

A Debreceni Egyetem OEC Szemészeti Klinikájának (igazgató: Berta András egyetemi tanár) közleménye

Molekuláris genetikai vizsgálatok retinoblastomás betegeken

DAMJANOVICH JUDIT, BERTA ANDRÁS

Bevezetés: A DE OEC Szemklinikán 1989–1997 között kezelt retinoblastomás betegeken végzett molekuláris genetikai vizsgálatok bemutatása.

Betegek és módszerek: Retinoblastomás betegek daganatából, valamint a betegek és szüleik véréből vett mintákon fluoreszcencia in situ hibridizációt (FISH), valamint immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk (retinoblastoma-protein és neuronspecifikus enoláz kimutatására). Indokolt esetekben a vizsgálatokat polimeráz láncreakció (PCR) elvégzésével egészítettük ki.

Eredmények: A 19 esetből 12-ben állt rendelkezésünkre az eltávolított tumor. Tizenegy esetben a tumorokban a gén elvesztését sikerült kimutatni FISH-el, két beteg lymphocytaiban pedig az egyik allél elvesztését. Egy féloldali retinoblastomás betegnél az elvégzett genetikai vizsgálatok nagy valószínűséget mutattak arra, hogy a második szemben is megjelenjen a daganat. Rendszeres kontrollvizsgálatok mellett a daganatot igen kis méret mellett lehetett kimutatni és sikeresen kezelni.

Következtetés: Vizsgálataink a tudományos eredmények mellett közvetlen gyakorlati haszonnal is jártak, ezzel igazolva, hogy a FISH, amely ma még Magyarországon nem rutin klinikai laboratóriumi módszer, alkalmas lehet a retinoblastomás családokban genetikai tanácsadás céljaira.

Kulcsszavak: retinoblastoma, molekuláris genetika, fluoreszcencia in situ hibridizáció, genetikai tanácsadás

MOLECULAR GENETIC EXAMINATIONS ON PATIENTS WITH RETINOBLASTOMA

Introduction: We report on molecular genetic examinations of retinoblastoma patients treated between 1989-1997 at the Department of Ophthalmology of the University of Debrecen Medical and Health Sciences Centre.

Patients and Methods: Tissue samples of tumours from patients suffering from retinoblastoma, as well as blood samples from these patients and their parents, were examined. Fluorescence in-situ hybridisation (FISH) and immunohistochemistry were used in order to detect retinoblastoma protein and neurospecific enolase. A polymerase chain reaction (PCR) test was also carried out in some cases.

Results: The enucleated tumours were examined in twelve cases from a total of nineteen. In eleven cases the investigations with the FISH technique detected the loss of the retinoblastoma gene and in two cases the peripheral lymphocytes showed one allelic loss. Genetic studies on a patient suffering from unilateral tumour indicated a high probability of tumour growth in the fellow eye. The tumour was discovered when it was in an early stage, and was treated successfully.

Conclusions: The investigations were carried out primarily for research purposes, but also provided practical benefit for the patients; thereby supporting our view that the FISH technique, which is not yet a routine clinical laboratory test, can successfully be used as a tool for genetic counselling in families with retinoblastoma.

Keywords: retinoblastoma, molecular genetics, fluorescence in situ hybridisation, genetic counselling

Bevezetés

Mai ismereteink szerint a daganatképződés folyamatának kardinális pontja a nem letális genetikai károsodás. Ilyen jellegű károsodást (mutáció) előidézhethetnek környezeti hatások, vagy a genetikai predispozíció öröklődhet. A daganatképződés szempontjából a normál sejtekben jelenlevő szabályozó gének két csoportja – a növekedést serkentő protoonkogének és a növekedést gátló tumorszuppresszor gének – jelentik a genetikai károsodások fő célpontjait.^{8,9,11,18} Hatását mindkét reguláló gén géntermékek útján fejtik ki. Nagyon leegyszerűsítve a tumorképződés mechanizmusát, ezen szabályozó gének mutációi esetén az érín-

tett sejtek kiszabadulhatnak a reguláló funkció alól és daganatos burjánzásba kezhetnek.¹³

A retinoblastoma a leggyakoribb gyermekkori malignus intraocularis tumor, amely jellegzetesen újszülött- és kisgyermekkorban fordul elő. Embriónális neuroectodermális eredetű rosszindulatú daganat, a retina primitív prekursor sejtjeiből a retinoblastokból alakul ki. Az esetek mintegy 25–40%-ában figyelhető meg a daganat kétoldali előfordulása. A mindkét szemet érintő elváltozást minden esetben örökletesnek tartjuk, de ebbe a csoportba sorolható a féloldali retinoblastomás megbetegedések egy része is. Az örökletes formában megfigyelt genetikai eltérés a 13-as kromoszóma hosszú karján található retinoblastoma 1 gén mutációja (13q14 régió), ez volt az első leírt tumorszuppresszor gén, amely az onkogenezis szempontjából modellértékű.¹⁷ Knudson hipotézise¹² és mai ismereteink szerint két egy-

Jazác Magdolna professzornő 70. születésnapja tiszteletére

mástól független mutáció eredménye egy új retinoblastoma megjelenése. Az örökletes retinoblastomában szenvedő betegek esetében az egyik mutáció familiáris predispozíció eredménye, míg a második intrauterin alakul ki. Létrejöttének ideje meghatározza a tumor egy- vagy kétoldali jellegét.^{4,12} Az öröklött defektus az utód minden sejtjében megtalálható. Ez magyarázhatja, hogy a kétoldali betegségben szenvedőkön gyakori a szekunder tumorok (pl. osteosarcoma) manifesztálódása.¹

A retinoblastoma 1 gén (RB1) terméke egy foszforprotein (pRB), amely transzkripció faktorok (pl. E2F) szabályozásában vesz részt. Így gátolja egy géncsoport aktiválódását, és ezzel a sejt proliferációját. Ennek hiányában a sejtben a G0–G1 átment lehetővé válik és a sejtproliferáció megindul, gátlás hiányában kontroll nélkül.¹³

A sporadikus és hereditár retinoblastomadaganatok elkülönítése genetikai módszerekkel lehetséges. Tekintettel arra, hogy az RB1 génben ún. forró pontok nincsenek, a gén mérete miatt a részletes genetikai analízis hosszadalmas (27 exon PCR-analízist kell megvalósítani). FISH-el lehetőség van a kilobázis szintű deléciók kimutatására és ezzel bizonyos esetekben a gyors diagnosztizálásra is.

A fluoreszcencia in situ hibridizáció alkalmas specifikus DNS-szekvenciák megjelenítésére, morfológiailag ép kromoszómákon, sejteken és szövetekből készült metszeteken. Minden olyan sejt vagy szövet tanulmányozható, melyben a DNS nem degradálódott, ill. melyben a degradáció nem indult el. Jelenleg a FISH a leggyorsabb molekuláris genetikai módszer a kromoszomális eltérések kilobázis szintjén történő kimutatására. *Pinkel és Gray* 1988-ban dolgozta ki a fluoreszcencia detektálásán alapuló in situ hibridizációt.⁷ A specifikus DNS-szekvenciák kimutatása in situ hibridizációval a DNS azon tulajdonságán alapul, hogy megfelelő denaturálási körülmények között (pH, hőmérséklet, kémiai környezet) a DNS kettős spirál szerkezete megbomlik és így az ugyancsak denaturált DNS-próbák számára hozzáférhetővé válik.^{7,10,16} A renaturáció során (37 °C, pH 7,0, optimális kémiai környezet) a DNS-próba szekvenciájának megfelelő komplementer nukleinsavszekvenciáját felismeri a target DNS-ben és hozzákötődik. A jelzett DNS-próbák rövid (200–500 bázispár hosszúságú) hisztokémiai úton detektálható, nukleotid prekursorral (biotin, digoxigenin stb.) jelölt DNS-fragmentek.⁷ A közvetlenül fluorofórral konjugált nukleotidokkal (pl. fluorescein-dUTP vagy TexasRed-dUTP) a genetikai eltérések detektálás ideje lényegesen lerövidül.^{7,10,16} Hibridizációt követően a DNS specifikus próba szekvenciájának megfelelő kromoszómaszegmenteken normál sejtek hibridizációját követően egy-egy fluoreszkáló jel, míg az interfázisos sejtmagokban két fluoreszkáló pont jelenik meg.

A legelterjedtebben alkalmazott centroméra-specifikus próbák a számbeli eltéréseket, míg a lokusz-specifikus próbák a nevükben jelzett célpontot azonosítják. A DNS-specifikus 13q14 próba az RB1 gén jelentős részét lefedi, biztosítva ezzel a próba alkalmazhatóságát RB1-deléció kimutatására.²

Betegek és módszerek

1989–1997 között 11 kétoldali retinoblastomás betegen végeztünk molekuláris genetikai vizsgálatokat Szemklinikánkon. A hét fiú és négy lánybeteg életkora 3 hónap és három év közötti volt a kezelések megkezdésekor. Az egyik szem enucleációját követően ruténium-applikátoros kezelést végeztünk a második szemén.^{3,5} Ebben a csoportba tartozó négy beteg az egyik szem eltávolítását követően érkezett klinikánkra, a második szem kontakt irradációs (applikátor) kezelésére. Így az eltávolított szem daganatából nem állt rendelkezésünkre minta, csak a betegek, ill. szüleik véréből.

1989–1997 között féloldali retinoblastoma miatt enucleált kilenc betegen végeztünk molekuláris biológiai vizsgálatokat. A hét fiú és két lány életkora 3 hónap és 4 év közötti volt. Egyik féloldalinak induló 3 hónapos betegünk később a kétoldali csoportba került, így összesen nyolc beteg (7 fiú és 1 lány) tartozott a féloldali csoportba. Mind a bilaterális, mind a féloldali tumoros betegek családi anamnézise negatív volt a retinoblastomát tekintve. A részletes és családi anamnézis felvételét követően a szülők, testvérek szemészeti vizsgálatát valamennyi esetben elvégeztük. Egyik esetben sem találtunk szemfenéki eltérést.

Kísérleteink során a tárgylemezen fixált interfázisú sejteken alkalmaztuk a fluoreszcencia in situ hibridizációt.^{6,10} A módszert retinoblastomadaganatból enucleációt követően frissen vett interfázisú tumorsejtekre kellett megfeleltetni. A tumorból származó sejtek kinyeréséhez rendelkezésünkre álló protokollt adaptáltuk kis térfogatú szövetből nyerhető interfázisos sejtekre, hiszen a tumornak csak igen kis részlete állt FISH-analízisre rendelkezésre. A daganatból sejtszuspenziót készítettünk, melyet fixálást követően zsírtalanított tárgylemezre cseppentettük, hagytuk megszáradni, majd a tárgylemezeket -20 °C-on tároltuk.¹⁰ A hibridizációs eredmények kiértékelhetőségének megkönnyítésére a fenti módon nyert lemezekre a fixált tumorsejtekre (az első hibridizációs eredmények ismeretében) egészséges egyedből származó lymphocytákat cseppentettünk. Valamennyi hibridizációt háromszor ismételtük meg és minden alkalommal párhuzamosan normál sejtek hibridizációját is elvégeztük. Amennyiben a tumorban FISH-el eltérést találtunk, a gyermek és a szülők perifériás véréből, szülői beleegyezést követően, lymphocytákat preparáltunk, majd a már említett fixálás után a kicseppentett mintákat tárgylemezekre -20 °C-on tároltuk. Kontrollként egészséges egyedekből származó perifériás vérből kromoszómapreparátumot készítettünk standard protokoll szerint. A centroméra-specifikus próbák egy része digoxigeninnel jelzett,⁶ a másik része pedig biotinált DNS-próbák voltak. A lokusz-specifikus DNS-próbák (13q14) direkt jelzett, a VYSYS cég által forgalmazott minták.⁶

Retinoblastoma-protein (pRB) kimutatása

Minden olyan tumornál, amikor FISH-el mindkét 13q14 lokusz detektálható volt, azaz deléciót nem tudtunk kimutatni és a szövettani blokk rendelkezésünkre állt, 5 µm vastag szöveti metszeteket készítettünk. Kontrollként humán embrionális porcszövetet alkalmaztunk.⁶ A pRB kimutatá-

sára Novocastra NCL-RB monoklonális antitestet használtunk (hígítás:1:10). Az antigén–antitest reakció megjelenítése Vectastain ABC kittel történt (Vector, USA).

Neuronspecifikus enoláz

Abban az esetben, melyben nem volt egyértelmű, hogy a vizsgált sejtek valóban tumorsejtek, a malignus sejtek kimutatására a neuronspecifikus enoláz (NSE) detektálását végeztük el. Az immunhisztokémiai reakció kivitelezéséhez 5 µm vastag metszeteket készítettünk a szemből. Megfelelő előkezelést követően a nem specifikus antitestkötődés kizárására egér anti-NSE (1:50 Dako USA)-vel inkubáltuk a mintákat. Az antigén–antitest reakciót biotinált anti-egér IgG-vel (1:200 Vector, USA) és 1:40 hígítású TexasRed streptavidinnal (Vector USA) tettük láthatóvá. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük.⁶

Eredmények

Kétoldali retinoblastomás betegek

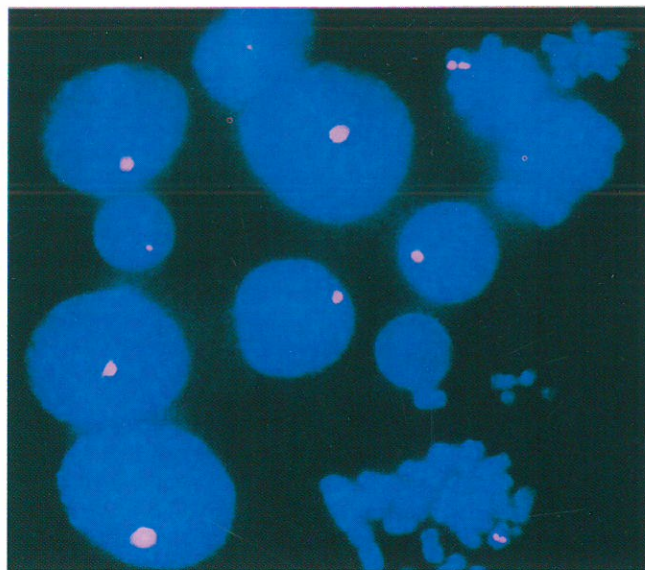
Négy esetben más intézményben végezték az enucleatiót, így nem volt vizsgálható tumormintánk, de a gyermekek és szüleik perifériás vére hozzáférhető volt. Hat betegnél rendelkezésünkre álltak a tumorból nyert sejtek és a gyermekek és a szülők véréből preparált lymphocyták. Egy esetben csak a daganatból nyert sejteket tudtuk vizsgálni, mert a vérévelhez a szülők nem járultak hozzá.

Kísérleteink során a FISH-analízist először a tumorsejteken végeztük el. Ha FISH-el deléciót találtunk az RB1 génre nézve, azaz nem volt fluoreszkáló jel a 13q14 lókuszon bekövetkezett deléció miatt, a beteg véréből preparált

1. táblázat. A kétoldali retinoblastomás esetek eredményei

	A FISH mindkét allélt jelöli	A FISH egyik allélt sem (tumor), vagy csak az egyik allélt (vér) jelöli
Tumorsejtek	3	4
Beteg lymphocytái	6	1
Szülő lymphocytái	7	0

Kísérleteink során a FISH-analízist először a tumorsejteken végeztük el. Ha FISH-el deléciót találtunk az RB1 génre nézve, azaz nem volt fluoreszcens szignál, a 13q14 lókuszon bekövetkezett deléció miatt, a beteg véréből preparált lymphocytákat is hibridizáltuk az RB1 génre specifikus próbával. Abban a három esetben, ahol nem volt FISH-el kimutatható allélvesztés, a perifériás lymphocytákat nem vizsgáltuk. A tumorban a bilaterális esetekben vagy mindkét allél FISH-el kimutathatóan elveszett, vagy ezzel a módszerrel nem volt detektálható az allélvesztés. Betegeink közül egynek a perifériás lymphocytáiban is jelentkezett az allélvesztés, amikor ezt kimutattuk, még a másik szemben nem volt daganat (ez a betegünk került a féloldali csoportból a kétoldaliak közé). Mivel a második szemben nagyon nagy volt a daganat megjelenési valószínűsége, gyakori kontrollvizsgálatokat alkalmaztunk és a második szemben megjelent daganatot sikerült kis méret mellett felfedezni és kezelni.



1. ábra. Sejtenyészeten az interfázisú sejtekben egy-egy jelölődés látható a 13q14 lókuszt-specifikus próbával. Az oszlo sejtekben 1 kromoszómán az adott jelöléssel ép viszonyokat találunk a másik kromoszóma nem jelölődik a lókuszt-specifikus próbával

lymphocytákat is hibridizáltuk az RB1 génre specifikus próbával. A bilaterális esetekben nyert eredményeinket az 1. táblázat mutatja. Abban a három esetben, amelyeknél nem volt FISH-el kimutatható allélvesztés, a perifériás lymphocytákat nem vizsgáltuk. A tumorban a bilaterális esetekben vagy mindkét allél FISH-el kimutathatóan elveszett, vagy ezzel a módszerrel nem volt detektálható az allélvesztés. Betegeink közül egynek a perifériás lymphocytáiban is jelentkezett az allélvesztés (1. ábra), amikor ezt kimutattuk, még a másik szemben nem volt daganat (ez a betegünk került a féloldali csoportból a kétoldaliak közé). Mivel a második szemben nagyon nagy volt a daganat megjelenésének valószínűsége, gyakori kontrollvizsgálatokat alkalmaztunk és a második szemben megjelent daganatot sikerült kis méret mellett kezelni.

Féloldali retinoblastomás betegek

Összesen nyolc féloldali retinoblastomás beteg eltávolított szeméből nyert tumor sejteket vizsgáltunk. (Egy korábban ebbe a csoportba tartozó beteget már a kétoldaliak között említettünk). Öt esetben rendelkezésünkre állt a tumor, a beteg és a szülők perifériás lymphocytái, három esetben pedig csak a daganat. A 13q14 génre vonatkoztatva FISH-el a féloldali eseteket összefoglaló 2. táblázatban látható eredményeket kaptuk. Ugyanannak a betegnek a tumorsejtjeiben és a perifériás lymphocytáiban is csak egy allél elvesztését mutattuk ki FISH-el. Tekintettel arra, hogy a gén-funkciónak a daganat kialakulásához el kellett vesznie, ez egyben a retinoblastoma-fehérje expressziójának a hiányát is jelenti. Szöveti metszeteket készítettünk a korábban általunk kettévágott szemből, ezekben a metszetekben retinoblastoma-fehérjét nem tudtunk kimutatni, az NSE pozitívitas igazolta, hogy tumorsejteket vizsgáltunk.¹⁸ Mind-

2. táblázat. A féloldali retinoblastomás eseteket eredményei

FISH	mindkét allélt jelöli	az egyik allélt jelöli	egyik allélt sem jelöli
Tumor	0	1	7
Beteg lymphocytái	4	1	0
Szülő lymphocytái	5	0	0

Összesen nyolc féloldali retinoblastomás beteg eltávolított szeméből nyert tumorsejteket vizsgáltunk. Öt esetben rendelkezésünkre állt a tumor, a beteg és a szülők perifériás lymphocytái, három esetben pedig csak a daganat. Ugyanannak a betegnek a tumorsejtjeiben és a perifériás lymphocytáiban is csak egy allél elvesztését mutattuk ki FISH-el. Tekintettel arra, hogy a génfunkciónak a daganat kialakulásához el kellett vesznie, ez egyben a retinoblastoma-fehérje expressziójának hiányát is jelenti. Szöveti metszeteket készítettünk a korábban általunk kettévágott szemből, ezekben a metszetekben retinoblastoma-fehérjét nem tudtunk kimutatni, az NSE-pozitivitás igazolta, hogy tumorsejteket vizsgáltunk. Mindezek alapján, bár a beteg másik szemében a mai napig nem jelentkezett a daganat, gyakorlatilag bilaterális retinoblastomás betegként kell tekinteni, akinél csak az inkomplett penetrancia magyarázza a második szem daganatmentességét. (A második mutáns allél kimutatására PCR-analízist végeztünk.)

ezen alapján, bár a beteg másik szemében a mai napig nem jelentkezett a daganat, gyakorlatilag bilaterális retinoblastomás betegként kell tekinteni, akinél csak az inkomplett penetrancia magyarázza a második szem daganatmentességét.⁶ A második mutáns allél kimutatására PCR-analízist végeztünk, melynek eredményeképpen beigazolódtott, hogy a FISH-el nem detektálható mutáció a 13, 15–16 és a 24-es exonokat érinti.

Megbeszélés

Statisztikai számítások szerint – melyek a genetikai vizsgálatok alapján igazolódni látszanak – a féloldali daganattal bíró betegek mintegy 50%-a a betegség hereditér formájában szenved. Azaz számos látszólag sporadikus eset új germinális mutációt hordoz.⁹

Míg a familiáris eredetű tumorokban a gyermek az RB1 gén egyik alléljának mutáns változatát örökli, addig sporadikus esetekben egy retinoblastosejt mindkét normális RB1 allélja szomatikus mutáció áldozatává esik.¹⁵ A familiáris forma autoszomálisan öröklődik, a hajlam ennek az első mutációnak az átörökítését, vagyis az adott génre – RB1 – nézve a heterozigotáság elvesztését jelenti,¹⁵ tehát az adott sejtek a defektív allélra nézve homozigotákká váltak,¹⁵ azaz a tumor kifejlődéséhez egy újabb, második mutáció szükséges mindkét formánál. Ha csak az egyik allél sérül, akkor retinoblastoma nem alakul ki, de ha a germinális sejtek mutációt szenvednek az RB1 lókuszon, akkor a hibás allél átöröklődik. Az utód minden szomatikus sejtje tartalmazni fogja a defektust. Ilyen esetekben a normál populációhoz viszonyítva közel 40 000-szer nagyobb az utód esélye arra, hogy retinoblastoma alakuljon ki és közel 400-szor nagyobb, hogy osteosarcoma, fibrosarcoma vagy melanoma lépjen fel.¹⁴ A retinoblastoma esetében befolyásolhatja a

másodlagos tumorok megjelenését az alkalmazott terápia is.¹

Megfigyelések és családfa-analízisek alapján a bilaterális, újonnan megjelenő (negatív családi anamnézis) daganatoknál a beteg minden egyes utódjának 50%-os esélye retinoblastoma kialakulására. Mégis a gyakorlatban ezekben az esetekben a családban való előfordulási arány kisebb mint 22%.¹⁴

A féloldali sporadikus eseteknél az érintettek gyermekeiben a tumor előfordulási esélye 10%, de a gyakorlatban a beteg gyermekeinek 5% az esélye arra, hogy retinoblastoma alakuljon ki. Ha a gyermek szülei genetikai eltérést nem mutatnak, akkor annak a valószínűsége, hogy a második gyermek beteg lesz 1%, ha a szülők egyike alléldefektust hordoz, ez az arány 6%-ra nő.¹⁴

Bilaterális retinoblastomás eseteinken vizsgáltuk a FISH diagnosztikus értékét. Sajnos nem minden esetben volt tumorból vett sejtmintánk (más intézményben végezték az enucleatiokat), így összesen csak hét daganatból vett sejteket tudtunk vizsgálni. Ezek közül négy esetben sikerült FISH-el deléciót kimutatni. A négy deléciót mutató tumoros betegnél a perifériás lymphocyták egy esetben mutattak allélvesztést, ennél a betegnél a sűrűn végzett kontrollvizsgálatok lehetővé tették a második szemben jelentkező daganat igen korai diagnózisát és kezelését. A szülők lymphocytáinál egy esetben sem találtunk eltérést.

Féloldali retinoblastomás betegeink közül a tumorban egy kivétellel mindkét allél elvesztését kimutattuk. Egy esetben csak egy deléciót találtunk a tumorban, de ebben az esetben a perifériás lymphocytákban is ugyancsak egy allél jelölődött. Felmerült annak a lehetősége is, hogy a tumor olyan területéről vettünk sejteket, ahol nem retinalis elemek, hanem esetleg lymphocyták, ill. egyéb sejtek voltak többségben, és/vagy a hibridizációs hiba lehetősége sem volt elvethető. A tumorból (a korábbi mintavétel helyének megfelelő területéről) készített metszeteken az NSE-, ill. a retinoblastoma-protein kimutatását célzó vizsgálat ezt nem valószínűsítette. A hibridizációs hiba lehetőségét egészen egyidejű hibridizálással – zártuk ki. A FISH-el nem detektálható deléció kimutatására PCR-vizsgálatot végeztünk.

Statisztikai kimutatások szerint a retinoblastoma előfordulása 1:14000–1:28000-hez gyakoriságú, tehát ritka daganat, amely mintegy 40%-ban öröklődő, azaz a tumor megjelenése elég nagy valószínűséggel a beteg utódaiban is várható. A további, nem öröklődő 60%-ban a daganat megjelenési valószínűsége az utódokban az átlagpopulációval közel megegyező. A daganat penetranciája mintegy 90%-os. A sporadikus esetek elkülönítése az öröklődő forma első jelentkezésétől nem könnyű, hiszen egyik esetben sincs családi előzmény. Ezek a családi előzmény nélküli, de öröklődő formák az összes előzmény nélküli retinoblastomák mintegy 20%-át adják.¹¹ Az ilyen esetekben az érintett családok genetikai vizsgálata adhat választ arra, hogy melyik formáról van szó.

Következtetés: Retinoblastomadaganatok egyes eseteiben viszonylag gyorsan, a családtagoktól vett vérmintából, FISH-vizsgálattal nyújthatunk genetikai tanácsadást az érintett családoknak. Ehhez azonban szükség van az eltávolított tumor frissen vett sejtjeire is, annak eldöntésére, hogy

a 13q14 gén területére lokalizálódó genetikai defektus milyen természetű. Ezért az enucleációt végző intézetnek gondoskodnia kell az eltávolított szemben levő daganat molekuláris genetikai feldolgozásáról. Ha ez nem lehetséges, a beteget megfelelő intézménybe kell küldeni, ahol az enucleált szemben levő daganatból a molekuláris genetikai vizsgálatok elvégzésére is lehetőség van.

Irodalom

1. Abramson D.H., Ellsworth R.M., Kitchin F.D., Tung G.: Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors: Are they radiation induced? *Ophthalmology* 91, 1351-1355 (1984).
2. Balázs M., Matsumura K., Moore D., Pinkel D., Gray J.W., Waldman F.M.: Karyotypic heterogeneity and its relation to labeling index in interphase breast tumor cells. *Cytometry* 20, 62-73 (1995).
3. Balázs M., Mayall B.H., Waldman F.M.: Interphase cytogenetics of a male breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 55, 243-247 (1991).
4. Balmer A., Gaillioud C.: Retinoblastoma: Diagnosis and treatment. In *Developments in Ophthalmol* 7, 36-100 (1983).
5. Berta A., Kolozsvári L., Rigó Gy., Damjanovich J., Alberth B.: Intraocularis tumorok Ruthenium irradiációjával szerzett tapasztalataink. *Szemészet* 128, 16-18 (1991).
6. Damjanovich J., Ádány R., Berta A., Beck Z. and Balázs M.: Mutation of the RB1 gene caused unilateral retinoblastoma in early age. *Cancer Genet. Cytogenet* 119, 1-7 (2000).
7. Damjanovich J., Berta A., Kolozsvári L.: Ruthenium 106 b-sugárzó izotóppal gyógyított kétoldali retinoblastomák. *Szemészet* 132, 89-92 (1995).
8. Dryja T.P., Cavenee W.K., White R., Rapaport J.M., Petersen R., Albert D.M., Bruns G.A.: Homozygosity of chromosome 13 in retinoblastoma. *N Engl J Med* 310, 550-553 (1984).
9. Hogg A., Bia B., Onadim Z., Cowell J.K.: Molecular mechanism of oncogenic mutations in tumors from patients with bilateral and unilateral retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 90, 7351-7355 (1993).
10. Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Waldman F.M., Chen L.C., Yu L.C., Fung Y.K., Smith H.S., Pinkel D., Gray J.W.: Detection of retinoblastoma gene copy number in metaphase chromosomes and interphase nuclei by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 60, 190-193 (1992).
11. Knudson A.G.: Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci* 90, 10914-10921 (1993).
12. Knudson A.G.: Retinoblastoma a prototypic hereditary neoplasm. *Semin Oncol* 5, 57 (1978).
13. Liu Z., Song Y., Bia B., Cowell J.K.: Germline mutations in the RB1 gene in patients with hereditary retinoblastoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 14, 277-284 (1995).
14. Lohmann D.R., Gerick M., Brandt B., Oelschlager U., Lorenz B., Passarge E., Horshemke B.: Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am. J. Hum. Genet* 61, 282-294 (1997).
15. McGee T.L., Yandell D.W., Dryja T.P.: Structure and partial genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Gene* 80, 119-128 (1989).
16. Pinkel D., Straume T., Gray J.W.: Cytogenetic analysis using quantitative high sensitive fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 83, 2934-2938 (1986).
17. Vogel F.: Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet* 52, 1-54 (1979).
18. Xu K.P., Liu S.L., Ni C.: Immunohistochemical evidence of neuronal and glial differentiation in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*. 79, 771-776 (1995).

A szerző levelezési címe: Dr. Damjanovich Judit
DE OEC, Szemészeti Klinika
4012 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.