

процессы в городских популяциях Украины в 90-х годах. Брачная структура донецкой популяции // Генетика. – 2000. – Т.36, №1. – С.93-99.

Резюме

В работе поднята проблема генеалогической культуры и сложностей сбора генетического материала у современных жителей Украины. Показана сложность применения понятия национальности для генетических целей. В методологическом аспекте высказаны рекомендации по оценке численности выборки для классических генетических исследований.

В роботі піднята проблема генеалогічної культури та складностей при збиранні генетичного матеріалу у сучасних мешканців України. Показана складність використання поняття національності для генетичних цілей. В методологічному аспекті виказані рекомендації з оцінки чисельності вибірки для класичних генетичних досліджень.

In the paper the problem of genealogical culture and genetic material collection difficulties in contemporary Ukrainian inhabitants are raised. Complexity of applying nationality notion for genetic purposes is shown. In a methodological aspect recommendations on sample number evaluation for classical genetic research are given.

ЦАО ЮЙ, АТРАМЕНТОВА Л.А.

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина,
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы,4, e-mail:wshkoda23@rambler.ru*

ПОТЕРЯ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ ГЕНА *FHIT* КАК ФАКТОР РИСКА РАКА ПИЩЕВОДА

Заболееваемость раком пищевода в мире в среднем составляет 3-5 на 100 тыс. населения. Китайская провинция Хебэй по распространенности рака пищевода стоит на первом месте – 133 больных на 100 тыс. населения, а в уезде Цийсян этой провинции 244, а в отдельных местах 1004 больных на 100 тыс. населения [1, 15]. Эпидемиологические, популяционные и семейные исследования показали высокую наследуемость рака пищевода в этом регионе [16]. Оценки параметров модели главного гена предполагает наличие в системе генетического контроля этого заболевания главного гена с сильным эффектом [17]. В настоящее время уже известно много генов, имеющих отношение к канцерогенезу, среди них ген *FHIT*, описанный в 1996 г.[9]. Ген расположен в локусе 3p14.2, содержит 10 экзонов [9, 14]. В клетках различных злокачественных опухолей человека экспрессия гена *FHIT* снижена, выявлены его аномальные варианты, вызванные в основном делециями [3, 4, 6, 8, 9, 11] Унаследованная рецессивная мутация гена супрессора опухоли присутствует в гетерозиготном состоянии во всех соматических клетках организма и функционирует как ген наследственной предрасположенности к раку. Если в одной из гетерозиготных клеток происходит мутация второго аллельного гена, клетка утрачивает гетерозиготность (loss of heterozygosity – LOH), становится гомозиготной и даёт начало раковой опухоли [2]. Изложенное послужило основанием для исследования делеции гена *FHIT* у больных раком пищевода из провинции Хебэй в Китае.

Материалы и методы

Сбор материала и молекулярно-генетический анализ выполнены в Институте онкологии провинции Хебэй (Китай). Изучены опухолевые и гомологичные

нормальные ткани 22 больных раком пищевода (17 мужчин и 5 женщин) в возрасте 50-79 лет. ДНК выделена с помощью протеинкиназы К методом фенол-хлороформной экстракции [5]. Для маркирования гена *FHIT* использованы внутригенные микросателлиты (*D3S1540*, расположенный рядом с 5 экзоном, и *D3S1234*, находящийся рядом с 8 экзоном), которые были амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции с последующим электрофорезом. Статистический анализ проведён точным методом Фишера, проверку нулевых гипотез проводили на уровне значимости не менее 0,05 для двустороннего критерия. Расчёты выполнены в программе Excel.

Результаты и обсуждение

О наличии гомозиготной делеции свидетельствуют электрофореграммы ДНК. Отсутствие полосы указывает на гомозиготность клеток по делеции, а присутствие полосы свидетельствует о том, что в клетке имеется вариант нормальной ДНК. На электрофореграмме раковой ткани (образец Т2) полоска отсутствует, а в нормальной ткани того же больного (образец N2) она имеется (рис.1). На присутствие гомозиготной делеции свидетельствует также пониженная интенсивность окрашивания полосы. В образце Т4 (опухолевая ткань) полоска окрашена слабее по сравнению с образцом N4 (нормальная ткань). На рис. 2 в образцах Т1, Т2 и Т3 полоса на электрофореграмме ДНК из опухолевой ткани окрашена слабее, чем на электрофореграмме ДНК из гомологичных здоровых тканей (N1, N2 и N3). В образцах N10 и T10 полосы окрашены одинаково интенсивно, что указывает на отсутствие гомозиготной делеции в клетках раковой и нормальной тканей.

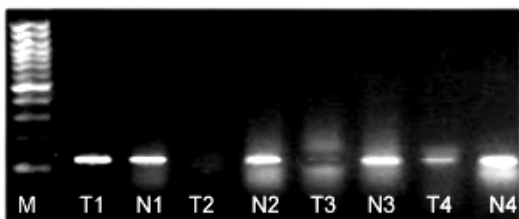


Рис. 1.

Электрофореграмма, выявляющая гомозиготную делецию с помощью маркера *D3s1234* в области 8 экзона. (М – 100-1500 бп стандартный молекулярный маркер, Т – раковая ткань, N – нормальная ткань)

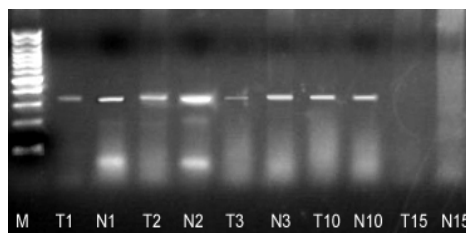


Рис. 2.

Электрофореграмма, выявляющая гомозиготную делецию с помощью маркера *D3s1540* в области 5 экзона. (М – 100-1500 бп стандартный молекулярный маркер, Т – раковая ткань, N – нормальная ткань)

Данный метод не позволяет различить нормальную гомозиготу (+/+) и гетерозиготу (+/-) по делеции, так как в обоих случаях на электрофореграмме присутствует искомая полоска и лишь её отсутствие указывает на генотип -/-.

Если в клетках здоровой ткани имеется один нормальный аллель (+/), то генотип -/- клеток раковой ткани этого же пациента следует рассматривать как результат одной мутации (+/-) → (-/-). Если генотип здоровой ткани гомозиготный (+/+), то переход в состояние -/- является результатом двух мутаций в одной клетке. Частота генных мутаций, как известно, составляет 10^{-5} – 10^{-7} . Это даёт основание считать, что две одинаковых мутации в одной клетке – событие для группы в 22 человека маловероятное (10^{-10} – 10^{-14}). Поэтому пациентов, у которых клетки здоровой ткани имели нормальный аллель, а клетки раковой ткани имели генотип -/-, с высокой вероятностью можно считать гетерозиготными (+/-), а сами эти случаи можно рассматривать как потерю гетерозиготности (LOH).

У пяти пациентов клетки здоровой ткани были гомозиготными по делеции в 5 экзоне. У четырёх из них гомозиготны были и клетки опухолевой ткани, а у одного опухолевая ткань имела нормальный аллель. (Мы не исключаем, что этот случай

является методической ошибкой, иначе следует признать наличие обратной мутации – восстановление гетерозиготности). У 10 пациентов в опухолевой ткани имелась гомозиготная делеция. Эти случаи рассматриваем как потерю гетерозиготности, вследствие которой развилась опухоль. У семи пациентов в нормальной и опухолевой ткани был выявлен нормальный аллель. Эти пациенты могли быть как нормальными гомозиготами (+/+), так и гетерозиготами (+/-).

Клетки здоровой ткани только одного пациента были гомозиготны по делеции в 8 экзоне (у этого же пациента гомозиготной была и раковая ткань), а у остальных 21 в клетках здоровой ткани обнаружен нормальный аллель. 12 пациентов с высокой вероятностью были гетерозиготными. Это заключение мы делаем на том основании, что в опухолевой ткани этих пациентов произошла потеря гетерозиготности – их клетки были гомозиготны по делеции. Генотип 9 пациентов по этому сайту точно не определён, так как и в клетках их здоровой и опухолевой ткани выявлен нормальный аллель.

В общем у 16 пациентов из 22 в опухолевой ткани имеется гомозиготная делеция в области 5 или 8 экзона, причём у 6 из них имеется две гомозиготных делеции – в обоих экзонах. Статистический анализ показал статистически значимую ($p < 0,01$) связь рака пищевода с делецией в гене *FHIT*.

Вследствие делеции ген *FHIT* становится неактивным и теряет свойство быть супрессором опухоли [7, 10, 12, 13]. Делеции и гена *FHIT* выявляются уже на ранних стадиях заболевания, и потому могут использоваться для ранней диагностики рака. У пяти пациентов в раковой ткани не выявлена гомозиготная делеция в изученных районах гена. У этих пациентов могут быть повреждены другие участки гена *FHIT*, либо заболевание вызвано у них иной генетической причиной.

Дальнейшие исследования гена *FHIT* помогут приблизиться к пониманию механизмов канцерогенеза и обнаружить мишени для эффективного терапевтического воздействия.

Авторы выражают благодарность директору Института онкологии Баоэн Шан за содействие в проведении исследования и научному сотруднику Лиджень Вей за помощь в подборе методик.

Литература

1. *CHINA CANCER DATABASE* / Ministry of health P. R. China, Ministry of science & technology P. R. China — (2000 ~) — web: <http://WWW.CANCERNET.CICAMS.AS.CN>
2. *Cavanee W.K., Dryja T.P., Phillips R.A., et al.* Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma // *Nature*. – 1983. – Vol. 305 – P. 779–784.
3. *Claudio S, Antonella B, Simonetta O, et al.* The FHIT gene is expressed in pancreatic Ductular cells and is altered in pancreatic cancers [J]. // *Cancer Res* — 1999—vol. 59, № 6—P. 1308-1314.
4. *Huping C, Kristjansdottir S, Bergthorsson JT, et al.* High frequency of LOH, MSI and abnormal expression of FHIT in gastric cancer. // *Eur J Cancer* — 2002— vol.38, № 5 — P.728~735.
5. *Joe Sambrook and David Russell.* Isolation of high-molecular weight DNA from mammalian cell using proteinase K and phenol // *Molecular Cloning. A Laboratory Manual Third Edition.* – Cold Spring Harbor Laboratory Press – 2001 – P. 542–555
6. *Kitamura A, Yashima K, Okamoto E, et al.* Reduced FHIT expression occurs in the early stage of esophageal tumorigenesis: no correlation with p53 expression and apoptosis[J]. // *Oncology*—2001—vol.61, № 3— P. 205-211.
7. *Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, et al.* Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR, beta, RASSF1A and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma // *Cancer Res.* — 2003. — vol. 63, № 13. — P. 3724-3728.
8. *Li P, Li DT.* Study on the correlation between FHIT gene and the development of

- esophageal carcinoma // CHIN J. Cancer RREV Treat. — 2005. — vol. 12, № 21. — P. 1669-1672.
9. Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, et al. The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers // Cell. — 1996. — vol. 84, № 4. — P. 587-597.
 10. Shimada Y, Sato F, Watanabe G, et al. Loss of *fragile histidine triad gene* expression is associated with progression of esophageal squamous cell carcinoma, but not with the patient's prognosis and smoking history // Cancer. — 2000 — vol. 89, № 1. — P. 5-11.
 11. Sozzi G, Pastotino U, Moiraghi L, et al. Loss of *FHIT* function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions [J]. // Cancer Res — 1998 — vol. 58, № 22 — P. 5032
 12. Yang Q, Nakamura M, Nakamura Y, et. al. Two-hit inactivation of *FHIT* by loss of heterozygosity and hypermethylation in breast cancer // Clin. Cancer Res. — 2002 — vol. 8, № 9. — P. 2890-2893.
 13. Zheng S., He ZG, Wang SB. *FHIT* genes and tumor // Foreign Medical Sciences (Pathophysiology and Clinical Medicine). — 1999. — vol. 19, № 6. — P. 417-420.
 14. Zimonjic D.B., Druck T., Ohta M., Kastury K., Croce C.M., Popescu N.C., and Huebner K. Positions of chromosome 3p14.2 fragile sites (FRA3B) within the *FHIT* gene. // Cancer Res. — 1997. — Vol. 57, № 6 — P. 166-1170.
 15. Wu Min, Sun Kaixian. Oncological genetics — Beijing: science — 2004 — P. 870.
 16. Генетико-эпидемиологическое исследование рака пищевода в Китае. // вестник харьковского национального университета — 2006 — vol. 729, № 3 — P. 141-146.
 17. Сегрегационный и компонентный анализ рака пищевода в провинции Хебэй. // вестник харьковского национального университета - 2006 — vol. 748, № 4 — P. 87-91.

Резюме

С помощью внутригенных микросателлитов *D3S1540* и *D3S1234* выявляли делеции в области 5 и 8 экзонов гена *FHIT* у 22 больных раком пищевода. У 16 пациентов в опухолевой ткани имеется гомозиготная делеция в области 5 или 8 экзона, причём у 6 из них имеется гомозиготные делеции в обоих экзонах. Статистический анализ показал статистически значимую ($p < 0,01$) связь рака пищевода с делецией в гене *FHIT*.

За допомогою внутрігенних мікросателітів *D3S1540* і *D3S1234* визначали делеції в області 5 і 8 екзонів гену *FHIT* у 22 хворих на рак стравоходу. У 16 пацієнтів в пухлинній тканині присутня гомозиготна делеція в області 5 або 8 екзона, причому у 6 з них гомозиготні делеції присутні в обох екзонах. Статистичний аналіз показав значущий ($p < 0,01$) зв'язок раку стравохода з делецією в гені *FHIT*.

Study deletion exons 5 and 8 of *FHIT* gene in 22 cases of ESCC was evaluated by intragenic microsatellites *D3S1540* and *D3S1234*. In 16 ESCC tissues have homozygous deletion in exons 5 or 8, and in 6 cases have two deletions, as it happens, there is a deletion in both of the exons. Statistical analysis shows, that there is a connection between ESCC and deletions of *FHIT* gene ($p < 0.01$).

ЧЕРЕДНИК Ю. О.¹, ЖЕРЕБКО Н. М.², СТРИЖ В. О.¹, АНОПРИЄНКО О. В.³, ГОРОВЕНКО Н. Г.⁴, КОСТРОМІНА В. П.¹

¹Інститут фтизіатрії й пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України, вул. М. Амосова, 10, м. Київ, 03680, Україна.

²"ІнтерЛабСервіс-Україна", вул. М. Амосова, 5, Київ, 03038, Україна.

³Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, м.