когорте пациентов из Беларуси

Table 2

Clinical features and pathogenic variants of the *RB1* gene identified in the retinoblastoma patients from Belarus

№ пациента Patient №	Выявленное нарушение Detected variant		Экзон Exon	dbSNP ID	Источник Source	Форма ретинобластомы Type of retinoblastoma	Тип нарушения Type of variant	Тип наследования Mode of inheritance
	по кодирующей последовательности coding sequence	по белку protein						
1	Del 16–17	–	16–17	–	Наши данные Our findings	Билатеральная Bilateral	Large del	Нет данных NA
2	c.607+1G>T	–	6	CS961677	Lohmann (1996) Am J Hum Genet 58, 940	Монолатеральная Unilateral	Splicing	Нет данных NA
4	c.958C>T	p.Arg320Ter	10	CM941205	Cowell et al. (1994) Eur J Hum Genet	Билатеральная Bilateral	Nonsense	Нет данных NA
5	c.861+2T>G	–	8	–	Наши данные Our findings	Билатеральная Bilateral	Splicing	Нет данных NA
6	Del 1–23ex	–	1–23	CG158882	Sagi et al. (2015) Fam Cancer	Билатеральная Bilateral	Large del	Нет данных NA
7	c.350_351delTT	p.Phe117TyrfsTer2	3	–	Наши данные Our findings	Билатеральная Bilateral	Frameshift	Нет данных NA
10	c.658C>G	p.Leu220Val	7	CM152154	Guan et al. (2015) Fam Cancer	Билатеральная Bilateral	Missense	Нет данных NA
11	c.607+1G>T	–	6	CS961677	Lohmann et al. (1996) Am J Hum Genet	Монолатеральная Unilateral	Splicing	Наследственный Hereditary
12	c.2134T>C	p.Cys712Arg	21	CM981702	Cowell et al. (1998) Oncogene	Монолатеральная Unilateral	Missense	<i>de novo</i>
14	c.1050-1G>A	–	11	CS0910369	Parsam et al. (2009) J Genet	Билатеральная Bilateral	Splicing	Нет данных NA
17	c.164delC	p.Pro55LeufsTer10	2	CD167927	Ossandón et al. (2016) Arch Soc Esp Oftalmol	Билатеральная Bilateral	Frameshift	<i>de novo</i>
18	c.2520+4A>G	–	24	–	Наши данные Our findings	Билатеральная Bilateral	Splicing	Наследственный Hereditary
19	c.1215+1G>A	–	12	CS890133	Dunn et al. (1989) Mol Cell Biol	Билатеральная Bilateral	Splicing	<i>de novo</i>
20	Del 13q14	–	–	OMIM#613884	Motegi et al. (1983) Hum Genet	Билатеральная Bilateral	Large del	Нет данных NA

Note. NA – data not available.

($n = 14$), но также, возможно, что данный тип более свойственен пациентам Республики Беларусь, поскольку в исследовании, проведенном в Китае, при также небольшой выборке ($n = 9$) доминирующая частота встречаемости нонсенс-нарушений сохранилась (45%; 4/9) [32]. В то же время в исследовании, выполненном во Вьетнаме, среди 18 пациентов с врожденными нарушениями в гене *RB1* доминирующими явились нарушения в регионах сплайс-сайтов, детектированные в 50% (9/18) случаев, а нонсенс-нарушения уже в 28% (5/18) [33]. Кроме того, существует открытый вопрос: считать процентное распределение по типам нарушений среди всех случаев или только среди уникальных? Например, в исследовании пациентов с ретинобластомой из Нидерландов среди 187 герминальных нарушений всего 144 были уникальными [29]. Таким образом, при исследовании большого числа пациентов расчет процентного распределения по типам нарушений среди всех детектированных случаев герминальных нарушений может привести к искажению результатов. Например, в 2022 г. в международной базе данных числится 1079 уникальных нарушений в гене *RB1*, среди которых наибольшее количество приходится на небольшие делеции и вставки (31,5%; 340/1079), второе место занимают сплайсинг-нарушения (18,7%; 202/1079), а нонсенс-нарушения занимают только третье место (16,1%; 174/1079) [26].

В нашем исследовании герминальные нарушения определены у 33,3% (3/9) пациентов с монолатеральной ретинобластомой и у 100% (11/11) с билатеральным поражением. Из этого следует, что в 70% (14/20) случаев из когорты белорусских пациентов при генетическом исследовании гена *RB1* в ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови, определены врожденные нарушения. Поиск семейного генетического нарушения был выполнен для 11 кровных родственников из 5 неродственных семей (пробанды №11, 12, 17–19). У 2 пациентов подтверждена наследственная форма ретинобластомы, у 3 – *de novo*. (рисунок 1). Приводим клиническое описание семей, взятых в исследование.

Семьи с положительным наследственным анамнезом

Семья №1. Пробанд – мальчик 2020 года рождения, возраст обращения к офтальмологу – 6,1 месяца, без жалоб. Осмотр пациента показал в левом глазу опухолевый очаг, расположенный в заднем полюсе, в том числе в макулярной зоне, имеющий основание около 3 диаметров диска зрительного нерва, высотой до 1,6 мм, диск зрительного нерва интактен. Диагноз: монолатеральная ретинобластома левого глаза, группа B, Ia по классификации Reese–Ellthworth. После определения генетического нарушения с.607+1G>T у

Рисунок 1

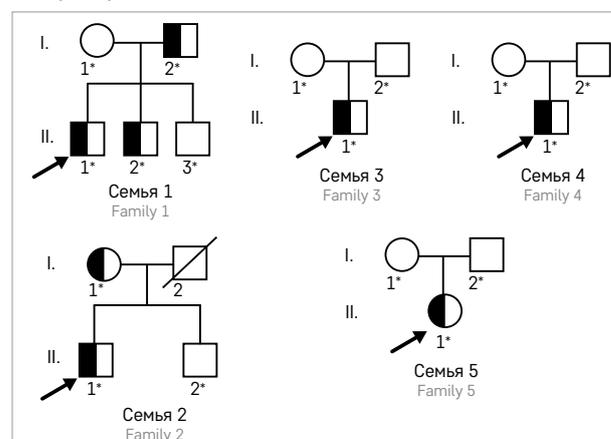
Результаты проведенного молекулярно-генеалогического исследования

* – образцы ДНК, которым выполнен поиск семейного нарушения. Образцы ДНК без отличий в референсных последовательностях исследуемой области выделены белым, образцы с детектированным нарушением в гетерозиготе закрашены наполовину черным. Стрелкой обозначены пробанды. Семья 1 – родственники пациента №11 (с.607+1G>T); семья 2 – родственники пациента №18 (с.2520+4A>G); семья 3 – родственники пациента №12 (р.Cys712Arg); семья 4 – родственники пациента №17 (р.Pro55LeufsTer10); семья 5 – родственники пациента №19 (с.1215+1G>A)

Figure 1

Pedigrees of families with retinoblastoma

* – individuals in whom sequencing analysis was performed. Blank symbols denote unaffected subjects, while half black symbols indicate affected patients. The probands are indicated by arrows. Family 1 – relatives of patient No. 11 (с.607+1G>T); family 2 – patient No. 18 (с.2520+4A>G); family 3 – patient No. 12 (р.Cys712Arg); family 4 – patient No. 17 (р.Pro55LeufsTer10); family 5 – patient No. 19 (с.1215+1G>A)



пробанда (пациент №11) проведено генетическое тестирование по детектированию данного нарушения у кровных родственников: мать, отец и 2 брата. Результат: при исследовании образцов ДНК у отца (1987 года рождения, без проявлений ретинобластомы) и одного из братьев (2018 года рождения, монолатеральная ретинобластома) выявлено генетическое нарушение с.607+1G>T, у матери (1990 года рождения) и второго брата (2013 года рождения) не выявлено семейного нарушения гена *RB1*. Наследственная форма ретинобластомы у пробанда подтверждена (рисунок 2А). Данное генетическое нарушение описано в литературе как имеющее эффект родительского происхождения: при унаследовании поврежденного аллеля по материнской линии развитие ретинобластомы отмечено в 10% случаев, по отцовской – в 68% [34]. Это объясняется различным метилированием CpG85-островок интрона 2, которое вызывает смещение экспрессии гена *RB1* в пользу материнского аллеля. Кроме этого, особенностью данного нарушения является то, что его можно детектировать у пациентов как с билатеральной ретинобластомой, так и с монолатеральной [34].

Семья №2. Пробанд – мальчик, возраст манифестации – 11 месяцев. В возрасте 6 месяцев

на плановом осмотре офтальмолога патологий не выявлено. При повторном осмотре в возрасте 11 месяцев обнаружены образования обоих глазных яблок. Со слов мамы, лейкокории и косоглазия не наблюдалось. При осмотре: по верхней и нижней назальным сосудистым аркадам выявлено по одному опухолевому белесоватому узлу, размером 1,5–2 диаметра диска зрительного нерва на границе средней и крайней периферии, слева – опухолевый узел с кальцинатом, прилегающий к макулярной зоне, размером более 10 диаметров диска зрительного нерва, с перифокальной отслойкой сетчатки; назальнее диска зрительного нерва, прилегая к нему, расположен второй опухолевый узел с небольшой отслойкой сетчатки и с кальцинатами; на крайней периферии у зубчатой линии – третий опухолевый узел основанием до 1 диаметра диска зрительного нерва. Диагноз: билатеральная ретинобластома, группа A, Ia по классификации Reese–Ellsworth правого глаза; группа B, IVa по классификации Reese–Ellsworth левого глаза. Семейный анамнез: ретинобластома у матери, родная сестра матери умерла в раннем детстве, со слов родственников, также страдала ретинобластомой. После определения генетического нарушения с.2520+4A>G у пробанда (пациент №18) проведено генетическое тестирование по детектированию данного нарушения у кровных родственников: матери и брата. Результат: у матери нарушение с.2520+4A>G выявлено, у брата – не выявлено (рисунок 2Б). Нарушение с.2520+4A>G ранее не было идентифицировано среди пациентов с ретинобластомой в других популяциях.

Семьи без наследственного анамнеза

Семья №3. Пробанд – мальчик. В возрасте 1 года и 3 месяцев родители отметили свечение зрачка правого глаза белым цветом, однако к офтальмологу обратились спустя 4 мес. Осмотр показал наличие экзофитного опухолевого узла справа (основание 14 мм, высота 12 мм), перифокальную отслойку сетчатки до 2 мм высотой и субретинальные отсевы. Диагноз: монолатеральная ретинобластома правого глазного яблока, группа D, Vb по классификации Reese–Ellsworth. Семейный анамнез не отягощен. После определения генетического нарушения с.2134T>C у пробанда (пациент №12) проведено генетическое тестирование по детектированию данного нарушения у кровных родственников: матери и отца. Результат: в образцах ДНК матери и отца пробанда генетическое нарушение с.2134T>C не выявлено (рисунок 3А). На основании этого нарушение у пациента №12 классифицировано как *de novo*.

Семья №4. Пробанд – мальчик, возраст манифестации – 11 месяцев. При плановом осмотре в 6 месяцев офтальмологом отмечены изменения,

Рисунок 2

Визуализация результатов автоматического секвенирования семей с наследственной формой ретинобластомы

А – семья 1 (нарушение с.607+1G>T); Б – семья 2 (нарушение с.2520+4A>G)

Figure 2
Sanger sequencing results in families with hereditary retinoblastoma

A – family 1 (variant c.607+1G>T); Б – family 2 (variant c.2520+4A>G)

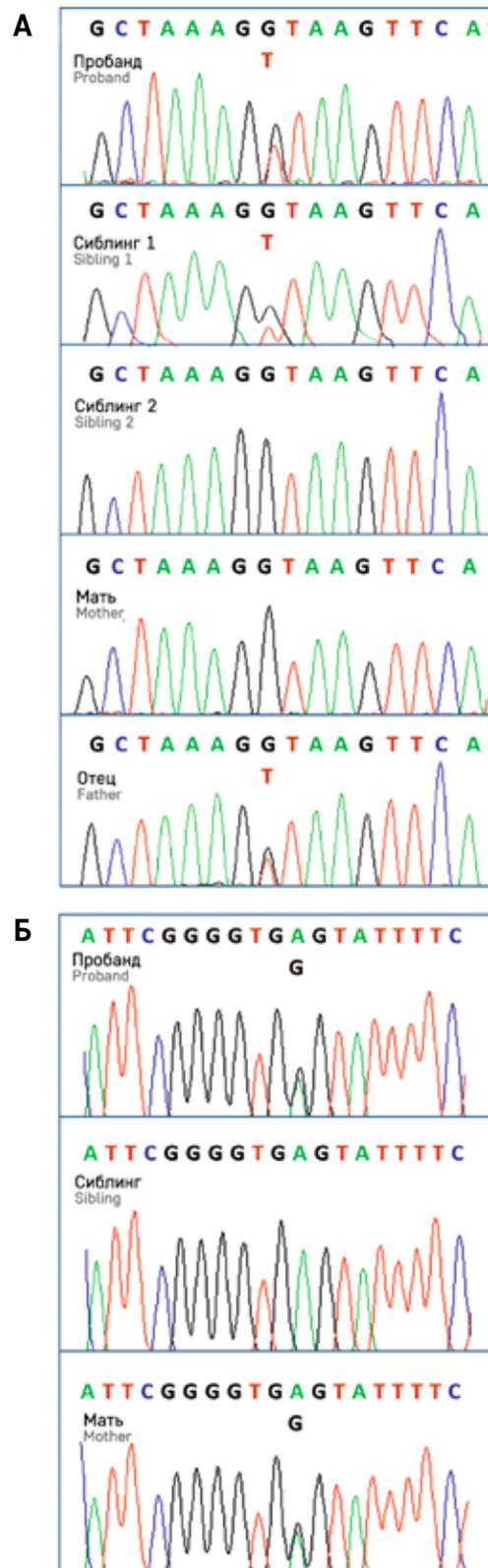
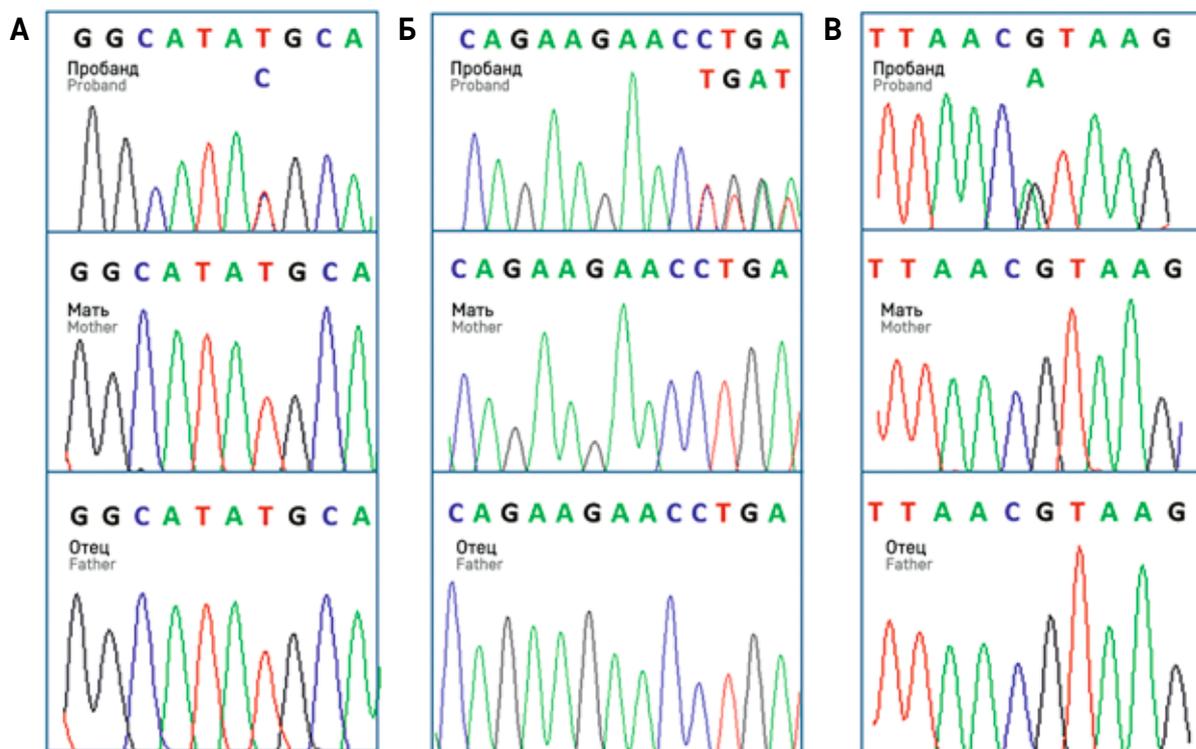


Рисунок 3

Визуализация результатов автоматического секвенирования семей пациентов с нарушением в гене *RB1 de novo*
 А – семья 3 (нарушение с.2134Т>С); Б – семья 4 (нарушение с.164delС); В – семья 5 (нарушение с.1215+1G>А)

Figure 3

Sanger sequencing results in families of the patients with *de novo* mutations in the *RB1* gene
 А – family 3 (variant c.2134T>C); Б – family 4 (variant c.164delC); В – family 5 (variant c.1215+1G>A)



рекомендован повторный осмотр через 3 мес. При повторном осмотре в возрасте 11 месяцев: в заднем полюсе правого глаза имеется выстоящий белый очаг с захватом зоны зрительного нерва, субтотально заполняющий полость глазного яблока, тотальная отслойка сетчатки (экзофитный характер роста); слева в проекции зрительного нерва, назальнее его диска выявлены опухолевые узлы, выстоящие в полость стекловидного тела, перифокальная локальная отслойка сетчатки, диск зрительного нерва визуализировался частично с назальной стороны, в макулярной зоне наличие отслойки сетчатки, над опухолевыми узлами визуализируется единичный отсев в стекловидном теле в виде сферы. Диагноз: билатеральная ретинобластома, группа D–E, Vb по классификации Reese–Ellthworth. Семейный анамнез не отягощен. После определения генетического нарушения с.164delC у пробанда (пациент №17) проведено генетическое тестирование по детектированию данного нарушения у кровных родственников: матери и отца. Результат: в образцах ДНК матери и отца пробанда генетическое нарушение с.164delC не выявлено (рисунок 3Б). На основании этого нарушение у пациента №17 классифицировано как *de novo*.

Семья №5. Пробанд – девочка, возраст клинического дебюта – 4 месяца. В возрасте 2 месяцев

отмечено присутствие нистагма. При повторном осмотре в возрасте 4 месяцев определены 3 субретинальных узла назальнее диска зрительного нерва и вокруг него с субретинальными отсевами и экссудативной отслойкой сетчатки правого глаза, а также опухолевый узел в заднем полюсе, в том числе в макулярной зоне с субретинальными отсевами и отслойкой сетчатки левого глаза. Диагноз: билатеральная ретинобластома IVa справа, IIIa слева по классификации Reese–Ellthworth. Случаев ретинобластомы в семье не зафиксировано, однако известно, что за полгода до беременности мать пробанда перенесла тиреодэктомия, полихимиотерапию, курсы радиойодтерапии по поводу рака щитовидной железы. После определения генетического нарушения с.1215+1G>A у пробанда (пациент №19) проведено генетическое тестирование по детектированию данного нарушения у кровных родственников: матери и отца. Результат: в образцах ДНК матери и отца пробанда генетическое нарушение с.1215+1G>A не выявлено (рисунок 3В). На основании этого нарушение у пациента №19 классифицировано как *de novo*.

Таким образом, согласно полученным нами данным, у 100% пациентов с билатеральной ретинобластомой выявлены врожденные нарушения, у 10% нарушения имели наследственный характер, что

соответствует данным из литературных обзоров [14, 15]. Среди спорадических нарушений в 66,6% (12/18) случаев затронута герминальная линия, что отличается более чем на 20% от общепринятого распределения [15, 16]. Однако в исследовании, проведенном в Таиланде, опубликованном в 2018 г., также в 58% случаев нарушения были герминальными без наследственного анамнеза, 48% из них были определены методом секвенирования и 10% – методом MLPA [35]. Это подчеркивает важность внедрения во многих странах комплекса молекулярно-генетических методов в диагностический процесс, ведь получаемые результаты в дальнейшем могут повлечь за собой изменение общепринятого распределения характера нарушений у пациентов без семейного анамнеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе нами впервые представлены результаты генетического исследования в группе белорусских пациентов с ретинобластомой. Показана значимость применения комплексного подхода для достижения наиболее точных результатов при выявлении врожденных нарушений. Кроме того, в

этом исследовании для определения нуклеотидных последовательностей гена *RB1* впервые в Беларуси был применен экономичный и эффективный метод – целевое высокопроизводительное секвенирование, что позволило расширить спектр выявляемых герминальных патогенетически значимых вариантов гена *RB1*. Поскольку у пациентов с наследственной (врожденной) ретинобластомой отмечен повышенный риск развития вторичных злокачественных новообразований, мы предполагаем, что применение генетического тестирования при диагностике и осуществлении клинического мониторинга у них является обоснованным.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Guryanova I.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9696-3949>

Makarevich O.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8402-324X>

Valochnik A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2474-0575>

Polyakova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0706-6622>

Konoplya N.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0592-7182>

Литература

- Liu J., Ottaviani D., Sefta M. A high-risk retinoblastoma subtype with stemness features, dedifferentiated cone states and neuronal/ganglion cell gene expression. *Nat Commun* 2021; 12 (1): 1–20. DOI: 10.1038/s41467-021-25792-0
- OMIM Entry – #180200 – Retinoblastoma; RB1 [Electronic resource]. Available at: <https://www.omim.org/entry/180200?search=RB1&highlight=rb1> (accessed December 25, 2021).
- Bornfeld N., Lohmann D., Bechrakis N. Retinoblastoma. *Ophthalmology* 2020; 117 (4): 389–402. DOI: 10.1007/s00347-020-01081-x
- Alkatan H.M., Al Marek F., Elkhamary S. Demographics of pediatric orbital lesions: A tertiary eye center experience in Saudi Arabia. *J Epidemiol Glob Health* 2019; 9 (1): 3–10. DOI: 10.2991/jegh.k.181224.001
- Liu Z., Yang Q., Cai N. Enigmatic differences by sex in cancer incidence: evidence from childhood cancers. *Am J Epidemiol* 2019; 188 (6): 1130–5. DOI: 10.1093/aje/kwz058
- Tomar A.S., Finger P.T., Gallie B. Global retinoblastoma treatment outcomes: association with national income level. *Ophthalmology* 2021; 128 (5): 740–53. DOI: 10.1016/j.ophtha.2020.09.032
- Fabian I.D., Abdallah E., Abdullahi S.U. Global retinoblastoma presentation and analysis by national income level. *JAMA Oncol* 2020; 6 (5): 685–95. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.6716
- Ensembl genome browser 104 [Electronic resource]. Ensembl release 97. Available at: <http://www.ensembl.org/index.html> (accessed December 28, 2021).
- Zou Y., Li J., Hua P. Spectrum of germline mutations in RB1 in Chinese patients with retinoblastoma: Application of targeted next-generation sequencing. *Mol Vis* 2021; 27: 1–16.
- Kooi I.E., Mol B.M., Massink M.P.G. Somatic genomic alterations in retinoblastoma beyond RB1 are rare and limited to copy number changes. *Sci Rep* 2016; 6 (1): 1–11. DOI: 10.1038/srep25264
- Francis J.H., Richards A.L., Mandelker D.L. Molecular changes in retinoblastoma beyond RB1: Findings from next-generation sequencing. *Cancers (Basel)* 2021; 13 (1): 149–61. DOI: 10.3390/cancers13010149
- Nummi K., Kivelä T. Retinoblastoma in Finland, 1964–2014: incidence and survival. *Br J Ophthalmol* 2021; 105 (1): 63–9. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2019-315744
- Munier F., Beck-Popovich M., Chantada G. Conservative management of retinoblastoma: challenging orthodoxy without compromising the state of metastatic grace. “Alive, with good vision no comorbidity”. *Prog Retin Eye Res* 2020; 73: 5. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2019.05.005
- Ishaq H., Patel B. Retinoblastoma; Florida: StatPearl. Treasure Island; 2021 [Updated 2021 Aug 11]. [Electronic resource]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545276/> (accessed 06.01.2022).
- Sheehan A.P. Retinoblastoma: Early diagnosis is crucial. *J Pediatr Health Care* 2020; 34 (6): 601–5. DOI: 10.1016/j.pedhc.2020.06.006
- Алексеева Е.А., Бабенко О.В., Козлова В.М., Ушакова Т.Л., Казубская Т.П., Саакян С.В. и др. Эффект

- родительского происхождения мутации в гене *RB1* при наследственной ретинобластоме с низкой пенетрантностью. Медицинская генетика 2019; 18 (8): 21–8. DOI: 10.25557/2073-7998.2019.08
17. Balmer A., Zografos L., Munier F. Diagnosis and current management of retinoblastoma. *Oncogene* 2006; 25 (38): 5341–9. DOI: 10.1038/sj.onc.1209622
 18. Gallie B., Ellsworth R., Abramson D., Phillips R. Retinoma: spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation? *Br J Cancer* 1982; 45 (4): 513–21.
 19. Залетаев Д.В., Стрельников В.В., Немцова М.В., Бабенко О.В., Кузнецова Е.Б., Землякова В.В. и др. Структурно-функциональный анализ опухолевых геномов и разработка тест-систем для ранней диагностики, прогноза течения и оптимизации терапии злокачественных новообразований. Вестник Российской академии медицинских наук 2013; 68 (9): 7–14.
 20. Mustafa M., Mohammad M., Abdelghani T. Impact of RB1 gene mutation type in retinoblastoma patients on clinical presentation and management outcome. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2020; 13 (3): 152–9. DOI: 10.1016/j.hemonc.2020.02.006
 21. Skalet A.H., Gombos D.S., Gallie B.L. Screening children at risk for retinoblastoma: Consensus report from the American Association of Ophthalmic Oncologists and Pathologists. *Ophthalmology* 2018; 125 (3): 453–8. DOI: 10.1016/j.ophtha.2017.09.001
 22. Garza-Garza L.A., Ruiz-Lozano R.E., Rebolledo-Méndez G. Challenge of Retinoblastoma in Mexico in 2020: Perspectives and Solutions. *J Ophthalmol* 2020; 2020: 1953602. DOI: 10.1155/2020/1953602
 23. Knudson A.G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68 (4): 820–3. DOI: 10.1073/pnas.68.4.820
 24. Mendoza P.R., Grossniklaus H.E. The Biology of Retinoblastoma. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015; 134: 503–16. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2015.06.012
 25. McGowanJordan J., Simons A., Schmid M. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1985) ISCN 1985. Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1985; 21 (1): 1–117.
 26. HGMD (The Human Gene Mutation Database) [Electronic resource]. Available at: <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> (accessed December 06, 2021).
 27. LOVD (Leiden Open Variation Database Online gene-centered collection and display of DNA variants) [Electronic resource]. Available at: <https://www.lovd.nl/> (accessed December 06, 2021).
 28. Valverde J.R., Alonso J., Palacios I. RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. *BMC Genet.* 2005; 6: 53. DOI: 10.1186/1471-2156-6-53
 29. Dommering C.J., Mol B.M., Moll A.C. RB1 mutation spectrum in a comprehensive nationwide cohort of retinoblastoma patients. *J Med Genet* 2014; 51 (6): 366–74. DOI: 10.1136/jmedgenet-2014-102264
 30. Mehyar M., Mosallam M., Tbakhi A. Impact of RB1 gene mutation type in retinoblastoma patients on clinical presentation and management outcome. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2020; 13 (3): 152–9. DOI: 10.1016/j.hemonc.2020.02.006
 31. Tomar S., Sethi R., Sundar G., Quah T.C., Quah B.L., Lai P.S. Mutation spectrum of *RB1* mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications for genetic management and counselling. *PLoS One*, 2017; 12 (6): 1–23. DOI: 10.1371/journal.pone.0178776
 32. Zhang Z., Xiao Y., Shen R. Next generation sequencing of RB1 gene for the molecular diagnosis of ethnic minority with retinoblastoma in Yunnan. *BMC Med Genet* 2020; 21 (1): 230. DOI: 10.1186/s12881-020-01150-7
 33. Kiet N.C., Khuong L.T., Minh D.D. Spectrum of mutations in the RB1 gene in Vietnamese patients with retinoblastoma. *Mol Vis* 2019; 25: 215–21.
 34. Soliman S.E., Racher H., Zhang C. Genetics and Molecular Diagnostics in Retinoblastoma--An Update. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 2017; 6 (2): 197–207. DOI: 10.22608/APO.201711
 35. Rojanaporn D., Boontawon T., Chareonsirisuthigul T. Spectrum of germline RB1 mutations and clinical manifestations in retinoblastoma patients from Thailand. *Mol Vis* 2018; 24: 778–88.