

опухолей левосторонней локализации, что, возможно, является отражением одного из предполагаемых механизмов реализации эффекта, вытекающего из особенностей взаимодействия противоопухолевых препаратов с активированными клетками центральной лимфы.

3. После проведения АЛХТ относительное содержание Т-клеток и их субпопуляций, клеток, экспрессирующих линией неограниченные маркеры, а также активированных цитотоксических клеток компенсаторно увеличивается и достигает нормы (Т-лимфоциты и клетки с линией-неограниченными маркерами) либо даже превышает их (активированные/цитотоксические лимфоциты), что происходит за счет вовлечения в дифференцировку клеток-предшественников.

4. НК-клетки и клетки, несущие рецептор к IL-2, оказываются наиболее чувствительными к проводимой процедуре, поскольку снижаются как их абсолютное количество, так и доля среди других лимфоцитов. Снижение Рц-IL-2⁺-лимфоцитов следует расценивать, по-видимому, положительно, так как у данной группы больных их количество исходно повышено, что коррелирует с распространенностью процесса.

5. Разработанные методы АЛХТ и ЛХТБК представляются адекватными основным требованиям, предъявляемым лекарственному компоненту комбинированного лечения местно-распространенных форм немелкоклеточного рака легкого с точки зрения как переносимости, так и непосредственного противоопухолевого эффекта.

© Коллектив авторов, 1994
УДК 616-006.487-053.2:575.291

*М.Д. Неведов, О.П. Кириченко, А.Ф. Бровкина,
О.Г. Пантелеева, Ж.Г. Мустафина, Т.С. Телеуова,
Н.А. Ляпунова, Л.А. Дурнов, Р.Ф. Гарькавцева*

АНАЛИЗ ДЕЛЕЦИЙ ГЕНА РЕТИНОБЛАСТОМЫ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ ОПУХОЛИ

Медико-генетический научный центр РАМН, Онкологический научный центр РАМН, Институт глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Казахский НИИ глазных болезней, Алма-Ата

Ретинобластома (RB) редкая злокачественная опухоль сетчатки глаза у детей раннего возраста. Частота возникновения опухоли составляет 1/14—1/34 тыс. новорожденных [6]. Развитие опухоли обусловлено мутациями в гене RB, локализованном в проксимальной части длинного плеча хромосомы 13 (13q14.1). Показана важная роль делеций различной протяженности и локализации, приводящих к развитию опухоли. Примерно у 40% пациентов заболевание генетически детерминировано, т.е. больные являются носителями патологического гена RB. При этом в 30% случаев мутация возникает впервые в половых клетках одного из родителей и лишь в 10% наследова-

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Нормантович В.А., Верховцева А.И., Кирсанова Л.Д., Ратнер О.Н. Аутолимфо- и лейкохимиотерапия рака молочной железы и ряда других локализаций. Новое в решении проблем онкологии. — М., 1990. — С. 65—75.
2. Нормантович В.А., Сидоренко Ю.С. // Способ лечения рака легкого. А.С. 321858 от 02.01.91.
3. Нормантович В.А., Лактионов К.П., Кадагидзе З.Г. и др. // Вестн. ВОНЦ АМН СССР. — 1991. — № 4. — С. 12—14.
4. Противоопухолевая химиотерапия/Под ред. Н.И. Переводчиковой. — М., 1988. — С. 46.
5. Normantovich V.A., Mkhedise D.M., Laktionov K.P., Moroshkin I.B., Portnoi S.M., Kadagidze Z.G. et al // Nonadjuvant lymphochemotherapy of breast cancer advanced types: 4-th International Conference. Adjuvant therapy of breast cancer. — St. Gallen. February 26—29, 1992. — S. 63.

Поступила 30.11.92 / Submitted 30.11

*M.D. Nefedov, O.P. Kirichenko, A.F. Brovkina,
O.G. Panteleyeva, Zh.G. Mustafina, T.S. Teleuova,
N.A. Lyapunova, L.A. Durnov, R.F. Garkavtseva*

ANALYSIS OF RETINOBLASTOMA GENE DELETION IN DIAGNOSIS OF HEREDITARY TUMOR FORMS

Medical Genetical Research Center RAMS, CRC RAMS, Helmholtz Institute of Ocular Diseases of Russian Health Ministry, Moscow, Kazakh Research Institute of Ocular Diseases, Alma-Ata

Retinoblastoma (RB) is a rare malignant tumor of ocular retina in early childhood. Tumor incidence is 1 per 14,000—34,000 newborns [6]. The tumor develops due to mutations in the RB gene located in the proximal region of the chromosome 13 long arm (13q14.1). Deletions of various length and location contribute greatly to development of the tumor. In about 40% of the patients the disease is determined genetically, i.e. the patients have a pathological RB gene. In 30% of the cases the mutations occur in germ cells of one of the parents and in 10% only the tumor inheritance is traced in 2 or 3 generations of the family. In 10% the disease cannot be detected in the parents due to incomplete penetrance.

Выявление делеционных вариантов семейных форм RB по результатам цитогенетического и молекулярно-генетического исследований
 Familial RB deletion variants detected by cytogenetical and molecular genetical study

Метод исследования	Больные RB		Здоровые родственники	
	обследовано	выявлено делеций	обследовано	выявлено делеций
Цитогенетический Cytogenetical	78	3 (3,8%)	37	0
Молекулярно-генетический Molecular genetical	28	6 (23%)	38	0
Комплексный цито-, молекулярно-генетический Complex cyto- and molecular genetical	26*	7 (27%)	38	0
Method of study	examined	deletions detected	examined	deletions detected
	RB patients		Normal relatives	

* В семье одного пациента с цитогенетически выявленной делецией блот-гибридизационный дозовый анализ не проводился.

* There was no blot hybridization dose analysis in the family of one patient with a cytogenetically detected deletion.

ние опухоли (мутации) может быть прослежено в 2 или 3 поколениях семьи. В 10% случаев заболевание у родителей не проявляется вследствие неполной пенетрантности.

Настоящее сообщение посвящено оценке вклада делеционных вариантов RB в формирование наследственной предрасположенности к заболеванию.

Основной целью данного исследования явилась дифференциальная диагностика наследственных форм RB на основе комплекса медико-генетических, цито- и молекулярно-генетических параметров.

При этом решались следующие задачи: выявление лиц с наследственной предрасположенностью к RB; выявление семей с цито- и молекулярно-генетическими делециями в гене RB; определение риска возникновения повторного случая заболевания у членов семьи; формирование на этой основе диспансерного регистра лиц с наследственной отягощенностью к этому заболеванию.

Решение поставленных задач позволило в целом ряде семей прогнозировать заболевание, дать рекомендации как для пренатальной, так и для ранней, в том числе доклинической, диагностики опухоли, что будет способствовать успеху в лечении этого тяжелого заболевания.

Материалы и методы. Больные с наследственными формами RB были отобраны для исследования при медико-генетическом консультировании в различных специализированных клиниках: ОНЦ РАМН, Институте глазных болезней им. Гельмгольца (Москва), Казахском НИИ глазных болезней (Алма-Ата). Всего обследовано 78 больных и 38 здоровых родственников из 55 семей.

Цитогенетические исследования проводили на хромосомах лимфоцитов периферической крови. Дифференциальную окраску проводили по стандартной методике GTG. В каждом случае анализировали не менее 50 клеток на стадии ранней метафазы.

Молекулярно-генетические методы. ДНК выделяли из ядер лейкоцитов периферической крови, гидролизвали рестриктазой HindIII в концентрации 5 ед/мкг ДНК. После электрофореза и денатурации в геле ДНК переносили на нейлоновые фильтры Hybond

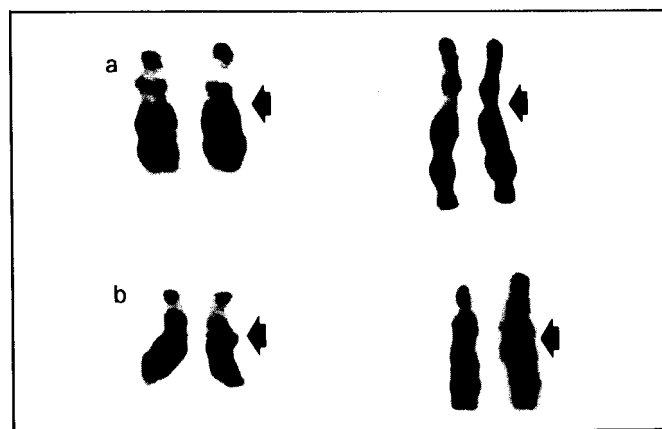


Рис. 1. Хромосома 13 из кариотипа четырех клеток 2 больных RB (a и b).

Стрелкой указана локализация делеций 13q14.

Fig. 1. Chromosome 13 from four cell karyotypes of 2 RB patients (a and b).

The arrow shows location of the 13q14 deletions.

This report evaluates contribution of RB deletion variants to hereditary proneness to the disease.

The main purpose of this investigation was differential diagnosis of RB hereditary forms based on a set of medical genetical, cytogenetical and molecular genetical parameters. The study was aimed to detect persons with hereditary proneness to RB; to detect families with cytogenetic and molecular genetic deletions in the RB gene; to evaluate the risk of repeated disease in members of the families; to make up a register of persons with hereditary proneness to the disease.

On achieving these objectives we could predict disease occurrence in a number of families, give recommendations both for prenatal and early (inclusive of preclinical) diagnosis of the tumor which would con-

("Amersham") по методу Саузерна [7]. В качестве зондов были использованы диагностическая проба pH3-8, вырезанная из гена RB по сайту рестрикции HindIII [4] и комплементарная участку 4-го экзона гена RB, а также контрольная проба p9D11 [2], находящаяся дистальнее (13q22) и не затрагивающая область гена RB. Гибридизационная смесь содержала сразу две меченые пробы. ДНК зондов метили с использованием случайной затравки [5].

Молекулярные пробы были любезно предоставлены д-ром M. Laland из Children Clinic (Бостон, США) и проф. W.C. Cavenee из Ludwig Institute for Cancer Research, McGill University (Монреаль, Канада).

Результаты исследования и их обсуждение. Для изучения делеции в гене RB были отобраны пациенты с ранним возрастом начала заболевания (до 6 мес), в том числе дети с врожденной RB, больные с двусторонними или мультилокусными формами опухоли, а также все пациенты, имеющие больных аналогичной опухолью родственников I—III степени родства.

При анализе хромосом 115 пациентов из 55 семей (51 больной с двусторонней RB, 27 — с односторонней и 37 здоровых родственников) делеция участка длинного плеча хромосомы 13 выявлена у 3 больных с двусторонней RB (см. таблицу; рис. 1). Делеции захватывали сегменты 13q14.1—13q14.2. В 2 случаях заболевание носило семейный характер, однако у родителей при цитогенетическом исследовании делеций выявлено не было. Таким образом, у всех пациентов с протяженной делецией выявленная мутация не унаследована от родителей, т.е. возникла *de novo*. Отсутствие делеции у родителей при семейных формах заболевания может быть обусловлено двумя причинами: 1) семейная агрегация заболевания не связана с наследственной предрасположенностью; 2) заболевание в семье наследуется, но сцеплено не с делецией, а с неизвестной нам мутацией в гене RB у одного из родителей. Не исключено также, что возникновение делеции в гене RB как-то связано с наличием в нем мутации, приводящей к развитию заболевания.

Следующим этапом исследования было выявление микроделечий гена RB с использованием блот-гибридизационного дозового анализа. Для этого проводили блот-гибридизацию с диагностическим ДНК-зондом pH3-8 и контрольным зондом p9D11.

Было проанализировано 64 образца ДНК 25 больных RB и 38 их здоровых родственников из 19 семей. У 6 больных в 5 семьях было выявлено уменьшение интенсивности гибридизации зонд pH3-8, свидетельствующее о наличии у них микроделечии.

В семье F-1.6 (рис. 2), исходя из факта семейного накопления RB, раннего начала заболевания и двусторонности поражения, была предположена наследственная форма заболевания. Цитогенетический анализ не выявил делеций ни у одного члена семьи. При блот-гибридизационном дозовом анализе в этой семье микроделечия H3-8 была выявлена у больной матери и ее больного ребенка. Таким образом, был подтвержден наследственный характер заболевания в данной семье. Герминальная (в половых клетках) делеция возникла у матери и унаследована дочерью. Риск повторного рождения больного ребенка в данной семье составляет 50%. Больная дочь также с вероятностью 50% будет передавать заболевание своим будущим детям. Здоро-

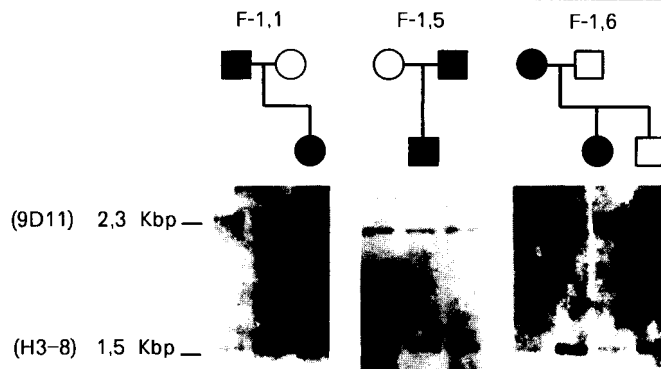


Рис. 2. Результаты блот-гибридизационного дозового анализа с пробами pH3-8 и p9D11 в семьях больных RB. Интенсивность гибридизации диагностического зонда pH3-8 в исследуемой ДНК снижена по сравнению с контрольной ДНК здоровых родственников в 2 раза.

Темные квадрат и кружок — больные RB; белые квадрат и кружок — здоровый родственник.

Fig. 2. Results of blot hybridization dose analysis with probes pH3-8 and p9D11 in families of RB patients. The intensity of pH3-8 diagnostic probe hybridization in the DNA studied is twofold lower as compared with the control DNA from normal relatives.

The dark square and circle represent RB patients; the light square and circle represent normal relatives.

tribute to successful treatment of this very serious malignancy.

Materials and Methods. The selection of patients with hereditary RB was performed at medical genetical consultations in special clinics such as CRC RAMS, Helmholtz Institute of Ocular Diseases (Moscow), Kazakh Institute of Ocular Diseases (Alma-Ata). The study was carried out in 78 patients and 38 normal relatives from 55 families.

The cytogenetical investigations were performed on peripheral blood lymphocytic chromosomes. The differential staining was performed by the standard GTG technique. At least 50 cells at early metaphase were studied in every case.

Molecular Genetical Methods. DNA was isolated from peripheral blood leukocyte nuclei. The DNA was hydrolyzed with HindIII restrictase at concentration 5 u/ μ g DNA. After electrophoresis and denaturation in gel the DNA was transferred onto Hybond (Amersham) nylon filters by Southern's technique [7]. The diagnostic probes pH3-8 complementary to the RB exon 4 region were cut out from the RB gene in the HindIII restriction site [4], the control probes p9D11 [2] were taken from segments (13q22) distal and not adjacent to the RB gene region. The hybridization mixture contained both labeled probes. The probe DNA was labeled by random priming [5].

The molecular probes were kindly provided by Dr M. Laland from Children Clinic (Boston, USA) and by Professor W.C. Cavenee from Ludwig Institute for Cancer Research, McGill University (Montreal, Canada).

Results and Discussion. The study of RB gene dele-

вый брат не является носителем патологического гена. Риск рождения больного RB ребенка в его будущей семье равен общепопуляционному.

В 2 семьях цитогенетический анализ также не выявил нарушений ни у одного из членов семьи. Тем не менее вновь возникшая микроделеция H3-8 была выявлена при блот-гибридизации у 2 больных с двусторонней RB детей, но не у их родителей (см. рис. 2, F-1.5). Таким образом, мутация *de novo* возникла в клетках полового пути одного из родителей.

В семье F-1.1 микроделеция выявлена только у больного отца; у его больной дочери микроделеция не обнаружена. Для объяснения полученного результата можно предположить наличие соматической рекомбинации, в результате которой исчезла делеция, но не произошло восстановление функции гена. Более обширная делеция, затронувшая область 13q14.1—13q22, включающую сайт 9D11, и "маскирующая" утрачу "дозы" гена, в данном случае была исключена при цитогенетическом анализе.

У 1 ребенка с двусторонней RB цитогенетическая делеция была подтверждена при блот-гибридизации.

Результаты выявления делеционных вариантов в семьях больных RB на основании цитогенетического и молекулярно-генетического исследований, проведенных в данной работе, представлены в таблице. Как видно, семейная частота делеционных вариантов заболевания среди обследованных нами 19 семей достаточно высока и составила 6 из 19, или 31%.

Решение поставленных задач позволило в целом ряде семей прогнозировать заболевание. Во всех случаях обнаружения делеций была проведена дифференциальная диагностика наследственных форм RB, выявлены лица с наследственной предрасположенностью к RB, определен риск возникновения повторного случая заболевания у членов каждой семьи, даны рекомендации как для пренатальной, так и для ранней, в том числе доклинической, диагностики опухоли, сформирован на этой основе диспансерный регистр лиц с наследственной отягощенностью к этому заболеванию. При наличии заболевания у одного из родителей и обнаружении микроделеции у больного ребенка риск для последующих sibсов равен 45—50%, так как в этом случае микроделеция имеет место в 50% половых клеток больного родителя. В случае наследования мутации (в семье поражены два и более sibсов при двух здоровых родителях) риск для последующих sibсов также равен 45—50%. При вновь возникшей мутации риск для последующих sibсов равен популяционному — 5% [1].

По данным литературы [3], частота делеций у пациентов с наследственными формами заболевания составляет 20—30% (по нашим данным, 31%). Возможно, что расширение набора зондов может увеличить долю делеционных вариантов RB, однако не следует ожидать, что комплекс мутаций в гене RB целиком исчерпывается делециями.

Таким образом, выявление делеций гена RB может являться лишь частью в комплексной диагностике наследственной предрасположенности к RB. Применение

tion was performed in patients with disease occurrence at early (under 6 mo) age including children with congenital RB, patients with bilateral and multilocal tumors and all patients having grade I—III relatives with RB.

Chromosomal analysis of 115 persons from 55 families (51 patients with bilateral and 27 with unilateral RB, 37 normal relatives) discovered deletions in chromosome 13 long arms in 3 patients with bilateral RB (see the table, fig. 1). The deletions were found in segments 13q14.1—13q14.2. In 2 cases the disease was familial though no deletions were found cytogenetically in the parents. Thus the detected mutation in all cases with extensive deletions was not inherited from parents, but occurred *de novo*. The absence of the deletions in parents in familial disease may be due to the following: 1) the familial disease aggregation is not associated with hereditary proneness; 2) the disease is inherited in the families, but is associated with an unknown mutation of the RB gene rather than deletion in one of the parents. It is also possible that occurrence of deletions in the RB gene is in some relation to mutation of the gene that induces the disease.

The next stage of the study was detection of microdeletion of the RB gene by blot hybridization dose analysis. For this purpose blot hybridization was performed using diagnostic DNA probes pH3-8 and control probes p9D11.

We analyzed 64 DNA samples of 25 RB patients and 38 normal relatives from 19 families. Six patients from 5 families presented decrease in intensity of probe pH3-8 hybridization which was evidence of microdeletion.

Basing on the fact of familial RB aggregation, early disease occurrence and bilateral affection we supposed hereditary disease in family F-1.6 (fig. 2). No deletions were detected cytogenetically in any member of the family. But the blot hybridization dose analysis discovered H3-8 microdeletions in the mother and her child, both with RB. Therefore, we confirmed the disease being hereditary in this family. A germinal (in sex cells) deletion occurred in the mother and was inherited by the daughter. The risk of birth of another baby with RB in this family is 50%. The tumor-bearing daughter will pass over the disease to her children with the same probability of 50%. The normal brother does not carry the pathological gene. The risk of birth of a baby with RB in his family is similar to the population risk.

In 2 other families the cytogenetical analysis did not detect abnormalities in any member of the family either. However a *de novo* H3-8 microdeletion was found by blot hybridization in 2 patients with bilateral RB, but not in their parents (see fig. 2, F-1.5). Thus, the *de novo* mutation occurred in sex cells of one of the parents.

In family F-1.1 there was a microdeletion in the father with RB and no microdeletions in his daughter with the disease. This result suggests that there was a somatic recombination leading to disappearance of the

других методов в молекулярно-генетической диагностике наследственных форм RB и на этой основе прогнозирование предрасположенности к опухоли в семье будут рассмотрены в следующем сообщении. Работа выполнена в рамках программы "Геном человека".

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Сотникова Е.Н. Медико-генетическое консультирование и принципы формирования групп риска в детской онкологии: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1987.
2. Cavenee W.K. et al. // Nature. — 1983. — Vol. 305. — P. 779—784.
3. Horsthemke B., Barnert H.I., Greger V. et al. // Lancet. — 1987. — Vol. 1. — P. 511—512.
4. Lalande M. et al. // Cancer genet. cytogenet. — 1984. — Vol. 13. — P. 283—295.
5. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. — Gold Spring Harbor Lab, 1982.
6. Shields J.A. Diagnosis and management of intraocular tumors. — London, 1989.
7. Southern E. // J. Molec. Biol. — 1975. — N 98. — P. 503—527.

Поступила 18.01.93 / Submitted 18.01.93

© Коллектив авторов, 1994
УДК 616.24-006.6:577.15

Б.Е. Полоцкий, С.М. Ситдикова, Ф.В. Доненко,
З.О. Мачаладзе, Л.В. Мороз

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗ В КЛЕТКАХ УДАЛЕННОЙ ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

НИИ клинической онкологии

В настоящее время широко обсуждается вопрос о роли глутатион-S-трансфераз (GST) в обеспечении резистентности опухолевых клеток к цитостатикам. Показано, что активность этих ферментов возрастает при развитии устойчивости к доxorубину клеток лейкоза мышей P-388 в системе *in vivo* [1]. Аналогичные данные получены в системе *in vitro*: в клетках MCF-7

deletion without restoration of the gene functioning. Occurrence of a more extensive deletion in the segment 13q14.1—13q22 including the site 9D11 that "disguised" the loss of a gene "dose" was excluded by the cytogenetical analysis.

In one child with bilateral RB the cytogenetical deletion was confirmed by blot hybridization.

The deletion variants detected by cytogenetical and molecular genetical study in families of RB patients are presented in the table. The rate of familial deletion in the 19 families studied is rather high: 6/19 or 31%. Basing on results of our investigation we could make prognosis of the disease in some of the families. In all cases of deletion detection we made differential diagnosis of hereditary RB forms, distinguished persons with hereditary proneness to RB, evaluated the risk of disease repetition in members of every family, gave recommendations both for prenatal and early (including preclinical) tumor diagnosis, made up a register of persons with hereditary proneness to the disease.

RB occurrence in one of the parents and detection of a microdeletion in a child with RB determined a risk of 45—50% for further sibs because in this case the microdeletion is present in 50% of germ cells of the parent with RB. In cases of hereditary mutation (involvement of two or more sibs with both parents being normal) the risk for sequent sibs is also 45—50%. In cases of *de novo* mutations the risk for sequent sibs is similar to the populational risk, i.e. 5% [1].

By B. Horsthemke et al. [3], the rate of deletion in parents with hereditary disease is 20—30% (31% by our data). Employment of a larger set of probes may increase the portion of RB deletion variants, but the complex of mutations in the RB gene is hardly confined to deletions only.

Thus, detection of RB gene deletions should be a part of complex diagnosis of hereditary proneness to RB. Application of other methods of molecular genetical diagnosis of RB hereditary forms and prognosis of familial predisposition to the malignancy will be considered in the next report. The investigation is performed within the Human Genome program.

B.E. Polotsky, S.M. Sitdikova, F.V. Donenko,
Z.O. Machaladze, L.V. Moroz

EVALUATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITY IN CELLS OF OPERATIVE SPECIMENS OF NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA

Research Institute of Clinical Oncology

The role of glutathione S-transferases (GST) in tumor cell resistance to cytostatics is currently under wide discussion. It is shown *in vivo* [1] that doxorubicin-resistant cells of murine leukemia P-388 demonstrate increased GST activity. Similarly, MCF-7 cells with multidrug resistance (MDR) show *in vitro* a 45-fold higher GST activity than their parental sensi-