

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН**

ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

На правах рукописи

УДК: 616 – 006.576.36.044

КУШАЛИЕВ ОЛИМ АКРАМОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
РЕТИНОБЛАСТОМЫ**

5A510113-Медицинская генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на получение академической степени магистра

Научный руководитель:

д.б.н Гильдиева М.С.

Научный консультант:

д.м.н Исламов З.С.

Ташкент-2014

АННОТАЦИЯ

Рост заболеваемости злокачественными опухолями, а также своеобразие и особенности опухолевого процесса у детей привели к развитию новой науки детской онкологии. Ретинобластома (retinoblastoma) – это злокачественное новообразование, развивающееся в сетчатке глаза. Ретинобластома поражает в основном детей в возрасте от 0 до 5 лет жизни [4]. Несмотря на то, что в последние годы появились сообщения о развитии РБ у детей старше 5 лет, особенности течения опухоли у них описаны недостаточно четко. В настоящее время известно, что развитие ретинобластомы обусловлено мутацией онкосупрессорного гена -Rb1, локализованного в проксимальном отделе длинного плеча хромосомы 13 - (13q14.2)[6]. Еще в 1971г. Кнудсон предложил модель канцерогенеза ретинобластомы, согласно которой для возникновения опухоли необходимо повреждение (мутация) обоих аллелей гена- Rb1 [1]. Вероятность возникновения опухоли у носителей мутации гена ретинобластомы (пенетрантность) высокая и составляет 90% [2].

Полученные данные позволили установить, что при ретинобластоме дискриминационный уровень хромосомных aberrаций у пациентов составил 11,2%. Частота специфических aberrаций хромосом (13q-) у больных РБ составила 16,7% (5/30), у сибсов 5,1% (4/78). Остальная часть выявленных aberrаций как у больных РБ, так и у сибсов носила неспецифический характер, чтобы расцениваться как хромосомная нестабильность.

THE SUMMARY

Disease growth by malignant tumours, and also originality and features of tumoral process at children have led to development of a new science of children's oncology. Retinoblastoma (retinoblastoma) is the malignant new growth developing in a retina of an eye. Retinoblastoma amazes basically children at the age from 0 till 5 years of a life [4]. In spite of the fact that last years there were messages on development retinoblastoma at children is more senior 5 years, features of a current of a tumor at them are described insufficiently accurately. Now it is known, that development retinoblastoma is caused by a mutation oncosuppressor a gene-Rb1, localized in procsimal department of a long shoulder of a chromosome 13 - (13q14.2) [6]. Still in 1971y. Knudson has offered model canserogenez retinoblastoma according to which for occurrence damage (mutation) both allele gene – Rb 1 [1]. The probability of occurrence of a tumor at carriers of a mutation of a gene retinoblastoma (penetrates) high also makes 90 %. [2].

The obtained data have allowed to establish, that at retinoblastoma discrimination level of chromosomal aberrations at patients has made 11,2 %. Rate specific aberrations of chromosomes (13q-) at patients Rb has made 16,7 % (5/30), at sibs 5,1 % (4/78). Other part of the revealed aberrations both at patients Rb, and at sibs had nonspecific character, that as chromosomal instability.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1. Роль мутаций в канцерогенезе-----	12
2. Этиология и патогенез развития ретинобластомы.-----	14
3. Формы и стадии ретинобластомы.-----	19
Заключение по I главе-----	27
Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	27
1. Характеристика экспериментального материала.-----	27
2. Методы исследования.-----	28
Заключение по II главе-----	55
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ-----	55
1. Определение уровня специфических хромосомных и общих дискриминационных aberrаций у больных с ретинобластомой и у сибсов.-----	55
2. Проведение генеологического анализа и определить соотношения спородических и семейных форм ретинобластомы-----	60.
Заключение по III главе-----	67
ЗАКЛЮЧЕНИЕ-----	68
ВЫВОДЫ -----	69
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	70
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ-----	71

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- РБ -ретинобластома
- ДРБ – двусторонняя ретинобластома
- ОРБ – односторонняя ретинобластома
- ДЗН – диск зрительного нерва
- ЦНС – центральная нервная система
- ВЗО – вторая злокачественная опухоль
- КТ – компьютерная томография
- МРТ - магнитно-резонансная томография
- РИИ – радиоизотопное исследование
- УЗИ – ультразвуковое исследование
- RE - Reese-Ellsworth
- НХТ – неоадьювантная химиотерапия
- ИХТ – интенсивная химиотерапия
- ВХТ – высокодозная химиотерапия
- ПСК – периферические стволовые клетки
- СЕV – карбоплатин, этопозид, винкристин
- ДЛТ – дистанционная лучевая терапия
- СОД – суммарная очаговая доза
- ДНК –дезоксирибонуклеиновая кислота
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- мРНК- матричная рибонуклеиновая кислота
- М – отдалённые метастазы.
- Мх – недостаточно данных для оценки отдалённых метастазов.
- Мо – метастазов нет.
- М1 – имеются отдалённые метастазы.
- АТФ - аденозинтрифосфат

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Рост заболеваемости злокачественными опухолями, а также своеобразие и особенности опухолевого процесса у детей привели к развитию новой науки детской онкологии. В офтальмологии выделилась офтальмоонкология, в том числе и детская. Организация офтальмоонкологической службы и специальных центров связана со специфичностью течения опухолевых процессов у детей, первичным обращением больных к офтальмологам, применением специальных диагностических методик для выявления этой сложной патологии органа зрения.

Важность изучения проблемы ретинобластомы подтверждена и созданием в 1989-1991 г.г. специальной международной группы по изучению ретинобластомы RISC с центром в Филадельфии (США).

Ретинобластома (РБ) - единственная злокачественная опухоль сетчатки, встречающаяся в детском возрасте. В последние десятилетия частота РБ увеличилась 1:34 000 до 1:15 000-1:20 000 новорожденных [44]. В Узбекистане 1:20000[5]. В последние 10 лет наблюдается не только рост заболеваемости, но и увеличение частоты билатеральных форм с мультицентричным ростом опухоли[17]. Отмечена тенденция к "повзролению" РБ: увеличивается число детей старше 5 лет, страдающих РБ [13]. Примерно в 30 % случаев процесс бывает двусторонним, нередко носит семейно-наследственный характер. [22] Ретинобластома составляет 2,5—4,5% всех злокачественных опухолей у детей до 15 лет. [41,52,66]

Несмотря на множество публикаций, посвященных РБ, многие вопросы остаются дискуссионными и неразрешенными [50]. Нет единого мнения о факторах, влияющих на развитие, клиническое течение и эффективность лечения РБ. Данные о росте заболеваемости в регионах с повышенной радиоактивностью и индустриально развитых зонах разноречивы. По данным разных авторов, РБ одинаково часто поражает

как мальчиков, так и девочек [71] с небольшим преобладанием мальчиков при спорадических формах опухоли. Зарубежные авторы не отмечают особых различий в расовой принадлежности больных, эндемичности по различным регионам и населенным пунктам [54,59,67].

Ретинобластома поражает в основном детей в возрасте от 0 до 5 лет жизни. [25,34,11]. Несмотря на то, что в последние годы появились сообщения о развитии РБ у детей старше 5 лет, особенности течения опухоли у них описаны недостаточно четко. Оказалось, что увеличивается как число заболевших в старшем возрасте, так и частота врожденных и далекозашедших форм болезни [48]. А между тем, все еще отсутствуют методы ранней диагностики опухоли.

К сожалению, в последние годы утрачены те навыки и организационные достижения, которые использовались ранее при обследовании новорожденных в роддомах и поликлиниках. Офтальмопедиатры не осматривают новорожденных в роддомах, а в поликлиниках часто пренебрегают жалобами родителей на косоглазие и даже свечение зрачка у ребенка. В результате потери времени дети попадают в специализированные клиники на далеко зашедших стадиях заболевания, что ограничивает выбор методов лечения и делает невозможными органосохранные операции. Отсутствуют программа обследования детей и критерии, позволяющие выявить группы риска по ретинобластоме, методы ее профилактики и ранней диагностики.

В последние годы появились новые цитостатики, позволяющие разрушить первичный очаг внутри глаза, но сведения о применяемых дозах и протоколах разноречивы, не выработана схема органосохраняющего лечения при больших и мультицентричных опухолях [54]. Нет должного внимания к социальной реабилитации детей, выживших после лечения. Столь противоречивые и неполные данные объясняются отсутствием достаточного клинического материала и комплексных многоцентровых исследований, необходимых для выработки

обоснованной тактики обследования, лечения и реабилитации больных РБ. Все вышеперечисленное подчеркивает актуальность и целесообразность исследований по данной проблеме.

Цель исследования: Ранняя диагностика больных с ретинобластомой и прогнозирование высокого риска развития ретинобластомы среди здоровых родственников первой степени родства.

Задачи исследования:

1. На основании цитогенетического обследования больных РБ и их родственников выявить специфические и дискриминационные нарушения структуры хромосом при ретинобластоме.

2. Провести генеологический анализ родословных.

3. Определены группы высокого риска по наследственной патологии.

Практическая значимость.

Проведенные генетические анализы дадут возможность предсказывать рождения ребенка с этой патологией. Эту возможность можно будет применять в генетической консультации и предупреждать рождения ребенка с данным заболеванием

Научная новизна. Полученные данные в ходе экспериментов расширят представления о возникновении и развитии ретинобластомы. Уточнит роль генетических факторов в возникновении данной патологии среди узбекской популяции.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 70 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований, заключения и выводов. Диссертация иллюстрирована 5 таблицами и 19 рисунками. Библиографический указатель включает – 7 источников, из которых – 41 русскоязычных и 38 - дальнего зарубежья.

ГЛАВА 1. РОЛЬ МУТАЦИЙ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Повреждения гена p53 играют центральную роль в канцерогенезе человека. Точечные мутации и делеции гена p53 наблюдаются примерно в 50% случаев злокачественных заболеваний, хотя частоты повреждений варьируют в зависимости от типа опухоли [56,76,].

В отличие от дикого p53, мутанты обладают свойствами онкогенов : точечные мутанты могут иммортализовать первичные фибробласты [34,45,66] и кооперировать с онкогенами в экспериментах по трансформации клеток [12,32,54]. Мутантный p53 может вносить вклад в развитие канцерогенеза либо посредством инактивирования дикого p53, либо вследствие приобретения им новых онкогенных свойств (так называемые "gain of function" мутации).

Исследования последних лет показали, что мутации гена p53 - наиболее распространенная черта различных опухолей человека. В карциномах большинство мутаций (75-80%) являются миссенс-мутациями , продукт которых - дефектный белок; второй аллель в этих клетках, как правило, делетирован (Shields C.L. 2004)

В саркомах наряду с миссенс-мутациями встречаются делеции , инсерции и перестройки гена p53[57,64,67].

В саркомах часто сохраняется немутированный p53, что сопровождается амплификациями онкогенов, продукты которых инактивируют p53 [19]

Природа мутаций, наблюдаемых в локусе p53, по-видимому, зависит от тканевой специфики опухоли. Этот факт может быть следствием селекции определенных типов мутантных белков в карциномах, или отражать механизм мутагенеза, который, по- видимому, различен в клетках различных типов тканей. Миссенс- мутации p53 часто встречаются при карциномах мозга [73,75], карциномах молочной железы [65,68,74]

, карциномах пищевода[34,45.65]

, карциномах желудка [65,74], карциномах печени [45,61], карциномах легких [54], карциномах лимфоидной системы [38], карциномах яичников, карциномах простаты. Большинство из этих мутаций находятся в высококонсервативных областях гена. Чаще других встречаются мутации в 175, 248, 249, 273, и 282 кодонах (так называемых "горячих точках" мутаций p53).

Различные клетки (или типы тканей) характеризуются своими характерными горячими точками мутаций p53. Например, в опухолях печени у пациентов из южного Китая или южной Африки мутация p53 в 249 кодоне наблюдается наиболее часто (53% из всех рассмотренных примеров) [44,56,75]. Однако не ясно, является ли предпочтительность замен аминокислот по определенным кодонам в p53 результатом селекции специфического мутантного аллеля в клетках печени, или же это последствие воздействия определенного класса мутагенов. В пользу второй гипотезы говорит тот факт, что в случае рака легких примерно с равной частотой встречаются как транслокации, так и трансверсии в p53 локусе, в то же время опухолям толстой кишки свойственны только транслокации p53. Природа воздействующих на эпителий легких и толстой кишки мутагенов различна.

Кроме соматических мутаций в гене p53, которые обнаружены в 50-60% известных злокачественных опухолях человека, p53 мутации встречаются и в клетках эмбриональных линий от пациентов с синдромом Ли-Фраумени [42]. Синдром Ли-Фраумени является наследственной предрасположенностью к возникновению и развитию различных злокачественных новообразований, что, по-видимому, связано с передаваемым врожденным дефектом одного из аллелей p53. Для этих пациентов характерны как миссенс- так и нонсенс-мутации p53 [32,65,70]. Интересно, что у пациентов с синдромом Ли-Фраумени чаще возникают остеосаркомы, а также аденокортикоидные карциномы, рак молочной железы или рак мозга. Рак толстой кишки, который

характеризуется высоким уровнем соматических мутаций p53, встречается, напротив, очень редко [50].

Развитие технологии трансгенных животных позволило смоделировать процесс влияния наследуемой мутации p53 в одном из аллелей на возникновение опухолей. В отличие от контрольных, у 20% трансгенных мышей, несущих дополнительный мутантный аллель p53, возникали злокачественные опухоли в 6-9 месячном возрасте[53] .

2.Этиология и патогенез развития ретинобластомы

Ретинобластома является врожденной опухолью, хотя редко диагностируется к моменту рождения ребенка.Ретинобластома может возникать спорадически (случайно), но может быть и наследственной. Ретинобластома имеет в большом проценте случаев четкие генетические поломки, выявляемые в одной из 13-ой пары хромосом (ген RB1)

Идентифицированы гены, врожденные мутации которых приводят к развитию наследственных и семейных форм злокачественных опухолей. К таким генам относится ген ретинобластомы (Rb), при терминальных мутациях которого развивается врожденная форма ретинобластомы .

Ген Rb картирован. Цитогенетические методы показали, что многие случаи наследственных и спорадических форм сопровождаются делецией в участке 13q14 хромосомы человека[14,45,64]. Использование тесно сцепленного с геном Rb гена, кодирующего фермент эстеразу D , а также синтенных полиморфных рестрикционных фрагментов (RFLP), подтвердило локализацию гена Rb в локусе 13q14 .

Белковый продукт гена Rb контролирует продвижение клетки по циклу деления. Регуляция функции pRb (белка, кодируемого геном Rb) осуществляется путем его фосфорилирования-дефосфорилирования [60]. В неделящихся клетках (G0) pRb дефосфорилирован. В G1 он постепенно фосфорилируется и в гиперфосфорилированном состоянии пересекает "точку рестрикции", отделяющую G1 от S-фазы - фазы синтеза ДНК. Затем

pRb дефосфорилируется - до начала нового митотического цикла. Активность фосфорилирования определяется циклином D, взаимодействующим с митогенными сигналами. Мутации pRb делают этот белок независимым от митогенных сигналов, создающим непрерывное (и потому нерегулируемое) прохождение клеток сетчатки по циклу, что лежит в основе возникновения ретинобластомы.

Развитие ретинобластомы связано с потерей или инактивацией обоих аллелей гена. Так, если в нормальных клетках больной с гетерозиготной делецией по участку 13q14 уровень активности эстеразы D составлял 50% нормальной активности фермента, то в клетках ретинобластомы той же больной фермент не выявлялся. При этом произошла потеря гомологичной хромосомы 13, не содержащей делеции [54,58,66]. Использование RFLB, синтетических с геном Rb, показало потерю гетерозиготности по участку 13q14 во всех исследованных опухолях [32,65,73].

Ген Rb был клонирован и секвенирован [43,51,63,73].

Анализ гена Rb человека показал, что этот ген имеет очень большие размеры (200 кб). Он содержит 27 экзонов и кодирует ядерный белок RB [14,63,75].

Отнюдь не только делеции приводят к потере гетерозиготности при ретинобластоме. Были выявлены самые разные изменения в локусе 13q14. Помимо потери целой хромосомы 13, встречались делеции разных размеров, различные структурные перестройки и точечные мутации [43,44,65].

Ген Rb экспрессируется во всех тканях, кодируя мРНК размером 4,7 кб. При различных мутационных изменениях транскрипты Rb либо вообще не выявлялись, либо присутствовали аномальные (укороченные, truncated) мРНК, в то время как в нормальных тканях тех же больных и в клетках других типов опухолей (нейробластомы, миеломы и др.), присутствовал нормальный транскрипт [34,51,58]. Это явление наблюдалось как при наследственной, так и при спорадической формах. Потеря

гетерозиготности может возникать также в результате таких событий, как нерасхождение, митотическая рекомбинация, генная конверсия, а также импринтинг (imprinting).

Примерно у 50% гетерозиготных носителей герминальной мутации возникает ретинобластома, т.е. эта частота на много порядков превышает темп спонтанного мутирования гена Rb. По-видимому, частота второго события, приводящего к гомозиготности (или гемизиготности) является результатом суммарных частот всех перечисленных механизмов.

Совокупность полученных данных полностью подтвердила гипотезу Knudson об едином механизме возникновения наследственной и спорадической форм ретинобластомы, связанном с утратой или инактивацией гена Rb, т.е. во всех случаях с потерей генетической информации. Таким образом, если на уровне организма предрасположенность к ретинобластоме наследуется как доминантный признак, то на клеточном уровне мутации Rb рецессивны. Отсюда следует, что опухолеобразованию препятствует доминантный нормальный аллель, который обладает супрессорным действием.

Ген ретинобластомы (Rb ген) был открыт первым из антионкогенов и является наиболее известным из них. Тем не менее, механизм подавления роста клеток геном Rb остается неясен. Существование Rb гена было впервые предположено А. Кнудсоном. Впоследствии было показано, что развитие ретинобластомы вызывается мутацией в гене, имеющем хромосомную локализацию 13q14 [11,43,54] Мутации гена Rb, приводящие к его инактивации, связаны с развитием ряда опухолей. У пациентов с ретинобластомой мутации гена Rb были найдены в 100% случаев [66,71]

Следует отметить, что в отличие от онкогенов, где для развития опухоли может быть достаточно мутации в одном аллеле, для развития ретинобластомы должны быть инактивированы оба аллеля Rb гена.

Мутационная инактивация гена Rb обнаружена также в таких опухолях, как мелкоклеточная карцинома легких, остеосаркома, карцинома мочевого пузыря и карцинома простаты .

Введение активного Rb гена в трансформированные клетки с дефектным Rb во многих случаях ведет к подавлению злокачественных свойств, включая способность вызывать опухоли у мышей с ослабленным иммунитетом [69].

Помимо человека, Rb ген был выделен у некоторых других видов позвоночных, включая мышшь, цыпленка и лягушку [54,62,66,71].

Мышиный Rb ген гомологичен человеческому на 88%, причем по идентичным аминокислотным остаткам гомология составляет 91% [51,65,76]. У мышей, гетерозиготных по мутантному Rb гену, с высокой частотой развиваются опухоли гипофиза , для которых характерна инактивация обоих аллелей Rb гена [39,63]

Было показано, что Rb ген экспрессируется во всех нормальных тканях [56]. Однако, только в некоторых тканях инактивация обоих аллелей приводит к неконтролируемому росту.

Предполагают, что Rb является ключевым элементом из нескольких систем регуляции роста. По-видимому, в различных тканях различные системы действуют с различной эффективностью, поэтому только в некоторых типах клеток система Rb не дублируется другими системами контроля роста. Кроме того, предполагают, что инактивация системы Rb может способствовать промотированию канцерогенеза в клетках, которые обычно резистентны к трансформации за счет инактивации Rb, если уже произошло повреждение одного или нескольких других регулирующих механизмов[31].

Показано, что повышенная экспрессия Rb гена подавляет рост фибробластов человека, а также клеток эпителия молочной железы .

Введение дополнительных копий Rb гена в трансгенную мышь, повышающее экспрессию Rb в 2-3 раза, приводит к уменьшению размеров животных [19,32,49]

Исследования гена Rb и его белка привели [13] к построению модели роли Rb в регуляции клеточного цикла .

Локус RB1 расположен на хромосоме 13 и занимает около 200000 п.н. Он содержит 27 экзонов, длина интронов варьирует от 80 п.н. (интрон 15) до 60000 (интрон 17) [66,69,74,77]

3. Формы и стадии ретинобластомы

Различают пять стадий развития опухоли:

- 1) латентную;
- 2) начальную;
- 3) развитую;
- 4) далеко зашедшую;
- 5) терминальную.

Для латентной стадии ретинобластомы характерны такие ранние косвенные признаки, как одностороннее расширение зрачка, замедление или отсутствие его реакции на свет. Более выражен бывает не прямой, а содружественный зрачковый рефлекс. Может быть уменьшена глубина передней камеры. Эти признаки могут сочетаться с небольшими изменениями на глазном дне.

Начальная стадия характеризуется тем, что при офтальмоскопии на глазном дне обнаруживается желтовато-белый очаг с нечеткими контурами, часто покрытый сосудами сетчатки. Вокруг очага наблюдаются

мелкие очажки-сателлиты. Рост опухоли приводит к амаврозу (слепоте). Опухоль может распространяться в стекловидное тело в виде серовато-белых, иногда желтоватых или зеленоватых масс с нерезкими границами, на поверхности которых видны геморрагии. Ретинобластома обнаруживается при боковом освещении и невооруженным глазом по желтому свечению области зрачка. Именно последний симптом обычно заставляет родителей показать ребенка окулисту. Процесс может распространяться по сетчатке (экзофитный рост) и в сторону стекловидного тела (эндофитный рост). Появление отслойки сетчатки затрудняет диагностику.

Развитая стадия (стадия глаукомы) характеризуется ростом опухоли и увеличением объема содержимого глаза, что нередко приводит к повышению внутриглазного давления. При этом возможны боли в глазу, застойная инъекция, отек роговицы, уменьшение глубины и помутнение влаги передней камеры (псевдогипо-пион) в связи с тем, что отдельные частицы опухоли отрываются и рассеиваются внутри глаза. Зрачок расширен и не реагирует на свет. В отдельных случаях в радужке обнаруживают импланта-ционные узелки, напоминающие туберкулезные.

Далеко зашедшая стадия (стадия прорастания). Этой стадии ретинобластомы присуще прорастание опухоли за пределы глазного яблока, чаще сквозь склеру, вдоль сосудов, через оболочки зрительного нерва и т. д. Прорастание опухоли кзади проявляется экзофтальмом с ограничением подвижности глаза, распространение процесса в полость черепа вызывает расширение канала зрительного нерва, выявляемое на рентгенограмме.

В терминальной стадии (стадии метастазов) определяются увеличенные шейные, подчелюстные лимфатические узлы, со стороны глаза наблюдаются дальнейшие грубые изменения вплоть до распада оболочки и резчайшего экзофтальма (глаз вывихнут). Выявляются опухолевидные образования в костях черепа, бывают увеличены и бугристы печень,

селезенка, почки и другие органы. Процесс сопровождается болевым синдромом, началом кахексии, изменениями картины крови.

Клиническая картина. Ретинобластома может быть односторонней и двусторонней. Двусторонние опухоли часто сочетаются с микроцефалией, незаращением неба и другими пороками эмбрионального развития. Начало заболевания обычно проходит незаметно. Первым клиническим симптомом может быть понижение остроты зрения. Иногда ранним клиническим признаком одностороннего поражения может быть косоглазие. Затем присоединится изменение цвета глаза (желтоватый рефлекс), наблюдаемое в глубине глазного яблока и видимое через зрачок (так называемый амавротический кошачий глаз). Такое явление возникает из-за наличия глиоматозных узлов на сетчатке и заставляет родителей ребенка обратиться к врачу. Опухоль отличается медленным ростом.

В клинике ретинобластомы при объективном исследовании глазного дна различают четыре стадии.

На первой стадии видны ретинальные беловато-розовые очаги с гладким или неровным рельефом, новообразованными сосудами и серыми участками кальцификатов. Размеры их не превышают одного квадранта глазного дна, окружающие ткани не изменены.

На второй стадии происходит интраокулярная диссеминация. Беловатые включения различных размеров уже наблюдаются в стекловидном теле, отмечаются преципитатоподобные отложения в углу передней камеры глазного яблока и на задней поверхности роговицы. Появляются вторичная глаукома, буфтальм (гидрофтальм). При прорастании опухолью сетчатки скопление под ней экссудата приводит к отслойке сетчатки. Зрение снижается до полной слепоты.

Третья стадия характеризуется экстраокулярным распространением опухоли. Сопровождающееся экзофтальмом прорастание опухоли в полость черепа, чаще всего по зрительному нерву, дает симптомы поражения головного мозга (головную боль, тошноту, рвоту). Прорастание

ретинобластомы в сосудистую оболочку глаза приводит к гематогенному диссеминарованию и неблагоприятному исходу. В результате некроза опухоли может развиваться токсический увеит.

На четвертой стадии к глазной симптоматике присоединяются симптомы, обусловленные метастазированием. Метастазирование происходит в лимфатические узлы, кости, мозг, печень и другие органы.

Осложнения и диагностика. Осложнением ретинобластомы при благоприятном исходе может быть потеря зрения на одном или обоих глазах. Возможным осложнением является развитие ретино-бластомы в саркому (рабдомиосаркому), лейкоза. Диагностическим критерием ретинобластомы на первой стадии заболевания служит обнаружение амавротического кошачьего глаза. Для объективного подтверждения диагноза прибегают к офтальмоскопии, рентгенографии, ультразвуковому исследованию глазного яблока и черепа. Ретинобластому следует дифференцировать от псевдоглиомы, которая возникает в результате воспалительного процесса, а также ее нужно различать с организовавшимся кровоизлиянием, пролиферирующим ретинитом, отслойкой сетчатки, болезнью Коут-са, цистицеркозом, туберкулезом и т. д. Для постановки диагноза важны анамнез (перенесенные инфекционные заболевания), наличие в некоторых случаях на рентгенограммах орбиты очагов обызвествления. Помогают в диагностике диафаноскопия и эхографические исследования.

Лечение и профилактика. На первой и второй стадиях болезни возможно проведение органосохранной криоаппликации. На более поздних стадиях лечение заключается в своевременном проведении хирургического удаления опухоли (энуклеации пораженного глаза при одностороннем процессе или обоих глаз при двустороннем). Энуклеация глазного яблока проводится с резекцией зрительного нерва на расстоянии 10–15 см от заднего полюса глазного яблока. В дальнейшем проводится лучевая терапия в сочетании с химиотерапией или самостоятельно. Может

проводиться и фотокоагуляция. В качестве противоопухолевых препаратов применяют циклофосфан, проспедин, метотрексат-эбеве.

Профилактика ретинобластомы заключается в своевременном генетическом обследовании тех семей, чьи родственники проходили лечение по поводу ретинобластом в прошлом.

TNM – клиническая классификация ретинобластомы у детей

Степень вовлечения сетчатки выражают в процентах

T – первичная опухоль.

Tx – недостаточно данных для оценки первичной опухоли.

To – нет признаков первичной опухоли.

T1 – опухоль занимает 25% или меньше глазного дна.

T2 – опухоль занимает >25% сетчатки, но не более 50%.

T3 – опухоль занимает >50% сетчатки, и/или выходит за пределы сетчатки, но располагается внутри глаза.

T3a – опухоль занимает >50% сетчатки и имеются злокачественные клетки в стекловидном теле.

T3b – вовлечение в процесс зрительного нерва.

T3c – вовлечена передняя камера, наличие или отсутствие распространения на увеальный тракт.

T4 – опухоль с экстраокулярным ростом.

T4a – прорастание в ретробульбарный зрительный нерв.

T4b – другое экстраокулярное распространение.

No – метастазов в лимфоузлах нет.

N1 – метастазы в региональных лимфоузлах.

M – отдалённые метастазы.

Mx – недостаточно данных для оценки отдалённых метастазов.

Mo – метастазов нет.

M1 – имеются отдалённые метастазы.

m – множественные опухоли

f – для обозначения случаев с семейным анамнезом.

d – для обозначения диффузного вовлечение сетчатки.

Морфологическое строение опухоли.

Последние исследования показали, что ретинобластома является опухолью нейроэпителиального происхождения, которую можно рассматривать как одну из примитивных нейроэктодермальных бластом детского возраста. Вероятно, она происходит из ретино-предшествующих клеток, и поэтому клетки опухоли имеют некоторое структурное подобие ретинофоторецепторных и амакриновых клеток. Строма в опухоли отсутствует. В зависимости от степени дифференциации опухолевых клеток различают ретинобластома, встречающуюся чаще, и ретиноцитому. Более злокачественной из них является первая, недифференцированная форма. При ней клетки опухоли группируются вокруг сосудов, образуя так называемые псевдорозетки. Ретиноцитомы, дифференцированная форма опухоли, состоит из более дифференцированных клеток, из которых образуются истинные розетки Флекснера-Винтерштейнера. Возможно смешанное строение опухоли.

Ретинобластома характеризуется быстрым ростом и, вследствие недостаточного кровоснабжения, некротизируется. В очагах некроза откладываются соли кальция, образуя характерные для больших опухолей кальцификаты. Классически различают два вида макроскопического роста опухоли — эндофитный, при котором опухоль растет в направлении центра глаза, разрушая внутренние слои сетчатки и стекловидное тело, и экзофитный, или стеющийся, при котором опухоль инфильтрирует преимущественно наружные слои сетчатки, распространяясь в сторону субретинального пространства. Большие опухоли с экзофитным ростом могут вызвать отслоение сетчатки с последующим накоплением субретинального транссудата. **Оба** вида роста опухоли не имеют значимого прогностического значения.

Редко, в 1—2% случаев, у детей старшего возраста может наблюдаться инфильтративная форма ретинобластомы, характеризующаяся

диффузным утончением сетчатки, скоплением экссудата в передних отделах стекловидного тела, ранним проявлением псевдогипопиона и передних спаек.

Проявление заболевания разнообразно и зависит от размера опухоли, места ее локализации и типа роста. Вначале опухоль располагается в пределах сетчатки. Затем, по мере роста, нарушает стекловидную пластинку, распространяется на сосудистую оболочку и стекловидное тело. По мере эндофитного роста бластомы формируется проминирующий в стекловидное тело узел серовато-беловатого цвета круглой или овальной формы. Узлы ретинобластомы могут быть единичными или множественными. Острота зрения при локализации опухоли в центральных отделах глазного дна рано и резко снижается, и появляется косоглазие.

В случаях расположения опухоли на периферии зрение резко снижается по мере ее распространения в центральную зону глазного дна.

Опухоль, увеличиваясь в размерах, может заполнить всю полость глазного яблока, прорастает сосудистую оболочку. В результате разрушения и прорастания трабекулярного аппарата глаза нарушается отток внутриглазной жидкости и повышается внутриглазное давление. Появляются боли в глазу, застойная инфекция, отек роговицы, наблюдается расширение зрачка и отсутствие его реакции на свет. У детей младшего возраста под влиянием повышенного офтальмотонуса глазное яблоко, как правило, увеличивается. При обширных дистрофических изменениях и некрозе ткани опухоли нередко развивается воспалительный процесс (иридоциклит, увеит). Вследствие отека орбитальной клетчатки может возникнуть экзофтальм. При росте опухоли за пределы глазного яблока, в глазницу, этот симптом появляется раньше и быстро нарастает. Возможно разрушение костных стенок глазницы и проникновение опухоли в околоносовые пазухи.

При распространении ретинобластомы по зрительному нерву в полость черепа (в субарахноидальное пространство) наблюдаются мозговые симптомы (головная боль, тошнота, рвота). Прорастание опухоли через стенку глазного яблока приводит к формированию экстрабульбарного узла. При распространении опухоли кпереди возможно появление очагов некроза роговицы.

Ретинобластома характеризуется лимфогенным и гематогенным метастазированием. В первом случае метастазы появляются в околушных, подчелюстных и шейных лимфатических узлах, а во втором — в костях черепа, трубчатых костях нижних конечностей и печени. В редких случаях можно наблюдать спонтанную регрессию ретинобластомы, что связывают с иммунологическими факторами и нарушением кровообращения.

Заключения по I главе.

Ретинобластома это злокачественная опухоль сетчатки глаза, которая встречается от 0 до 5 лет. Опухоль имеет семейные и спорадические формы. Делеция 13 пары хромосом является одним из этиологических факторов данной патологии. Проявление заболевания очень разнообразно и зависит от размера опухоли, от места ее локализации, типа роста. По началу опухоль располагается в пределах сетчатки. После чего, по мере роста, нарушает стекловидную пластинку, распространяется на сосудистую оболочку и стекловидное тело. По мере эндофитного роста бластомы формируется проминирующий в стекловидное тело узел серовато-беловатого цвета круглой или овальной формы. Узлы ретинобластомы могут быть единичными или множественными. Ретинобластома может быть как с одной стороне, так и с двух сторон. Осложнением ретинобластомы может быть потеря зрения, возможно проявления саркомы.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика экспериментального материала.

Материалом для цитогенетических исследований была использована периферическая кровь больных ретинобластомой, их пробандов, и здоровых людей. Для определения хромосомных aberrаций из форменных элементов крови брали лимфоциты которые, служат объектом цитогенетического анализа у человека.

Цитогенетический анализ проводился 30 пациентам ретинобластомой, 30 здоровым людям, 78 робандам и 1 пациенту с псевдоретинобластомой.

Все операции при работе с ростовыми средами и репаратами проводили в стерильных условиях с использованием ламинарного бокса. Буферы были приготовлены на бидистиллированной воде, отфильтрованы через мембранные фильтры(0,22 мкм «Millipore», Германия) и автоклавированы при 1,2 атм 30 мин.

Стеклянная посуда перед использованием была предворительна стерилизована при 160⁰С в течении 120 мин. Приспособления, посуда из полимерных материалов подвергались облучению ультрафиолетовым светом в течении 30 мин.

Методы исследований.

Характеристика цитогенетического метода.

В 1956г. было доказано, что в соматических клетках человека содержится 46 хромосом (в половых 23 хромосомы) - носителей генетической информации. В конце 60-х – начале 70-х годов были разработаны методы, позволяющие различить каждую хромосому и исследовать ее структуру. Благодаря этому было установлено, что

множество тяжелых врожденных заболеваний определяется нарушениями структуры хромосом или их количества в клетке.

Первое условие цитогенетической диагностики - наличие делящихся клеток в материале для цитологического исследования.

Костный мозг, ткани семенника и хорион имеют достаточный митотический индекс для использования в цитогенетике. Однако, как показал опыт, несравненно информативнее исследование на культурах клеток: клетки освобождены от элементов соединительной ткани и хорошо суспендируются. Митотический индекс в культуре клеток много выше, чем в тканях организма.

Культуры клеток можно получать из кусочков кожи (растут фибробласты), костного мозга, эмбриональных тканей, хориона, клеток амниотической жидкости. Наиболее удобным объектом для медицинских генетиков оказалась культура лимфоцитов периферической крови (рис. 1.). Для ее получения достаточно взять 1-2 мл венозной крови и добавить её

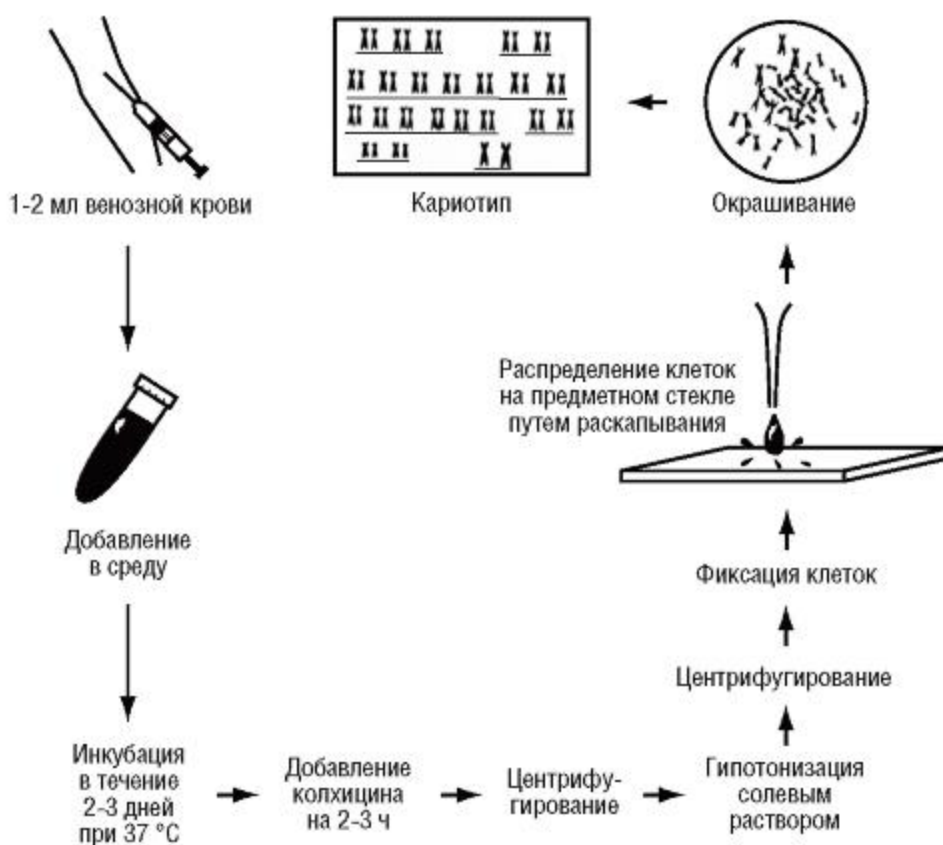


Рис. 1. Приготовление цитогенетических препаратов путем культивирования лимфоцитов периферической крови

в смесь питательной среды с фитогемагглютинином (белок бобовых растений). Он вызывает иммунную трансформацию и деление лимфоцитов. Продолжительность культивирования составляет 48-72 ч.

Вторым методическим условием цитогенетических исследований является использование колцемида (или колхицина), разрушающего веретено деления и останавливающего клеточное деление на стадии метафазы. Колцеמיד добавляют в культуры клеток за 2-3 ч до окончания культивирования: митотический индекс в культуре клеток за 2-3 ч повышается в 2-3 раза. Даже без культивирования экспозиция с колцеמידом увеличивает число метафаз. Хромосомы в присутствии колцемида укорачиваются в результате продолжающейся конденсации, следовательно, в препарате они легче отделяются одна от другой.

Если необходим детальный анализ определенного района хромосомы, сильно конденсированные хромосомы на стадии метафазы (метод называется метафазным) непригодны для анализа. Клетку нужно зафиксировать на стадии, предшествующей метафазе, когда хромосома редуцировалась, но еще не полностью конденсировалась. Это стадия прометафазы. Хотя хромосомы на стадии прометафазы плохо разъединены (они еще очень длинные), и в препарате много наложений одной хромосомы на другую, что, безусловно, затрудняет анализ, все же в отдельных клетках можно найти нужный участок, пригодный для анализа. Этот метод (или подход), в отличие от метафазного метода, называют **прометафазным**, или методом **высокоразрешающей цитогенетики**. Суть модификации метода состоит в прекращении процесса спирализации и конденсации хромосом в профазе с помощью препаратов, например метатрексата, которые вводят в культуру клеток за несколько часов до фиксации.

Следующее условие для получения хороших метафазных пластинок - гипотонизация клеток (гипотонический шок). Обычно для этого используют гипотонический раствор хлорида калия или цитрата натрия. В гипотоническом растворе клетки набухают, ядерная оболочка разрывается, межхромосомные связи рвутся, и хромосомы свободно плавают в цитоплазме.

Культивирование клеток, применение колцемида и гипотонизация стали условиями, на основе которых сформировались современные цитогенетические методы.

Клеточную суспензию фиксируют смесью метанола и уксусной кислоты (3:1), затем суспензию центрифугируют и меняют фиксатор.

Смесь клеток с фиксатором может сохраняться при температуре +4 °С в течение нескольких недель. При нанесении такой суспензии на чистое предметное стекло метафазная клетка расправляется и в ее пределах располагаются отдельно лежащие хромосомы. При высыхании фиксатора хромосомы прикрепляются к стеклу.

Выше описана методика получения препаратов из культуры лимфоцитов, которая используется наиболее часто. Для диагностических целей можно готовить препараты из хориона, костного мозга, семенников, культуры фибробластов, культуры амниоцитов. Процедуры для каждого объекта отличаются от описанной выше, но общий принцип сохраняется: накопление метафаз, гипотонизация, фиксация, капанье на предметное стекло, окраска, кариотипирование.

Окраска препаратов

Следующая стадия цитогенетических методов - окраска препаратов. Методы окраски бывают простыми, дифференциальными, флюоресцентными.

Наиболее распространен метод окраски по Гимзе, или **простая окраска** (в русскоязычной литературе распространен также термин «рутинная окраска»). Краситель Гимзы окрашивает все хромосомы равномерно по всей длине (рис. 2.) При этом контурируются центромера, спутники (иногда со спутничными нитями) и вторичные перетяжки. Механизм связывания красителя

Гимзы хромосомами неясен. Он не является специфичным для какого-либо азотистого основания ДНК.



Рис. 2. Метафазная пластинка при простой окраске

При простой окраске возможна только групповая идентификация хромосом, поэтому данный метод используется для ориентировочного определения числовых аномалий кариотипа. Структурные хромосомные аномалии (делеции, транслокации, инверсии), выявляемые при простой окраске, должны быть идентифицированы с помощью дифференциальной окраски.



Рис. 3. Метафазная пластинка с радиационно-индуцированными хромосомными aberrациями

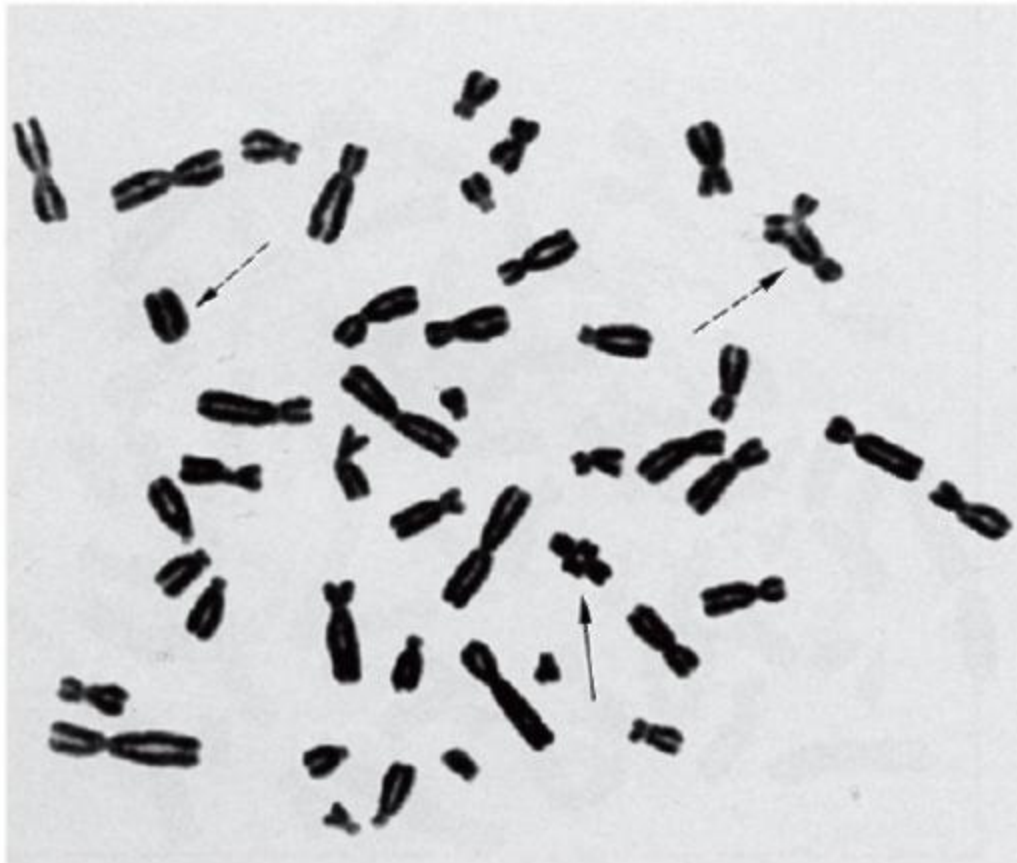


Рис. 4. Метафазная пластинка (неполная) с химически-индуцированными абберациями

Простая окраска широко применяется для изучения хромосомного мутагенеза (учет хромосомных аббераций) при проверке факторов окружающей среды на мутагенность. На рис. 4. хорошо видны абберации, возникшие под влиянием радиации и химических мутагенов.

Метод простой окраски хромосом как единственный метод изучения кариотипа человека применялся до начала 70-х годов XX в. С его помощью за 10 лет были открыты основные хромосомные болезни, показана роль хромосомных аномалий в спонтанных абортах, врожденных пороках развития и канцерогенезе, разработаны принципы биологической дозиметрии.

Морфологическая однородность хромосомы по длине на стандартно приготовленных и окрашенных по Гимзе препаратах обманчива. Прогресс цитогенетики человека позволил выявить глубокую линейную дифференцированность не только функции, но и структуры хромосом. В 70-х годах в практику вошли методы **дифференциального окрашивания**.

Под дифференциальной окрашиваемостью хромосом понимают их способность к избирательному окрашиванию по длине без прижизненной модификации какими-либо воздействиями. Дифференциальное окрашивание хромосом обеспечивается сравнительно простыми температурно-солевыми воздействиями на фиксированные хромосомы. При этом выявляется структурная дифференцировка хромосом по длине, выражающаяся в чередовании эу- и гетерохроматиновых

районов (темные и светлые полосы). Протяженность этих участков специфична для каждой хромосомы, соответствующего плеча и района. Как видно на рисунках 5 и 6, при дифференциальной окраске идентифицируются все хромосомы, плечи и даже определенные районы. Каждая хромосома имеет свой рисунок исчерченности. При дифференциальной окраске метафазных хромосом в

кариотипе можно оценить около 200-400 участков (разрешающая способность метода), на стадии прометафазы - до 2000.



Рис. 5. Метафазная пластинка после дифференциальной окраски

Первоначально при специальном окрашивании хромосом использовали флюоресцентное алкилирующее вещество акрихин-иприт. Этот вариант был назван **Q-методом**, он требует быстрой обработки препарата, что не всегда удобно. Для просмотра препарата надо пользоваться люминесцентным микроскопом.

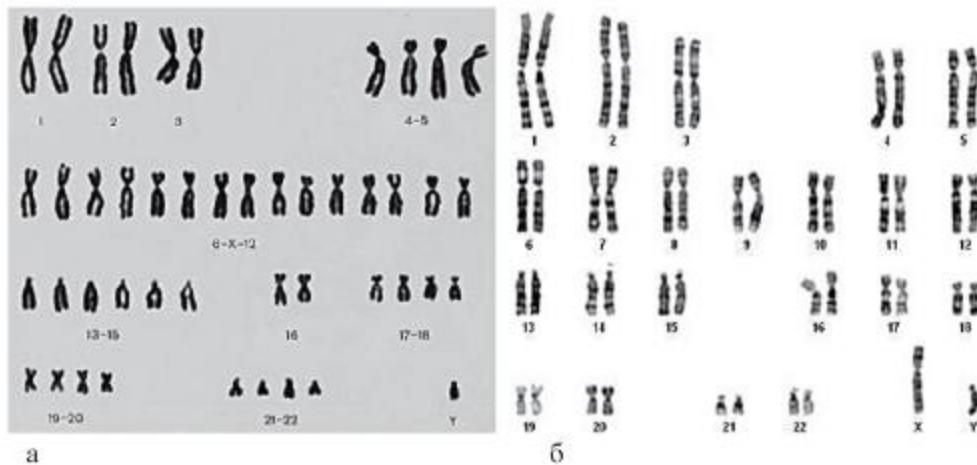


Рис.6. Кариотипы при простой (а) и дифференциальной (б) окраске

В дальнейшем была разработана методика дифференциальной окраски без флюоресцентных

красителей. Наиболее широко используется **G-окраска** (по Гимзе). Хромосомы нужно предварительно обрабатывать (инкубация в солевом растворе либо обработка протеазой). Предварительная обработка частично нарушает структуру хромосом, в некоторых участках она восстанавливается при окраске, что и придает хромосоме индивидуальную исчерченность. Механизм образования сегментов пока недостаточно ясен. Предполагается, что окрашенные сегменты - это гетерохроматиновые, поздно реплицирующиеся участки хромосом с повторяющимися последовательностями ДНК, а неокрашенные - это эухроматиновые участки, в которых расположены кодирующие последовательности.

Для идентификации хромосом, помимо методов выявления линейной структурной дифференцированности, можно воспользоваться одной из важных характеристик хромосом человека - асинхронностью их репликации по длине. Этот метод разработал талантливый отечественный цитогенетик А.Ф. Захаров о его роли в цитогенетике можно прочитать на компакт-диске. «Рисунки» последовательности репликации (рано или поздно реплицирующиеся участки) специфичны для каждой хромосомы.

Для выявления последовательности репликации применяется аналог тимидина - 5-бромдезоксимуридин. Участки хромосомы, включившие этот аналог, окрашиваются плохо. Используя этот метод, можно идентифицировать любую хромосому или хромосомную перестройку.

5-бромдезоксимуридин вводят в культуру на 24 ч и более для дифференциальной окраски сестринских хроматид. Если 5-бромдезоксимуридин ввести на полный клеточный цикл, то вновь образуемая хроматида включит аналог тимидина и будет окрашиваться слабо. Другая хроматида (старая) окрашивается, как обычно, интенсивно (рис.7). Этот метод позволяет легко выявлять обмены между сестринскими хроматидами, число которых увеличивается при наследственных болезнях с хромосомной нестабильностью (анемия Фанкони, пигментная ксеродерма и др.) (рис. 8).



Рис. 7. Метафазная пластинка с дифференциальной окраской сестринских хроматид

Число обменов сестринских хроматид увеличивается также при мутагенных воздействиях, поэтому метод учета обменов сестринских

хроматид широко используется при изучении мутационного процесса у человека.

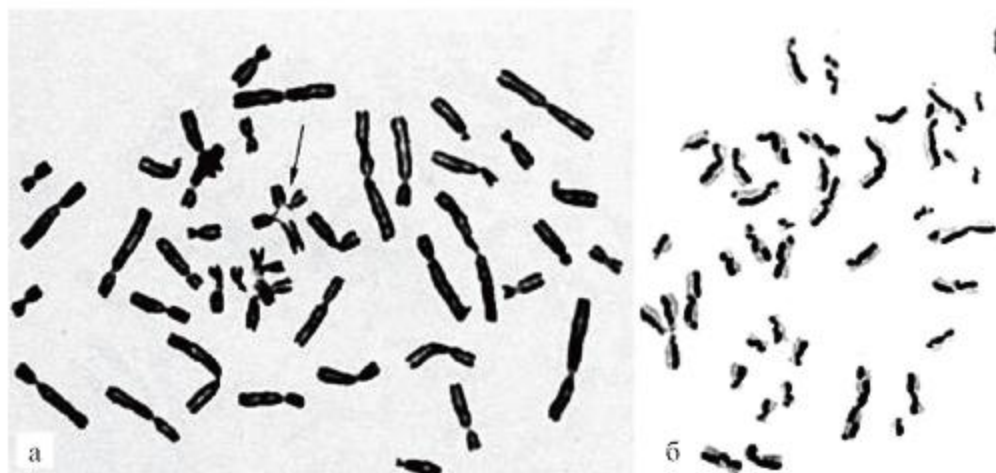


Рис. 8. Хроматидные aberrации (а) и сестринские хроматидные обмены (б) при заболеваниях с хромосомной нестабильностью

Ряд нарушений структуры или количества хромосом не проявляется никакими симптомами. Единственной причиной для обращения к врачу у таких пациентов может быть бесплодие. Поэтому клиника репродукции является нередко единственным учреждением, где такое нарушение может быть выявлено и приняты меры для его преодоления.

Кариотипирование при бесплодии показано в следующих случаях:

Необструктивная азооспермия

Тяжелая олигозооспермия (<5 млн/мл).

Задержка полового развития

Первичная аменорея

Вторичная аменорея (преждевременная менопауза)

Привичное невынашивание раннего срока беременности (наличие 2 и более самопроизвольных аборт в первом триместре беременности) - обследуются оба родителя. В семьях с отягощенным акушерским анамнезом (привычное невынашивание, особенно ранних сроков, мертворождение, рождение ребенка с множественными врожденными пороками развития (МВПР) - хромосомные нарушения встречаются от 5 до 15% случаев

Обследование доноров спермы и яйцеклеток.

В некоторых случаях цитогенетического исследования бывает недостаточно для выдачи заключения о кариотипе, в этих случаях используют молекулярно-цитогенетические методы в частности флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH). Метод – FISH позволяет выявлять более тонкое строение отдельных районов определенных хромосом, быстро исследовать какой либо хромосомный участок в различных тканях (органах). Он актуален в тех случаях, когда исследуемый материал имеется в малом количестве.

Метод позволяет идентифицировать кариотип (особенность строения и число хромосом), путем записи кариограммы. Цитогенетическое исследование проводится у пробанда, его родителей, родственников или плода при подозрении на хромосомный синдром либо другое хромосомное нарушение.

Объектом исследования служат культуры лимфоцитов периферической крови, фибробластов кожи, клеток других тканей.

С помощью метода определяется наличие X и Y полового хроматина, определяющего истинную половую принадлежность. Половой хроматин (тельце Барра) - в виде компактной глыбки в ядрах соматических клеток

имеется только у женщин. Он определяется в эпителиальных клетках ротовой полости, вагинальном эпителии и клетках волосяной луковицы.

Генеалогический метод, или метод анализа родословных .

В основе этого метода лежит составление и анализ родословных. Этот метод широко применяют с древних времен и до наших дней. Родословные человека составлялись на протяжении многих столетий в отношении царствующих семейств в Европе и Азии.

Как метод изучения генетики человека генеалогический метод стали применять только с начала XX столетия, когда выяснилось, что анализ родословных, в которых прослеживается передача из поколения в поколение какого-то признака (заболевания), может заменить собой фактически неприменимый в отношении человека гибридологический метод.

При составлении родословных исходным является человек — пробанд, родословную которого изучают. Обычно это или больной, или носитель определенного признака, наследование которого необходимо изучить. При составлении родословных таблиц используют условные обозначения, предложенные Г. Юстом в 1931 г. (рис.9.) Поколения обозначают римскими цифрами, индивидов в данном поколении — арабскими.

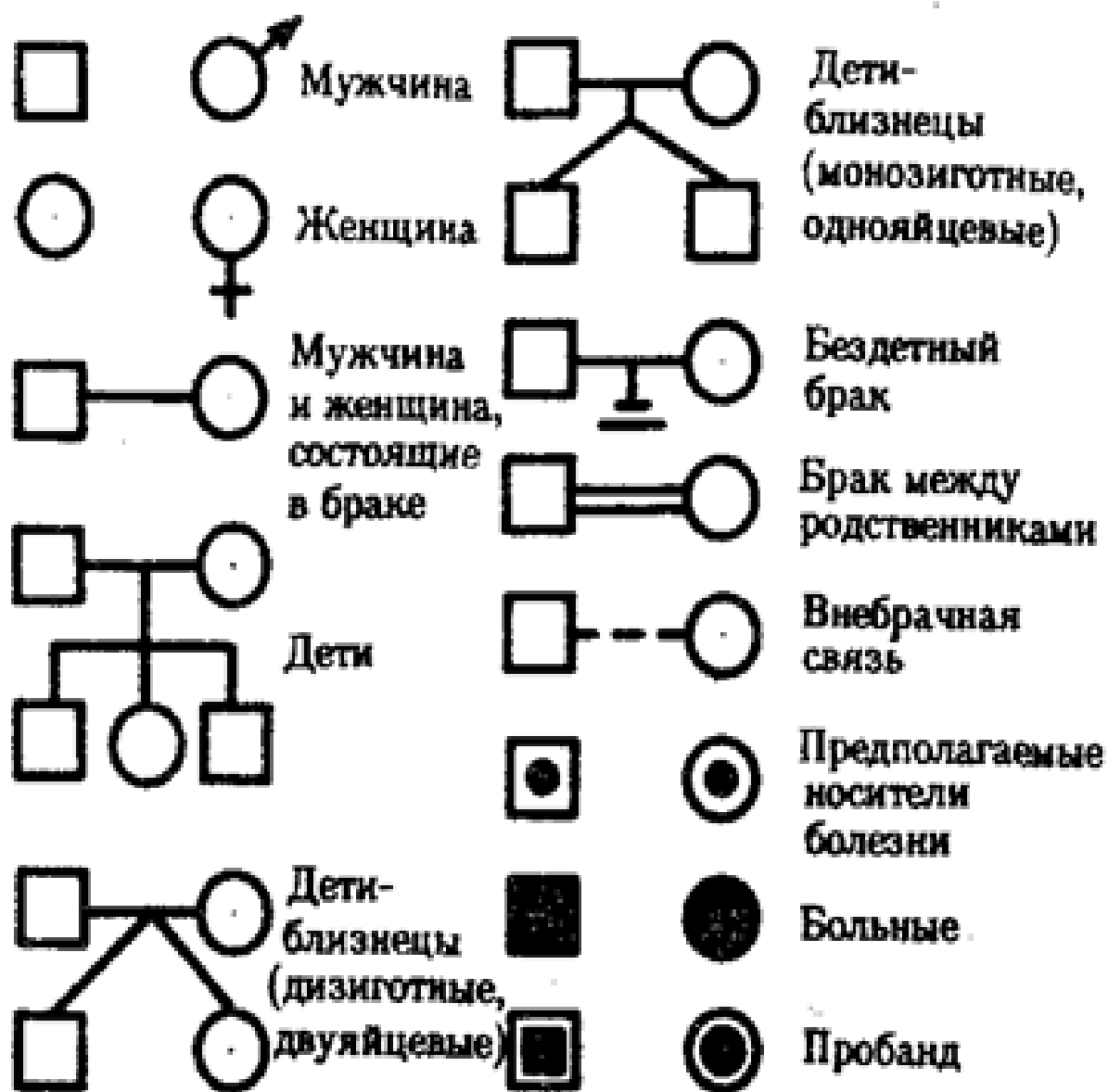


Рис. 9. Условные обозначения при составлении родословных (по Г. Юсту)

С помощью генеалогического метода может быть установлена наследственная обусловленность изучаемого признака, а также тип его наследования (аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный, X-сцепленный доминантный или рецессивный, Y-сцепленный). При анализе родословных по нескольким признакам может быть выявлен сцепленный характер их наследования, что используют при составлении хромосомных карт. Этот метод позволяет изучать интенсивность мутационного процесса, оценить экспрессивность и пенетрантность аллеля. Он широко используется в медико-генетическом консультировании для прогнозирования потомства. Однако необходимо отметить, что

генеалогический анализ существенно осложняется при малодетности семей. Генеалогический метод (метод составления родословных) позволяет проследить наследование признаков (нормальных или патологических) в ряду поколений с указанием родственных связей между членами родословной. Он включает в себя два этапа:

- составление родословной на основании сведений, полученных от пробанда, с использованием специальных символов (обозначения Юста);
- анализ родословной (определение типа наследования, генотипов всех членов родословной, прогнозирование проявления признака у потомков).

Анализ основан на генетических закономерностях моногенного наследования менделирующих признаков. Менделирующий признак альтернативен, дискретен, детерминирован наличием своего аллеля, прослеживается по поколениям и подчиняется законам расщепления. Дискретность признака можно оценить по морфологическим, физиологическим, биохимическим, клиническим, иммунологическим критериям. Большую работу по систематизации изученных наследственных признаков проводит М. Кьюсик и публикует их в виде «Каталога менделирующих признаков у человека». Родословные имеют характерный вид, который определяется особенностями типа наследования: аутосомное и сцепленное с полом; доминантное и рецессивное). Каждый тип наследования имеет свои специфические особенности.

Генеалогический метод является эквивалентом гибридологического, который модифицирован в соответствии с социальными и биологическими особенностями человека. Он используется в медико-генетическом консультировании, для определения сцепленного наследования, пенетрантности генов и др.

Родословные при аутосомно-доминантном наследовании. Для аутосомного типа наследования в целом характерна равная вероятность встречаемости данного признака как у мужчин, так и у женщин. Это обусловлено одинаковой двойной дозой генов, расположенных в аутосомах у всех представителей вида и получаемых от обоих родителей, и зависимостью развивающегося признака от характера взаимодействия аллельных генов.

Если анализируется признак, не влияющий на жизнеспособность организма, то носители доминантного признака могут быть как гомо-, так и гетерозиготами. В случае доминантного наследования какого-то патологического признака (заболевания) гомозиготы, как правило, нежизнеспособны, а носители этого признака — гетерозиготы.

Таким образом, при аутосомно-доминантном наследовании признак может встречаться в равной мере у мужчин и у женщин и прослеживается при достаточном по численности потомстве в каждом поколении по вертикали. Анализируя родословные, необходимо помнить о возможности неполного пенетрирования доминантного аллеля, обусловленной взаимодействием генов или факторами среды. Показатель пенетрантности может быть вычислен как отношение фактического числа носителей признака к числу ожидаемых носителей этого признака в данной семье. Необходимо также помнить, что некоторые заболевания проявляются не сразу с момента рождения ребенка. Многие болезни, наследуемые по доминантному типу, развиваются лишь в определенном возрасте. Так, хорей Гентингтона клинически проявляется к 35—40 годам, поздно проявляется и поликистоз почек. Поэтому при прогнозировании подобных заболеваний в расчет не принимаются братья и сестры, не достигшие критического возраста.

Первое описание родословной с аутосомно-доминантным типом наследования аномалии у человека было дано в 1905 г. В ней

прослеживается передача в ряду поколений брахидактилии (короткопалости).

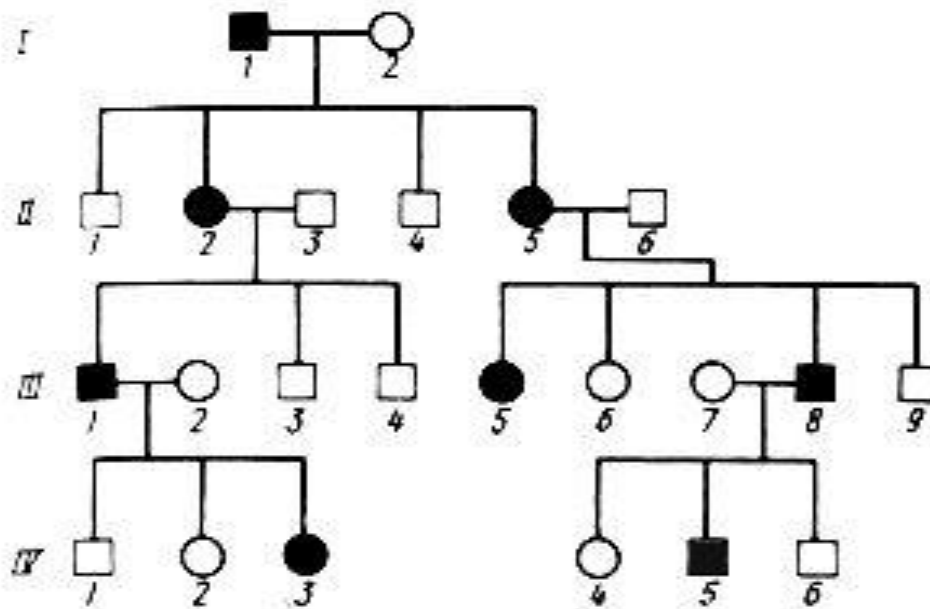


Рис. 10. Родословная при аутосомно-доминантном типе наследования брахидактилия.

аутосомно-доминантный тип наследования:

- заболевание наблюдается в каждом поколении, т.е. прослеживается в родословной по вертикали (кроме случаев новой мутации). Мутантный ген, связанный с аутосомой, проявляет свое действие как в гомозиготном, так и гетерозиготном состоянии.
- риск рождения больного ребенка, при одном больном родителе, составляет 50%.
- здоровые индивиды имеют здоровых потомков.
- у больного индивида болен один из родителей, кроме случаев новой мутации.
- оба пола поражаются с одинаковой частотой

Заболевания: синдром Марфана, синдром Реклингхаузена, ахондроплазия и др.

Родословные при аутосомно-рецессивном наследовании.

Рецессивные признаки проявляются фенотипически лишь у гомозигот по рецессивным аллелям. Эти признаки, как правило, обнаруживаются у потомков фенотипически нормальных родителей — носителей рецессивных аллелей. Вероятность появления рецессивного потомства в этом случае равна 25%. Если один из родителей имеет рецессивный признак, то вероятность проявления его в потомстве будет зависеть от генотипа другого родителя. У рецессивных родителей все потомство унаследует соответствующий рецессивный признак (рис.11.)

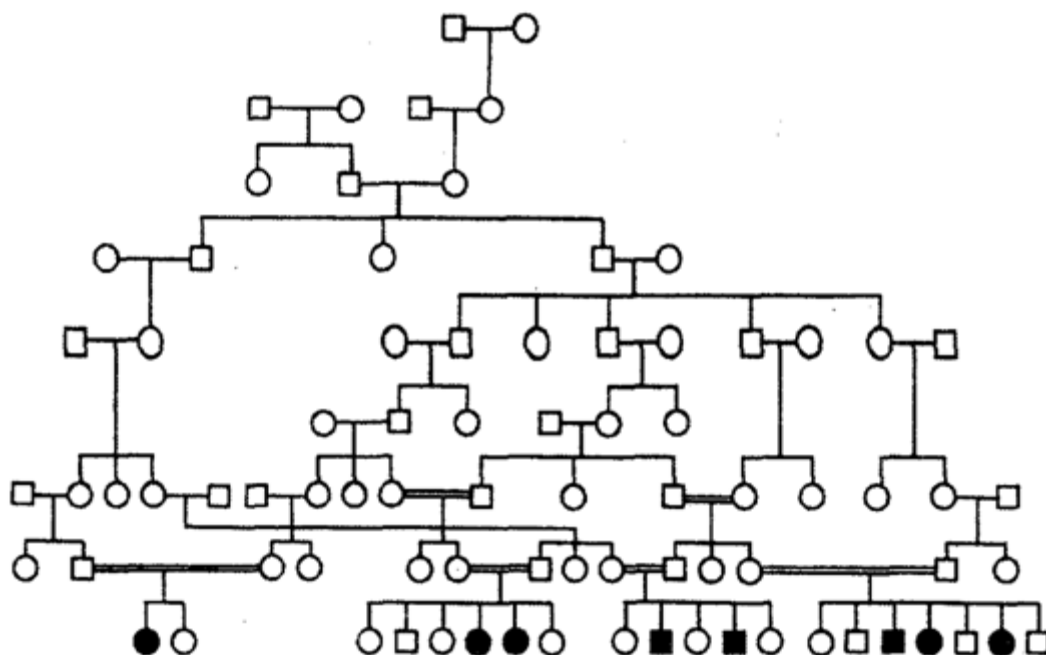


Рис.11. Родословная при аутосомно-рецессивном типе наследования (псевдогипертрофическая прогрессирующая миопатия)

аутосомно-рецессивный тип наследования:

- при браке двух гетерозиготных носителей одного и того же мутантного рецессивного гена в среднем 50% детей фенотипически могут

быть здоровы, но являются носителями мутантного рецессивного гена;

- 25% детей получают мутантный рецессивный ген от обоих родителей и будут поражены наследственным рецессивным заболеванием (гомозиготы);
- 25% будут здоровы фенотипически и генотипически;
- оба пола поражаются одинаково;
- в родословной при таком наследовании заболевание может прослеживаться по горизонтали, повторяться через одно или несколько поколений;
- у больного родителя рождаются здоровые дети;
- в случае кровно-родственных браков между родителями пробанда наблюдается увеличения числа больных в родословной.

Заболевания: АГС, галактоземия, муковисцидоз, ФКУ, талассемия.

Родословные при доминантном Х-сцепленном наследовании признака. Гены, расположенные в Х-хромосоме и не имеющие аллелей в Y-хромосоме, представлены в генотипах мужчин и женщин в разных дозах. Женщина получает две свои Х-хромосомы и соответствующие гены как от отца, так и от матери, а мужчина наследует свою единственную Х-хромосому только от матери. Развитие соответствующего признака у мужчин определяется единственным аллелем, присутствующим в его генотипе, а у женщин он является результатом взаимодействия двух аллельных генов. В связи с этим признаки, наследуемые по Х-сцепленному типу, встречаются в популяции с разной вероятностью у мужского и женского пола.

При доминантном Х-сцепленном наследовании признак чаще встречается у женщин в связи с большей возможностью получения ими соответствующего аллеля либо от отца, либо от матери. Мужчины могут наследовать этот признак только от матери. Женщины с доминантным признаком передают его в равной степени дочерям и сыновьям, а мужчины

— только дочерям. Сыновья никогда не наследуют от отцов доминантного X-сцепленного признака. Примером такого типа наследования служит описанная в 1925 г. родословная с *фолликулярным кератозом* —кожным заболеванием, сопровождающимся потерей ресниц, бровей, волос на голове.

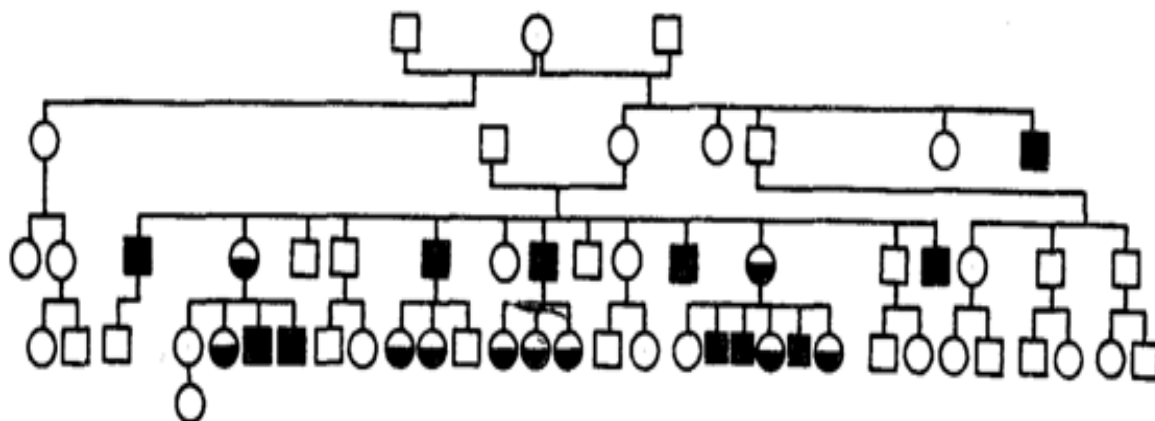


Рис.12. Родословная при X-сцепленном доминантном типе наследования (фолликулярный кератоз)

X-сцепленный доминантный тип:

- у больного пробанда обязательно болен один из родителей;
- у больного отца все дочери больны, а сыновья здоровы;
- у больной матери равно вероятно рождение больной дочери и больного сына;
- у здоровых родителей все дети будут здоровы;
- больных женщин в 2 раза больше, чем больных мужчин.

Заболевания: фосфатдиабет, синдром Ретта, Коффина-Лоури, Гольца и др.

Родословные при рецессивном X-сцепленном наследовании признаков. Характерной особенностью родословных при данном типе наследования является преимущественное проявление признака у гемизиготных мужчин, которые наследуют его от матерей с доминантным

фенотипом, являющихся носительницами рецессивного аллеля. Как правило, признак наследуется мужчинами через поколение от деда по материнской линии к внуку. У женщин он проявляется лишь в гомозиготном состоянии, вероятность чего возрастает при близкородственных браках.

Наиболее известным примером рецессивного X-сцепленного наследования является *гемофилия*. Наследование гемофилии типа А представлено в родословной потомков английской королевы Виктории

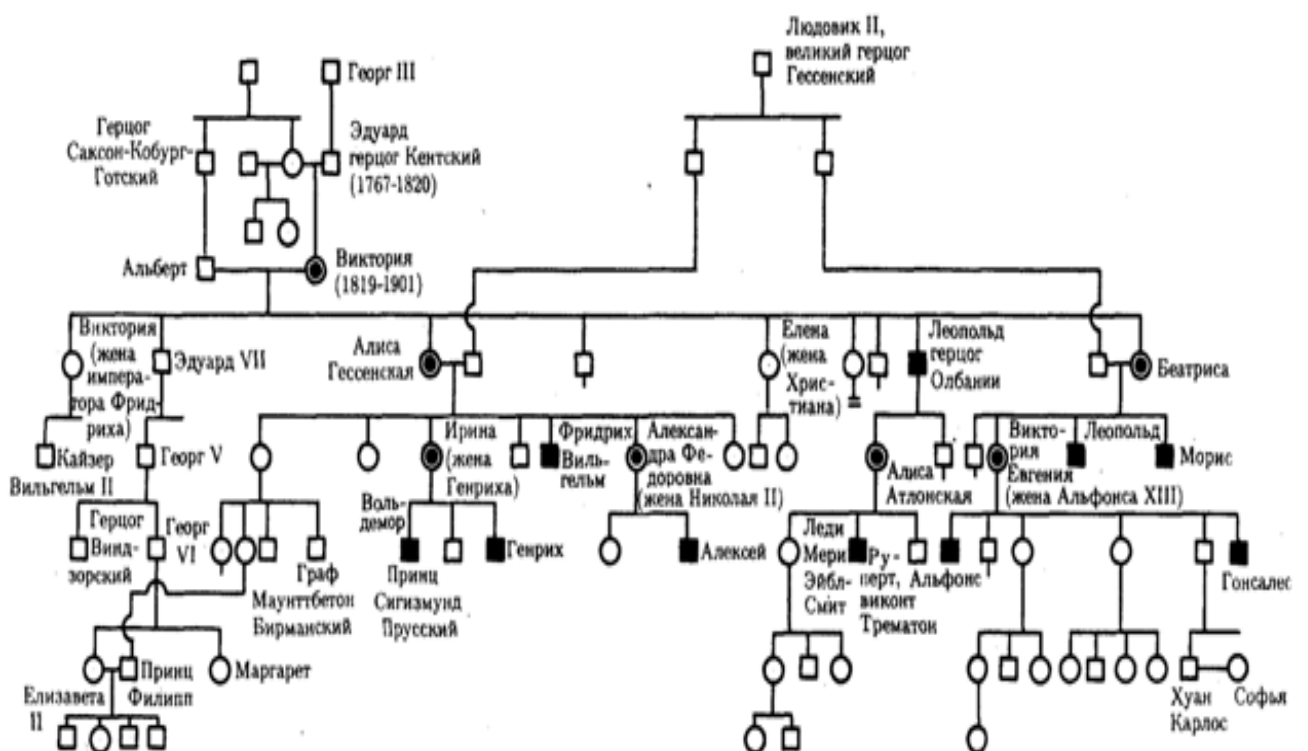


Рис .13. Родословная при X-сцепленном рецессивном типе. Наследование гемофилии типа А представлено в родословной потомков английской королевы Виктории

X-сцепленный рецессивный тип:

- заболевание наблюдается у мужчин-родственников пробанда по материнской линии;
- сыновья никогда не наследуют заболевание отца; все его дочери здоровы

и являются гетерозиготными носителями патологического гена;

- если женщина является гетерозиготным носителем патологического гена, то половина ее сыновей больны, а все дочери здоровы, причем половина дочерей - гетерозиготные носители патологического гена.

Заболевания: несахарный диабет, дефицит глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, мышечная дистрофия Дюшена, гемофилия А, В, ихтиоз, синдром Аарскога и др.

Родословные при Y-сцепленном наследовании. Наличие Y-хромосомы только у представителей мужского пола объясняет особенности Y-сцепленного, или голандрического, наследования признака, который обнаруживается лишь у мужчин и передается по мужской линии из поколения в поколение от отца к сыну.

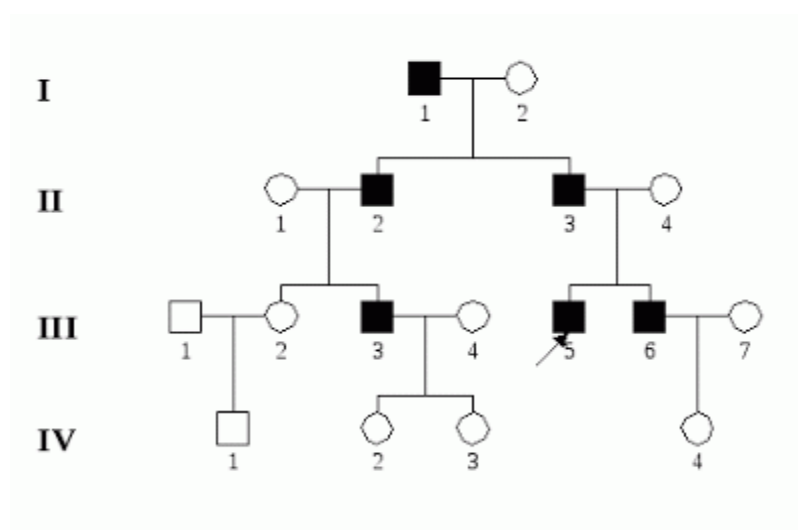


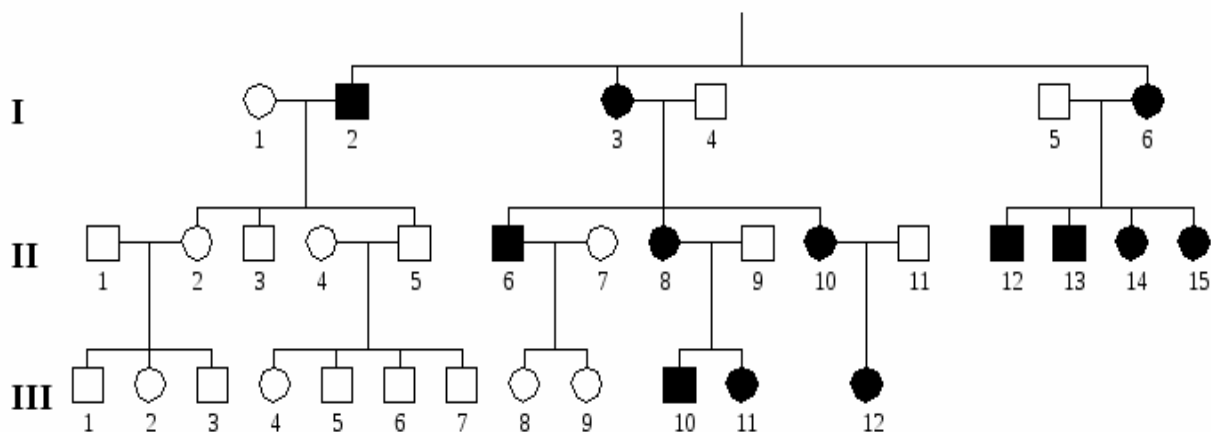
Рис. 14. Родословная при Y-сцепленном (голандрическом) типе наследования. Наследование гипертрихоза.

Одним из признаков, Y-сцепленное наследование которого у человека все еще обсуждается, является *гипертрихоз ушной раковины*, или наличие волос на внешнем крае ушной раковины. Предполагают, что в коротком плече Y-хромосомы кроме этого гена находятся гены, определяющие мужской пол. В 1955 г. у мыши описан определяемый Y-хромосомой трансплантационный антиген, названный НУ. Возможно, он является

одним из факторов половой дифференцировки мужских гонад, клетки которых имеют рецепторы, связывающие этот антиген. Связанный с рецептором антиген активизирует развитие гонады по мужскому типу. Этот антиген в процессе эволюции остался почти неизменным и встречается в организме многих видов животных, в том числе и человека. Таким образом, наследование способности к развитию гонад по мужскому типу определяется голландрическим геном, расположенным в Y-хромосоме. При наследовании:

- признак передается всем мальчикам.
- признак проявляется только у лиц мужского пола.
- патологические мутации, затрагивают формирование семенников.

Митохондриальное, или цитоплазматическое наследование – это наследование генов локализованных в ДНК митохондрий. Особенности этого типа наследования определяются тем, митохондрии в клетках человека всегда имеют материнское происхождение, поскольку попадают в зиготу только с цитоплазмой яйцеклетки (головка спермиев практически лишена цитоплазмы и цитоплазматических структур). Митохондриальная ДНК содержит несколько тысяч генов. Мутации этих генов приводят к развитию довольно тяжелых заболеваний нервной, мышечной системы и органов чувств, которые составляют особую группу патологии человека – митохондриальные болезни. Для митохондриального наследования характерны следующие черты: Болезнь передается только от матери; болеют и мальчики, и девочки; больные отцы не передают болезни ни дочерям, ни сыновьям. К митохондриальным болезням относятся: атрофия зрительного нерва Лебера, прогрессирующая офтальмоплегия, синдром Цельвегера, синдром Кернса-Сейра, митохондриальная миопатия.



15 рис. Наследование атрофии зрительного нерва

Таблица 1.

Аутосомное наследование

Типы наследования	Аутосомное (гены находятся в аутосомах)	
	доминантное	рецессивное
	Речь идет о классических родословных с большим числом потомков	
Особенности наследования	Признак одинаково проявляется и у мужчин, и у женщин	
	Признак (нормальный или патологический) встречается в каждом поколении (проявление признака идет по вертикали и по горизонтали)	Признак (нормальный или патологический) имеется не в каждом поколении, может быть проскок через одно поколение или несколько поколений (проявление признака идет по горизонтали)
	Больных в родословной много	Больных в родословной мало
	Больные дети рождаются от больных родителей (одного или двух)	Больные дети могут рождаться от больных родителей и от фенотипически здоровых родителей, чаще в родственных браках
	Генотип больных AA, Aa; генотип здоровых aa	Генотип больных aa; генотип фенотипически здоровых, но носителей непроявленного рецессивного гена, Aa; генотип здоровых AA

Вероятность проявления признака в браках		$AA - AA = 100\%$ $AA - Aa = 100\%$ $Aa - Aa = 75\%$ $AA - aa = 100\%$ $Aa - aa = 50\%$ $aa - aa = 0$	$AA - AA = 0$ $AA - Aa = 0$ $Aa - Aa = 25\%$ $AA - aa = 0$ $Aa - aa = 50\%$ $aa - aa = 100\%$
Примеры признаков	Нормальные*	Карий цвет глаз, веснушки, II и III группы крови, праворукость, темные волосы, Rh-фактор, облысение гнездное, кудрявые волосы, длинные ресницы, свободная мочка уха	Голубой цвет глаз, светлые волосы, рыжие волосы, прямые волосы, пятипалость, нормальное зрение, приросшая мочка уха, короткие ресницы, леворукость, I группа крови
	Патологические	Ахондроплазия, близорукость, брахидактилия, гипертрихоз универсальный, катаракта, полидактилия, синдром Марфана, нейрофиброматоз, отосклероз, подагра, синдактилия, туберозный склероз, хорея Гентингтона**	Алкаптонурия, альбинизм, анофтальмия, атрофия зрительного нерва, болезни Тея Сакса и Вильсона-Коновалова, галактоземия, глухота врожденная, муковисцидоз, нечувствительность к боли, пигментная ксеродерма, прогерия, фенилкетонурия, фруктозурия

Примечания:

*В эту группу вошли измененные признаки, не снижающие общую жизнедеятельность организма.

**Может быть позднее проявление болезни (хорея Гентингтона), неполная пенетрантность (подагра) и варьирующая экспрессивность (нейрофиброматоз — от отдельных «кофейных зерен» на коже до фиброматозных опухолей).

Наследование, сцепленное с полом

Типы наследования		Сцепленное с полом (гены находятся в негомологичных участках половых хромосом)		
		X-хромосома		Y-хромосома Голандрический тип наследования (доминантный и рецессивный)
		Доминантное	Рецессивное	
		Речь идет о классических родословных с большим числом потомков		
Особенности наследования		Больные встречаются в каждом поколении (проявление признака идет по вертикали и по горизонтали). Болеют чаще женщины	Болеют чаще мужчины, характерен «проскок» признака через поколение	Признак встречается только у мужчин
		Больных в родословной много	Больных в родословной мало	
		Больные дети рождаются от больных родителей (одного или двух)	Больной сын может родиться от здоровых родителей (мать гетерозиготна). Больная дочь рождается только от больного отца, при этом мать здоровая (гетерозиготна) или больная	Больной сын рождается от больного отца
		Генотип больных $X^A X^A$, $X^A X^a$, $X^A Y$; генотип здоровых $X^a X^a$, $X^a Y$	Генотип больных $X^a X^a$, $X^a Y$; генотип фенотипически здоровых, но носителей непроявленного рецессивного гена, $X^A X^a$; генотип здоровых $X^A X^A$, $X^A Y$	Генотип больных $X Y^A$ ($X Y^a$); генотип здоровых $X Y^a$ ($X Y^A$)**
Вероятность проявления признака в браках (примеры)		1. $X^a X^a - X^A Y$ все сыновья здоровы ($X^a Y$), дочери больны ($X^A X^a$). 2. $X^A X^a - X^a Y$ 50% сыновей ($X^a Y$) и 50% дочерей ($X^A X^a$) больны	1. $X^A X^a - X^A Y$ 50% сыновей больны ($X^a Y$), дочери здоровы ($X^A X^a$, $X^A X^A$). 2. $X^A X^a - X^a Y$ 50% дочерей больны ($X^a X^a$), 50%	$XX - X Y^A$ 100% сыновей больны ($X Y^A$) $XX - X Y^a$ 100% сыновей больны ($X Y^a$)
Примеры признаков	*Нормальные	Нормальное свертывание крови, нормальное цветоощущение, обычный цвет и толщина эмали	—	Дом.: нормальное строение эпидермиса кожи, отсутствие волос на ушной раковине и перепонки между пальцами
	Патологические	Цвет эмали зубов — коричневый, очаговая гипоплазия кожи, гипоплазия эмали, витамин D-устойчивый рахит, отсутствие резцов	Гемофилия, дальтонизм, синдром Леша-Нихана (Леша-Найяна), мышечная дистрофия	Рец.: ихтиоз, гипертрихоз (локальный) ушной раковины, перепонки между пальцами

Примечания:

*В половых хромосомах X и Y локализуются не только гены, определяющие нормальное развитие женских и мужских первичных и вторичных половых признаков и формирование соответствующего фенотипа, но и гены, детерминирующие развитие других признаков организма.

**В данном случае буквенные обозначения носят условный характер.

Статистическая обработка результатов. Полученные цифровые данные статистически обрабатывали на персональном компьютере с использованием программ для статистического анализа. Вычисляли среднее арифметическое (M), средне квадратическое отклонение (σ), процентную ошибку(m%), критерий Стьюдента(t), вероятность ошибки (P).

Заключения по II главе.

В исследованиях мы использовали цитогенетический и клинко-генеологические методы. Объектом цитогенетических исследований были лимфоциты периферической крови. Для проведения клинко-генеологического анализа мы составляли родословные.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Определение уровня специфических хромосомных и общих дискриминационных aberrаций у больных ретинобластомой и у сибсов

Нами были обследованы 34 больных, 78 сибсов пробанда, 30 здоровых людей. Больные были в возрасте от 0 до 5 лет. Всем больным проводились клинический осмотр, офтальмоскопия, диафаноскопия, биомикроскопия. Из инструментальных методов обследования - УЗИ, УЗДГ глаз орбит, КТ орбит, МРТ орбит.

Из лабораторных обследований - общий анализ крови, биохимия, коагулограмма крови.

При тщательном обследовании первичных больных (их было 34 человек) оказалось, что у 4-х больных с подозрением на ретинобластому были выявлены: 1 псевдоретинобластома, 1-ретинит Коатса, 2-врожденная катаракта.

Они были взяты под динамический контроль, им проводились офтальмоскопия с раширенным зрачком и УЗИ глаз - 1 раз в 3 месяца в условиях консультативной поликлиники РОНЦ МЗРУз.

В семьях 30 больных, у которых был подтвержден диагноз ретинобластома и пациенту с псевдоретинобластомой проведено медико-генетическое консультирование среди родственников первой степени родства. Они были направлены для цитогенетического исследования на наличие хромосомных aberrаций и установления наследуемости РБ в семье. Выполнено культивирование периферической крови 30 больным, 1 больному с псевдоретинобластомой, 30 здоровым людям и 78 сибсам (кровные родственники, родители, бабушки, дедушки, братья, сестры). Культивирование крови, обработку и микроскопирование всех

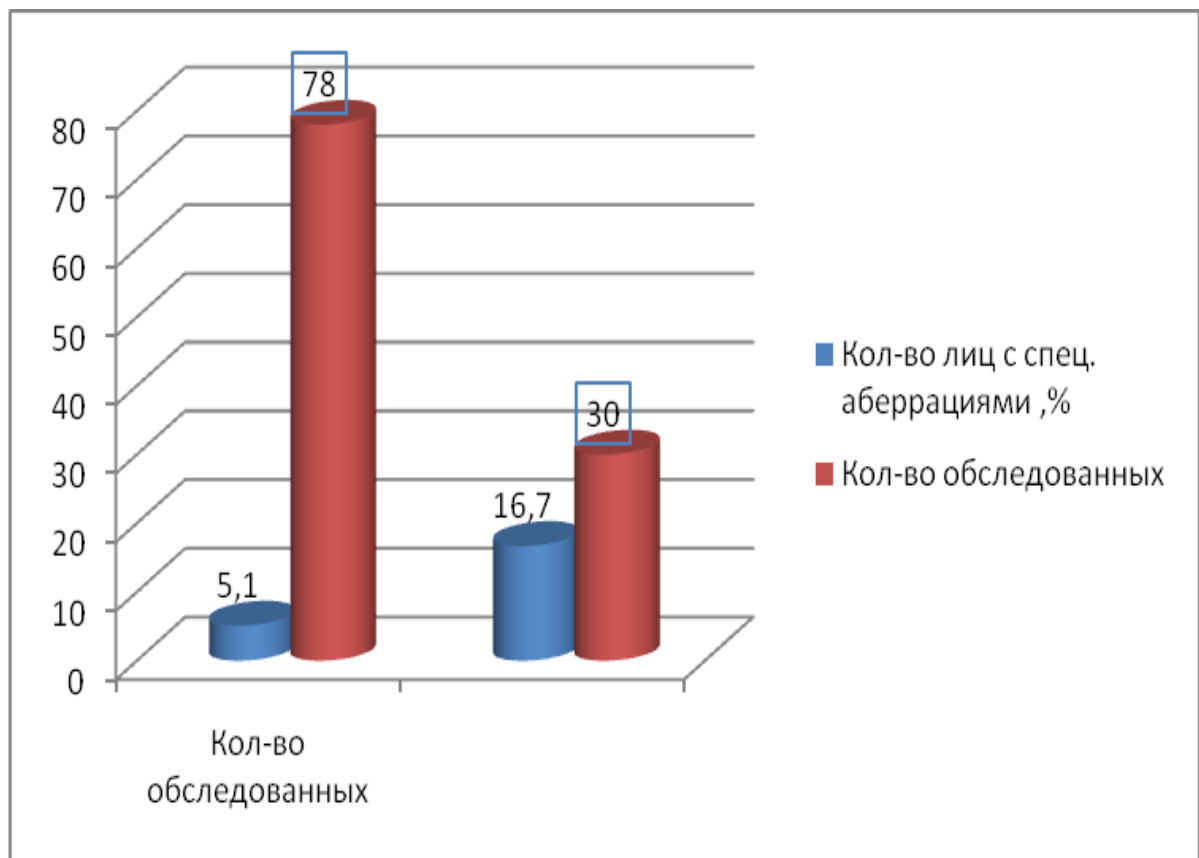
образцов проведены по стандартным методам цитогенетических исследований.

Наши исследования показали что частота специфических aberrаций хромосом (13q-) у больных ретинобластомой составила 16.7% (5/30), у сибсов 5,1% (4/78).

Таблица 3

Частота специфических aberrаций хромосом (13q-) у больных с ретинобластомой и пробандов

Обследованные	Кол-во обследованных лиц	Количество лиц с специфическими aberrациями ,% (n)
Пробанды	30	16,7% (5)
Сибсы	78	5,1% (4)



Кроме того, полученные данные позволили установить, что при ретинобластоме дискриминационный уровень хромосомных аберраций составил 11,2%. В группе в которую входили здоровые люди дискриминационный уровень хромосомных аберраций составил 1,2%. Эти данные показывают что при ретинобластоме дискриминационный уровень хромосомных аберраций у пробандов в несколько раз больше чем у здоровых людей. В группе в которой были сибсы пробандов дискриминационный уровень хромосомных аберраций составил 4.6%. Таким образом, у родственников больных ретинобластомой наблюдалась тенденция повышения уровня хромосомных аберраций. Этот факт имеет прогностическое значение.

В последние годы на смену безальтернативной энуклеации глаз при ретинобластоме пришли новые органосохраняющие методы лечения, которые тем эффективнее, чем раньше выявляется опухоль. При

запущенных случаях по-прежнему приходится прибегать к энуклеации. Прогноз для жизни у таких детей резко ухудшается.

Следовательно, поиск методов ранней диагностики и выделения групп высокого риска особенно важно, а цитогенетическое исследование лимфоцитов периферической крови больных РБ дает возможность выявлять самые ранние признаки развития опухолевого процесса в виде специфических и неспецифических хромосомных нарушений. Анализ хромосомных нарушений в лимфоцитах позволяет на этапе доклинического развития опухоли определять риск ее развития, например у здоровых сибсов больных. По совокупности специфических и неспецифических хромосомных нарушений цитогенетический метод даёт возможность определять прогноз и исход данного заболевания.

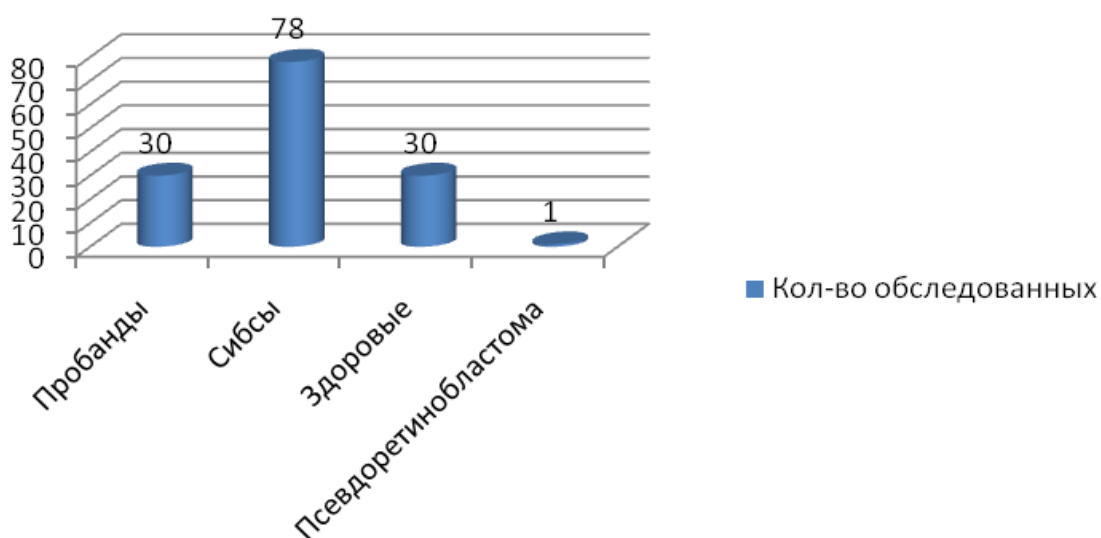
Таблица 4.

Цитогенетический анализ культивируемых лимфоцитов периферической крови больных ретинобластомой, псевдоретинобластомой, сибсов и здоровых людей

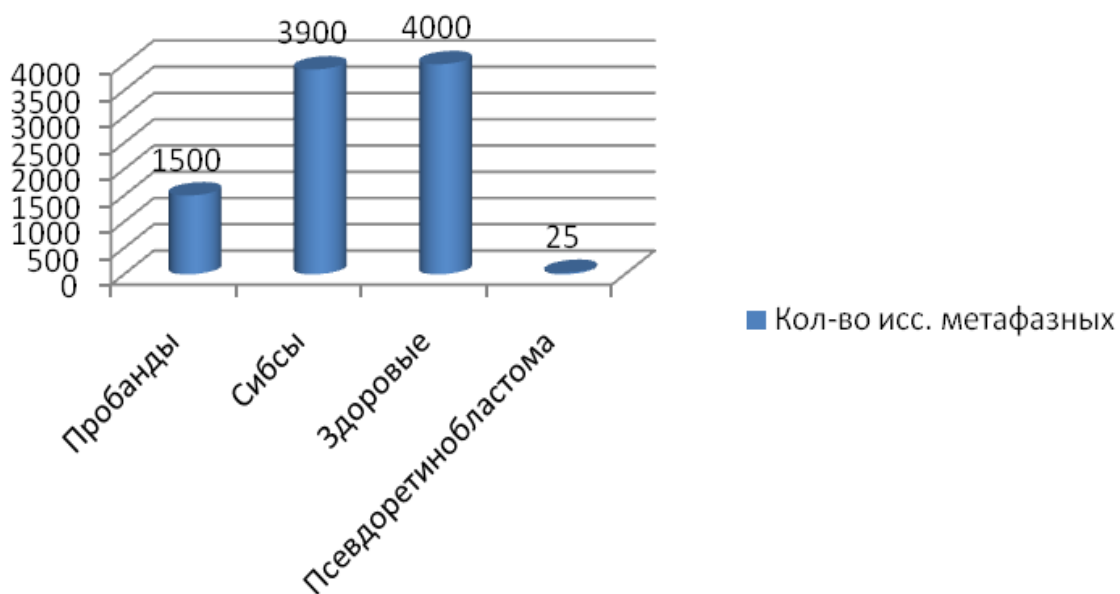
Обследованные	Количество обследованных лиц	Количество исследованных метафазных пластинок	Количество aberrаций, % (n)
Пробанды	30	1500	11,2±0.81(168)*
Сибсы	78	3900	4.6±0.33(178)*
Здоровые	30	4000	1.2±0.03(48)
Псевдоретинобластома	1	25	0

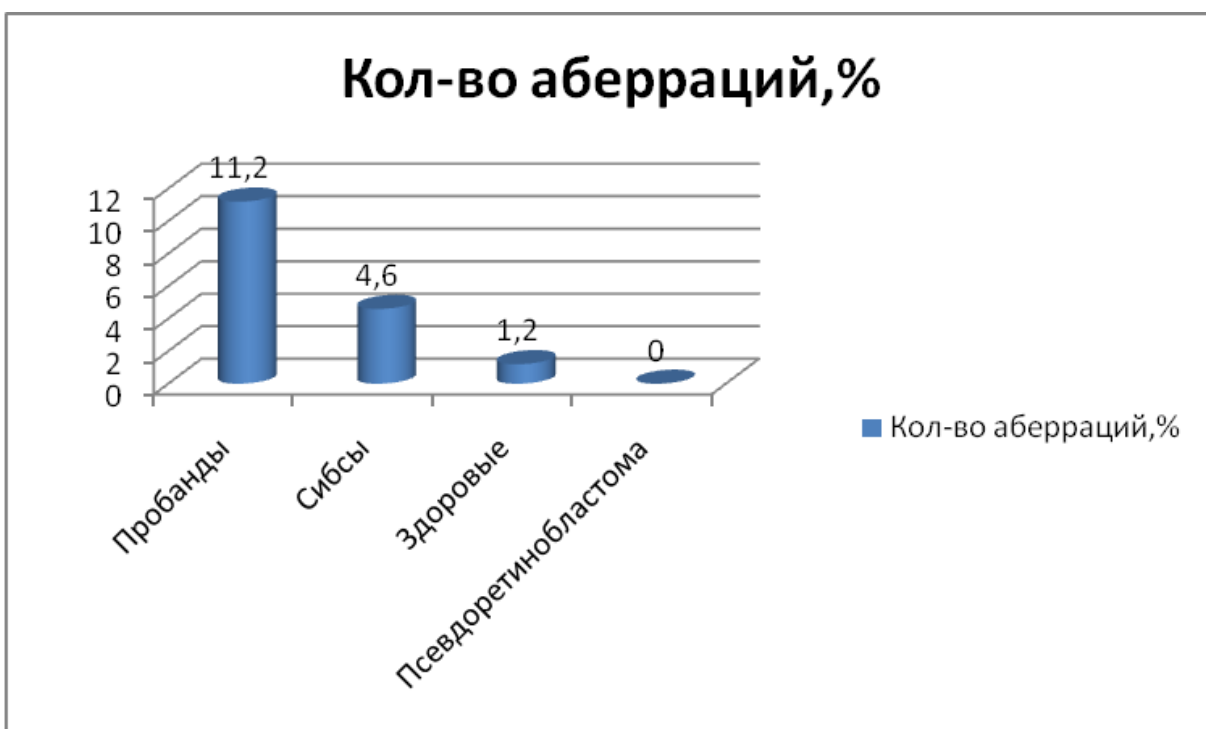
Примечание * P<0.05

Кол-во обследованных



Кол-во исс. метафазных





Генеалогический анализ при ретинобластоме

С целью установления частоты встречаемости семейных и спорадических форм ретинобластомы среди обратившихся в онкоофтальмологическое отделение РОНЦ МЗ РУз, нами были обследованы 30 больных с ретинобластомой.

Анкеты заполнены для всех больных (пробандов). Для анализа мы составили 30 родословных, в которых содержится е полная информация о 3-4 поколениях родственников.

Из 30 родословных достоверно известно, что в 24 семьях родители пробандов (больных РБ) являются родственниками , в таких семьях наиболее часто случаются спонтанные аборты или дети погибают до года, что свидетельствует о высоком уровне пороков развития несовместимых с жизнью, также возможно присутствие сильной хромосомной патологии. Эти же семьи можно включить в группу семей с синдромом “раковая семья”. В нашем исследовании таких семей (“раковая семья”) было 13/30.

На рис.16. в семье РБ имеет наследственную форму с очень высокой пенетрантностью, из 4 живых членов семьи в III поколении у 3 наблюдается ретинобластома сибсы 17, 18, 19. Пенетрантность РБ составляет 75% в данной семье. Мутация, возникла у отца, которому возможно она была передана матерью, так как у отца во втором браке больных детей не было. У детей (23, 24, 25) здоровой сестры пробанда, состоящей в родственном браке со своим мужем, очень высока вероятность развития ретинобластомы, поэтому они должны быть отнесены к группе “высокого риска”.

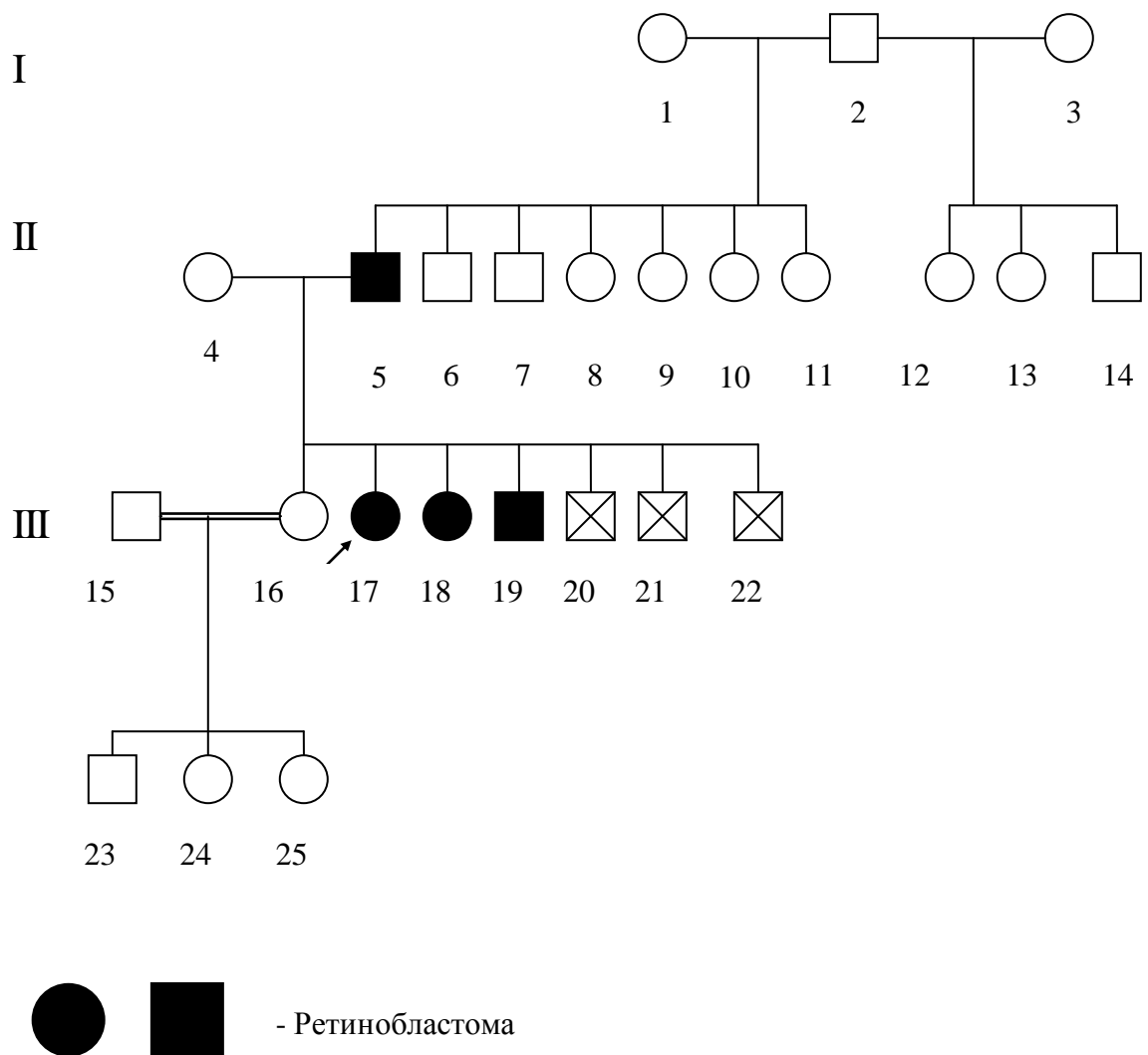
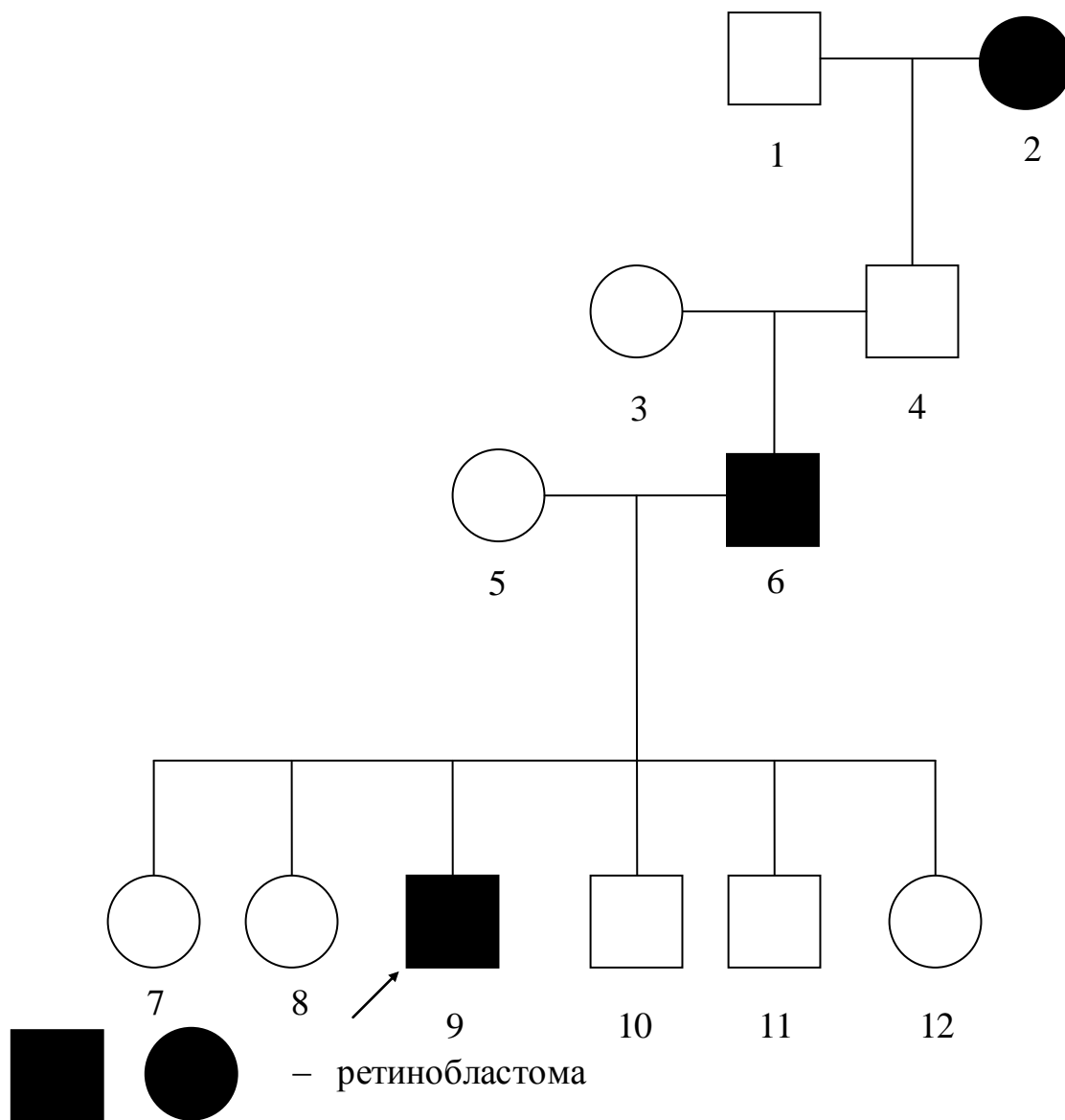


Рис.16.Наследственная форма с пенетрантностью 75%.

Наличие онкопатологии данной локализации у родственников 1 степени родства (рис 17.) свидетельствует о наследственной предрасположенности. В данной семье в трех поколениях проявляется ретинобластома, а отсутствие ее у представителей второго поколения, есть результат пенетрантности гена Rb1. Следовательно, дети в IV поколении могут нести этот ген и риск развития у них или их потомков ретинобластомы очень высок.. Поиск и выявление изменений в гене имеет

определяющее значение для обнаружения групп риска среди членов “раковых семей”.



17. рис. В данной семье в трех поколениях проявляется ретинобластома, а отсутствие ее у представителей второго поколения, есть результат пенетрантности гена Rb1

Таким образом, клинико-генеалогический анализ позволил выявить наследственные и спорадические (18) формы ретинобластомы.

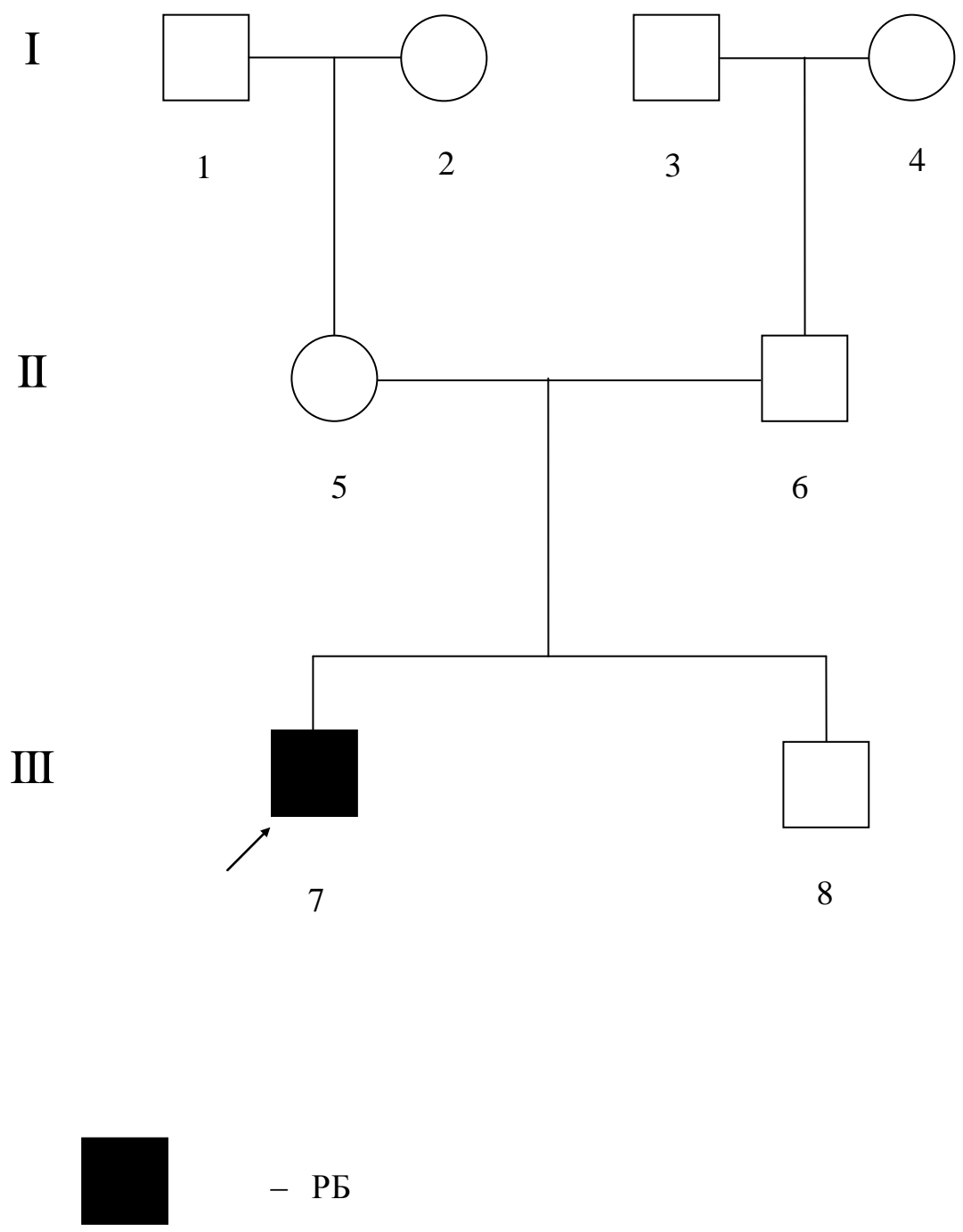
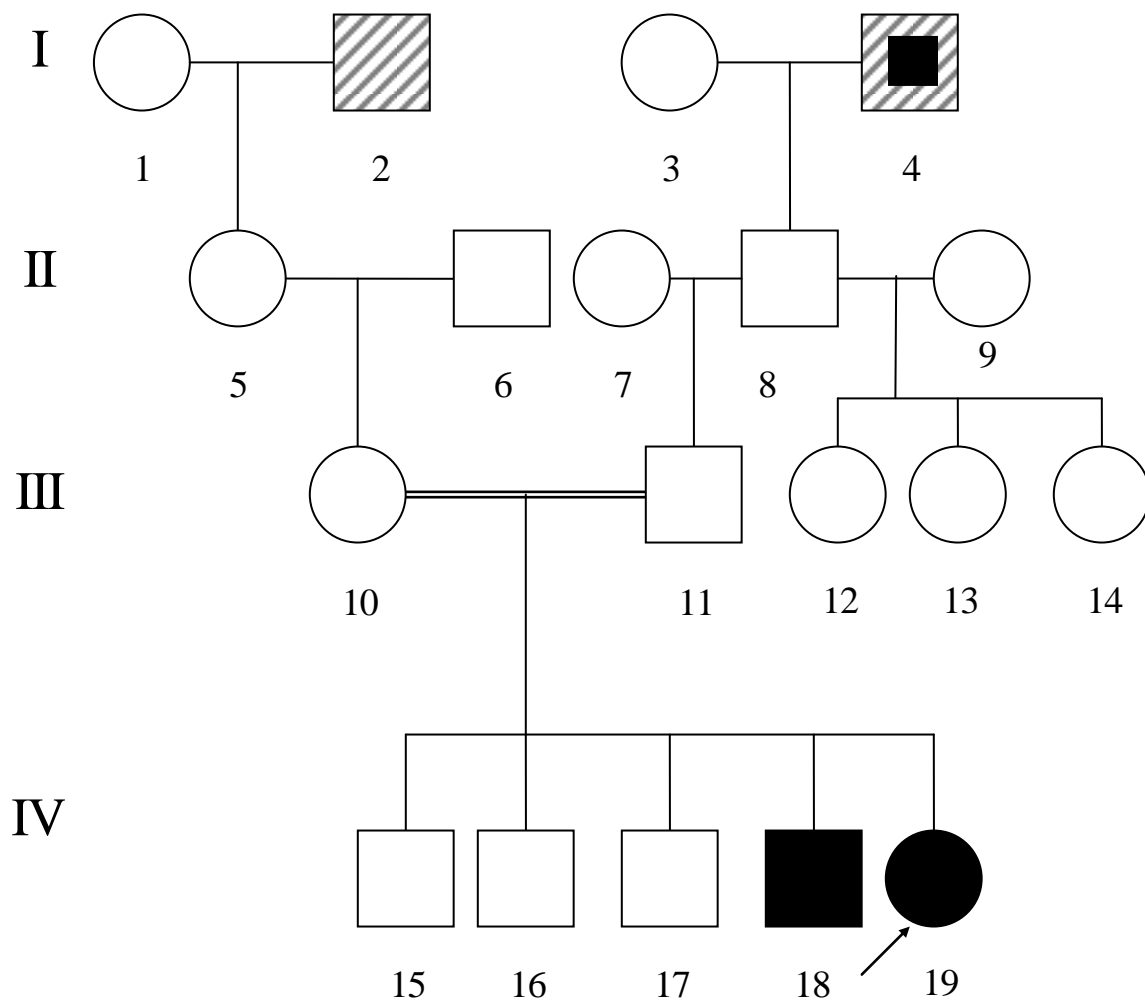





Рис.18. Родословная больного у пробанда спорадическая форма РБ, в данной семье онкопатология не встречалась.

На рисунке 19 представлена родословная семьи, в которой родители пробанда так же состоят в кровном родстве. В этой семье у сибсов I-го поколения наблюдался рак желудка, пробанд и ее брат имеют двустороннюю ретинобластому, у брата ранее была произведена операция с энуклеацией левого глаза.



-  – рак желудка и слепота
-  – ретинобластома
-  – рак желудка



– ретинобластома

Рис.19. Родословная А. В первом поколении со стороны матери пробанда у прадеда был рак желудка, а со стороны отца – у прадеда рак желудка и слепота, у брата – левосторонняя ретинобластома. Синдром «раковая семья». Родственный брак.

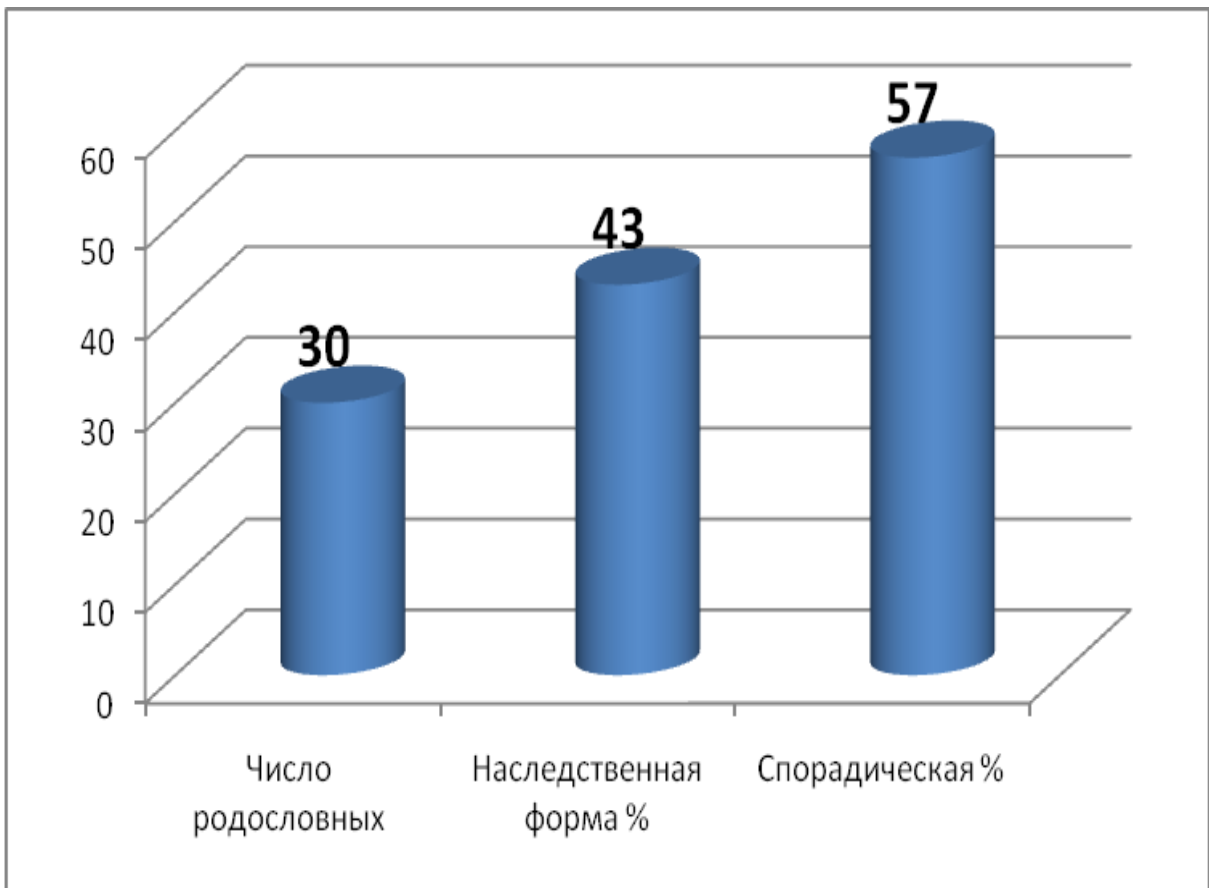
Так из 30 обследованных семей в 4 имеются родственники только с РБ, в 5 у родственников старшего поколения (бабушки, дедушки, тети, дяди), а также у двоюродных братьев и сестер, была слепота. В 3-х семьях пробандов РБ сочеталась с онкопатологией желудочно-кишечного тракта, а в 1-й семье еще и с раком шейки матки, в 2-х семьях – раком головного мозга. Следовательно, форма РБ в 13/30 (43%) семьях обнаружена наследственная

Спорадическая ретинобластома присутствовала в 17/30 (57 %) семьях. Возможно эти данные, как мы упоминали выше, не являются точными, в связи с неполной информацией при проведении анкетирования. Поэтому мы провели цитогенетическую диагностику всех пробандов и их близких родственников, с целью выявления изменений в хромосомах.

Поиск и выявление изменений в геноме может иметь определяющее значение для отбора групп риска среди здоровых sibсов в возникновении у них онкопатологий.

Таблица 5.
Соотношение наследственных и спорадических форм

Обследованные	Число родословных	Наследственная форма % (n)	Спорадическая форма % (n)
Больные с ретинобластомой	30	43 (13)	57 (17)



Заключения по III главе.

Проведенные исследования показали, что у больных ретинобластомой выявлен высокий (11.2% по сравнению с 1.2% у здоровых) уровень хромосомных aberrаций. У здоровых родственников больных ретинобластомой наблюдалось достоверное повышение уровня хромосомных aberrаций (4.6%; $P < 0,05$), что способствует своевременному выявлению первичных признаков рака и поведению эффективных мер лечения и профилактики. Также, наши исследования показали что частота специфических aberrаций хромосом (13q-) у больных ретинобластомой составила 16,7% (6/30), у сибсов 5,1% (4/78) соответственно.

Заключение.

Ретинобластома это злокачественная опухоль сетчатки глаза. Сейчас известно, что развитие ретинобластомы обусловлено мутацией онкосупрессорного гена -Rb1, локализованного в проксимальном отделе длинного плеча хромосомы 13 - (13q14.2)[33].

Целью нашего исследования было определить общий дискриминационный и специфический уровень хромосомных aberrаций у пробандов и сибсов. Для изучения aberrаций мы проводили цитогенетический анализ. Для цитогенетического метода мы использовали периферическую кровь. Лимфоциты периферической крови являются оптимальным материалом для цитогенетического метода исследования. Также, мы проводили генеологический анализ чтобы, определить соотношение наследственных и спорадических форм ретинобластомы. Проведенные нами исследования показали что при ретинобластоме общая дискриминационная частота хромосомных aberrаций в группе в которой были пробанды 11,2 %. Общая дискриминационная частота в группе где были сибсы составила 4,6 %, в группе со здоровыми людьми этот показатель 1,2%. Эти данные показывают что при ретинобластоме дискриминационный уровень хромосомных aberrаций у пробандов в несколько раз больше чем у здоровых людей. Таким образом, у родственников больных ретинобластомой наблюдалась тенденция повышения уровня хромосомных aberrаций. Этот факт имеет прогностическое значение.

Для генеологического анализа мы составили 30 родословных, в которых содержится е полная информация о 3-4 поколениях родственников. Проведенный генеологический анализ показал что, наследственная форма ретинобластомы обнаружена в 13/30 (43%) семьях. Спорадическая ретинобластома присутствовала в 17/30 (57 %) семьях.

ВЫВОДЫ

1. Наши исследования показали что частота специфических aberrаций хромосом (13q-) у больных с ретинобластомой составила 20% (6/30), у сибсов 5,1% (4/78). при ретинобластоме дискриминационный уровень хромосомных aberrаций составил 11,2%. В группе в которую входиле здоровые люди дискриминационный уровень хромосомных

аббераций составил 1,2%. Эти данные показывают что при ретинобластоме дискриминационный уровень хромосомных аббераций у пробандов в несколько раз больше чем у здоровых людей. В группе в которой были сибсы пробандов дискриминационный уровень хромосомных аббераций составил 4.6%.

2. Проведенный генеологический анализ показал что наследственная форма РБ обнаружена в 13/30 (43%) семьях спорадическая ретинобластома присутствовала в 17/30 (57 %) семьях. Этот анализ показал что в семьях в которых выявляется ретинобластома, часто встречаются и другие онкопатологии.

3. У сибсов пробандов дискриминационный уровень хромосомных аббераций составил 4,6 %. У здоровых людей этот показатель 1.2%. Таким образом у родственников больных ретинобластомой наблюдалась тенденция повышения уровня хромосомных аббераций. Этот факт имеет прогностическое значение.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Своевременная диагностика ретинобластомы требует осмотра детей педиатрами сразу после рождения.
2. При выявлении хромосомной патологии у пациентов с ретинобластомой необходимо обследование родителей и близких родственников с целью исключения сбалансированных хромосомных перестроек.
3. Хромосомный анализ особенно рекомендован больным с дополнительными аномалиями развития и задержкой умственного и физического развития.
4. В семьях высокого риска повторного возникновения ретинобластомы, возможно проведение пренатальной диагностики.
5. При кариотипическом анализе надо исключить возможную хромосомную патологию, представленную делециями хромосомы 13(q-).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аветисов С.Э., Харлап С.И., Киселева Т.Н. Основы пространственной ультразвуковой визуализации глаза и орбиты // Современные методы лучевой диагностики: Материалы научно-практической конференции.— М., 2004.— С. 14—25.
2. Бровкина А. Ф., Современная концепция лечения ретинобластомы - 2005 Вестник офтальмологии. 2005.-Т. 121,№ 2. - С. 48-51.
3. Дурнов Л. А. Руководство по детской онкологии.— М.: Миклош, 2003.- 504 с.
4. Зотова А. С. Первичные новообразования орбиты: структура и алгоритмы клиничко-лучевой диагностики. Дис. на соиск. учен. степ. канд. мед. наук. код спец. 14.00.08. 14.00.19 – 2008. Челябинск, - 183с.
5. Исламов З.С. Маскарадный синдром при ретинобластоме//2 конгресс онкологов Узбекистана:сборник научных трудов.Ташкент –октябрь 2011-С 110-111
6. Исламов З.С. Онкоофтальмология в Узбекистане //Актуальные проблемы офтальмологии: Матер. науч-прак.конф,посв.70-лет.засл.деят.наук.РФ и РБ,акад.М.Т.Азнабаева-Уфа, май 2009.-С.57-60.
7. Исламов З.С. Связь операций проведенных в комплексном лечении ретинобластомы с возрастом //2 конгресс онкологов Узбекистана:сборник научных трудов.Ташкент –октябрь 2011-С 112-113
8. Исламов З.С., Гильдиева М.С. Цитогенетическое исследование при ретинобластоме и медико-генетическое консултированием// Опухоли

- и опухолеподобные заболевания органа зрения:Международный симпозиум. Москва, ноябрь 2007.-С 44-46.
9. Исламов З.С., Гильдиева М.С. Генеологический анализ в скрининговой диагностике при ретинобластоме//Современные технологии в дифференциальной диагностике и лечении внутриглазных опухолей:Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции.Москва,октябрь 2007.С 76-79.
 - 10.Исламов З.С., Каюмова Р.Р., Козловская Г.М..Информативность доплерографии и реконструктивной эхографии в диагностике опухолей глаза и орбиты// Опухоли и опухолеподобные заболевания органа зрения:Международный симпозиум. Москва, ноябрь 2007.-С 129-132.
 - 11.Исламов З.С., Мухамедов Р.С..ПЦР диагностика ретинобластомы в узбекской популяции// Новые технологии в офтальмологии 2008. Международная научно практическая конференция.Ташкент март-2008. С 33
 - 12.Исламов З.С., Рахматуллаева Д.Т. Сравнительная характеристика пролиферации и апоптоза при злокачественных опухолях органа зрения// Опухоли и опухолеподобные заболевания органа зрения:Международный симпозиум. Москва, ноябрь 2007.-С 39-43.
 - 13.Исламов З.С.. Комплексная ультразвуковая диагностика в онкоофтальмологии// Актуальные проблемы офтальмологии: Матер. науч-прак.конф,посв.70-лет.засл.деят.наук.РФ и РБ,акад.М.Т.Азнабаева-Уфа,май 2009.-С.797-800.
 - 14.Исламов З.С., Гильдиева М.С.. Цитогенетические особенности при ретинобластоме// Актуальные проблемы офтальмологии: Матер. науч-прак.конф,посв.70-лет.засл.деят.наук.РФ и РБ,акад.М.Т.Азнабаева-Уфа,май 2009.-С. 800-804.
 - 15.Исламов З.С..Заболеваемость ретинобластомой в Узбекистане в период 1985-2000 годы// Опухоли и опухолеподобные заболевания

- органа зрения: Международный симпозиум. Москва, ноябрь 2007. -С. 38-39.
16. Исламов З.С..Симптомокомплекс при ретинобластоме//Новые технологии в офтальмологии -2010.Научно практическая конференция.Ташкент-2010. С 31-32
17. Исламов З.С..Этапность Онкоофтальмологической помощи в Узбекистане//Опухоли и опухолеподобные заболевания органа зрения:Международный симпозиум. Москва, ноябрь 2007. -С.35-38.
18. Ишбердина Л.Ш., Байрамгулов Р.Р., Жуманиязов А.Ж., Валямов Р.Л.. Наш опыт лечения интраокулярной ретинобластомы у детей// Актуальные проблемы офтальмологии: Матер. науч-прак.конф,посв.70-лет.засл. деят.наук.РФ и РБ,акад.М.Т.Азнабаева-Уфа,май 2009.-С. 810-815.
19. Ишбердина Л.Ш., Валямов Р.Л., Жуманиязов А.Ж., Байрамгулов Р.Р. Применение фотокоагуляции аргоновым лазером после химиотерапии у детей с интраокулярной ретинобластомой. VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Федоровские чтения — 2009»:Сб. тез. / Под общей ред. Х.П. Тахчиди.—М.: Изд-во «Офтальмология».—2009.—572 с.
-
20. Кански Д.Д. Клиническая офтальмология: систематизированный подход / Д.Д. Кански.*- М.: Логосфера, 2006. 733с.
21. Катькова, Е.А. Комплексное ультразвуковое исследование в диагностическом обеспечении офтальмоонкологической клиники: дис. . д-ра мед. наук. Челябинск, 2004. - 340 с.
22. Лихванцева В. Т., Кошелева И. И., Харлап С. И. Роль и место современных ультразвуковых методов диагностики в офтальмоонкологии // Современные методы лучевой диагностики: Материалы научно-практической конференции.— М., 2004.— С. 89—93.

23. Мамедова Т.М., Таирли У.А., Насруллаева М.А., Мирзоева Ф.Х. Некоторые клиничко-лабараторгыые аспекты ретинобластомы у детей // Современные технологии в дифференциальной диагностике и лечении внутриглазных опухолей: Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции. Москва, октябрь 2007. С 98-103.
24. Насникова И. Ю., Харлап С. П., Круглова Е. В. Пространственная ультразвуковая диагностика заболеваний глаза и орбиты: Клиническое руководство.— М.: Изд-во РАМН, 2004.— 176 с.
25. Насникова И.Ю. Пространственная ультразвуковая диагностика заболеваний глаза и орбиты: клиническое руководство. М.: РАМН, 2004. - 176 с.
26. Баркан Р.С. Кудрявцева Н.В. Решетникова Г.Ф. Зависимость процесса, ведущего к фосфорилированию белка ретинобластомы (pRb), от состояния актинового цитоскелета. Цитология 1998.-N 2.-С.172-177.
27. Павленко Е.С. Клиничко-инструментальная диагностика злокачественных опухолей орбиты. 2009 г. Челябинск. Диссертация канд. мед.наук, 14.00.08. К-во стр.133.
28. Павленко Е.С. Клиничко-инструментальная диагностика злокачественных опухолей орбиты. 2009 г. Челябинск. Диссертация канд. мед.наук, 14.00.08. К-во стр.133.
29. Поляков В. Г., Менткевич Г. Л., Ушакова Т. Л. и др. Новые технологии лечения детей с местно распространенной локализованной метастатической и рецидивной ретинобластомой // Материалы VIII Рос. онкол. конгресса.— М., 2004.-С. 168-169.
30. Попов И. А., Саакян С. В. Структура опухолей органа зрения у детей на Урале и Западной Сибири // Актуал. вопр. детской офтальмол. и ретинопатия недоношенных.— Екатеринбург, 2004.— С. 85-89.

31. Результаты лечения ретинобластомы (РБ) высокого риска (ВР). VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Федоровские чтения.— 2009»:Сб. тез. / Под общей ред. Х.П. Тахчиди.—М.: Изд-во «Офтальмология».—2009.— 572 с.
-
32. Саакян С. В. Ретинобластома – 2005. Москва : Медицина, 2005. - 199 с.
33. Саакян С. В. Эхографический мониторинг регрессии ретинобластомы на фоне проведения неадьювантной химиотерапии // Лучевая диагностика и терапия.— В юбил. сборнике к 80- летию кафедры ВМА.-СПб., 2004.-С. 246.
34. Саакян С.В. Современные подходы к лечению ретинобластомы. Российский офтальмологический журнал. 2008, 1. 33-38 стр.
35. Саакян С.В.,Иванова О.А. Анализ заболеваемости и эффективности лечения ретинобластомы// Современные технологии в дифференциальной диагностике и лечении внутриглазных опухолей:Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции.Москва,октябрь 2007.С 202-207.
36. Тацков Р.А.Саакян С.В. Возможности детской педиатрической камеры(Ret Cam)в ранней в ранней диагностике и мониторинге ретинобластомы// Современные технологии в дифференциальной диагностике и лечении внутриглазных опухолей:Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции.Москва,октябрь 2007.С 127-131.
37. Усманов Р.Х.,Исламов З.С.. Карбоплатин в комплексном лечении ретинобластомы //2 конгресс онкологов Узбекистана:сборник научных трудов.Ташкент –октябрь 2011-С 116-117
38. Ушакова Т.Л., Горовцова О.В., Долгополов И.С., Глеков И.В., Павловская¹ А.И., Поляков В.Г. Совершенствование методов лечения ретинобластомы у детей. VII Всероссийская научно-

практическая конференция с международным участием «Федоровские чтения — 2009»:Сб. тез. / Под общей ред. Х.П. Тахчиди.—М.: Изд-во «Офтальмология».—2009.—572 с.

-
39. Ушакова Т.Л., Максимова О.В., Глеков И.В., Павловская А.И., Поляков В.Г. Результаты лечения ретинобластомы стандартного и среднего риска// Современные технологии в дифференциальной диагностике и лечении внутриглазных опухолей:Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции.Москва, октябрь 2007.С 263-266.
40. Ушакова Т.Л., Максимова О.В., Долгополов И.С., Глеков И.В., Павловская А.И., Поляков В.Г. Результаты лечения ретинобластомы высокого риска// Современные технологии в дифференциальной диагностике и лечении внутриглазных опухолей:Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции.Москва, октябрь 2007.С 270-273.
41. Филатова И.А. Диагностика и тактика хирургического лечения при постлучевой атрофии тканей орбиты после лечения ретинобластомы// Актуальные проблемы офтальмологии: Матер. науч.-прак. конф, посв. 70-лет. засл. деят. наук. РФ и РБ, акад. М.Т. Азнабаева-Уфа, май 2009.-С. 828-831.
42. Abramson D.H, Marr B P, Dunke I.J, et al. Intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma in eyes with vitreous and/or subretinal seeding: 2-year results . Br J Ophthalmol. 2011 Nov 3; . Epub 2011 Nov 3.
43. Abramson D.H. Super selective ophthalmic artery delivery of chemotherapy for intraocular retinoblastoma: ‘chemosurgery’The first Stallard lecture. Br. J. Ophthalmol. 2010;94:396-399.
44. Batra R, Rowe F, Rowlands A, Noonan C. Unilateral leucocoria in clinically normal eyes. Br.J.Ophthalmol. 2009;93:556-557.

45. Bekibele C.O, Ayede A.I, Asaolu O.O, Brown B.J. Retinoblastoma: the challenges of management in Ibadan, Nigeria. *J Pediatr. Hematol. Oncol.* 2009 Aug;31 (8):552-5.
46. BenEzra D. IVF and retinoblastoma. *Br. J. Ophthalmol.* 2005;89:393.
47. Bianciotto C, Shields CL, Iturralde JC, et al. Fluorescein Angiographic Findings after Intra-arterial Chemotherapy for Retinoblastoma. *Ophthalmology.* 2011 Nov .
48. *Br. J. Ophthalmol.* 2010;94:467-469.
49. Broaddus E, Topham A, Singh A.D. Survival with retinoblastoma in the USA: 1975-2004. *Br J Ophthalmol* 2009 93: 24-27.
50. Broaddus E, Topham A, Singh AD: Survival with retinoblastoma in the USA: 1975-2004. *Br J Ophthalmol* , 2009. 93 (1): 24-7.
51. Bunin GR, Felice MA, Davidson W, et al. Medical radiation exposure and risk of retinoblastoma resulting from new germline RB1 mutation. *In. J. Cancer.* 2011 May 15;128(10):2393-404.
52. Canturk S, Qaddoumi I., Khetan V., et al. Survival of retinoblastoma in less-developed countries impact of socioeconomic and health-related indicators. *Br. J. Ophthalmol.* 2010;94:1432-1436.
53. Canty CA. Retinoblastoma: an overview for advanced practice nurses. *J. Am. Acad. Nurse Pract.* 2009 Mar;21(3):149-55.
54. Castéra L, Sabbagh A, Dehainault C, et al.: MDM2 as a modifier gene in retinoblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2010. 102 (23): 1805-8.
55. Català-Mora J, Parareda-Salles A, Vicuña-Muñoz CG et al. Uveitis masquerade syndrome as a presenting form of diffuse retinoblastoma. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 2009 Sep;84(9):477-80.
56. Chang CY, Chiou TJ, Hwang B, et al. Retinoblastoma in Taiwan: survival rate and prognostic factors. *Jpn.J. Ophthalmol.* 2006 May-Jun;50(3):242-9.

57. Chantada G L, Dunkel I J, de Davila M T G, Abramson D.H. Retinoblastoma patients with high risk ocular pathological features: who needs adjuvant therapy? *Br.J.Ophthalmol* 2004;88:1069-1073.
58. Chantada G.L, Dunkel I.J, Qaddoumi I, et al. Familial retinoblastoma in developing countries. *Pediatr. Blood Cancer*. 2009 Sep;53(3):338-42.
59. Chantada GL, Dunkel IJ, Antoneli CB. et al. Risk factors for extraocular relapse following enucleation after failure of chemoreduction in retinoblastoma. *Pediatr. Blood Cancer*. 2007 Sep;49(3):256-60.
60. Chantada GL, Gonzalez A, Fandino A, et al. Some clinical findings at presentation can predict high-risk pathology features in unilateral retinoblastoma. *J Pediatr. Hematol. Oncol*. 2009 May; 31(5):325-9.
61. Clark R: Retinoblastoma: genetic testing and counseling. In: Singh A, Damato B: *Clinical Ophthalmic Oncology*. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier, 2007, pp 441-446.
62. Clinicopathological investigation of a retinoblastoma eye enucleated after
63. Cozza R, De Ioris MA, Ilari I et al. Metastatic retinoblastoma: single institution experience over two decades. *Br. J. Ophthalmol*. 2009 Sep;93(9):1163-6.
64. Cuenca A, Giron F, Castro D, et al. Microscopic scleral invasion in retinoblastoma: clinicopathological features and outcome. *Arch Ophthalmol*. 2009, Aug;127 (8): 1006-10.
65. D.H. Abramson. Super selective ophthalmic artery delivery of chemotherapy for intraocular retinoblastoma: 'chemosurgery' The first Stallard lecture. *Br. J. Ophthalmol*. 2010;94:396-399.
66. David Ben Ezra In vitro fertilization and childhood retinoblastoma. *British Journal of Clinical Pharmacology*. Vol. 59, Issue 6, page 724, June 2005.
67. David H. Abramson. Retinoblastoma in the 20th Century: Past Success and Future Challenges The Weisenfeld Lecture. *IOVS*, August 2005, Vol. 46, No. 8, 2683-91.

68. Deepa PR, Nalini V, Mallikarjuna K, et al. Oxidative stress in retinoblastoma: correlations with clinicopathologic features and tumor invasiveness. *Curr. Eye. Res.* 2009 Dec;34(12):1011-8.
69. del Rio N R, Gomez J. M.A, Calvo J M.P. Lloret P. M. Atypical Retinoblastoma in Sotos Syndrome (Cerebral Gigantism). *Arch. Ophthalmol.* 2007 Apr. Vol 125 578-580.
70. Dick F.A. Structure-function analysis of the retinoblastoma tumor suppressor protein – is the whole a sum of its parts? *Cell Division* 2007, 2:26 doi:10.1186/1747-1028-2-26.
71. Dimaras H, Khetan V, Halliday W, et al. Retinoma underlying retinoblastoma revealed after tumor response to 1 cycle of chemotherapy. *Arch. Ophthalmol.* 2009 Aug;127(8):1066-8.
72. Ganguly A, Nichols KE, Grant G, et al. Molecular karyotype of sporadic unilateral retinoblastoma tumors. *Retina.* 2009 Jul-Aug;29(7):1002-12.
73. Gombos DS, Hungerford J, Abramson DH, et al.: Secondary acute myelogenous leukemia in patients with retinoblastoma: is chemotherapy a factor? *Ophthalmology* 114 (7): 1378-83, 2007.
74. Grabowska A, Calvo JP, Fernandez-Zubillaga A, Rios JC, Gómez JA A magnetic resonance imaging diagnostic dilemma: diffuse infiltrating retinoblastoma versus coats' disease. [Journal Article] *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2010.:e1-3.
75. Gupta R, Vemuganti GK, Reddy VA, Honavar SG. Histopathologic risk factors in retinoblastoma in India. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2009 Aug;133(8):1210-4.
76. *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus.* 2009 Sep-Oct;46(5):312-6.
77. Levin M.H., Gombos D.S., O'Brien J.M. Intra-arterial Chemotherapy for Advanced Retinoblastoma. Is the Time Right for a Prospective Clinical Trial. *Arch. Ophthalmol.* 2011;129(11):1487-1489.

78. Mohammed AM, Kamel AK, Hammad SA. Et al. Constitutional retinoblastoma gene deletion in Egyptian patients. *World J. Pediatr.* 2009 Aug;5(3):222-5.
79. Wilson M W., Jackson J.S., Phillips B.X. .Real-Time Ophthalmoscopic Findings of Superselective Intraophthalmic Artery Chemotherapy in a Nonhuman Primate Model. *Arch.Ophthalmol.* 2011;129(11):1458-1465.