

Д.Г. ЯРМОЛИНСКИЙ¹, Н.А. КАРТЕЛЬ¹, Г. ЕРМАК²,
Ю.Е. ДЕМИДЧИК³, ДЖ. ФИГГЕ⁴

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларусь, Минск

²University of Southern California,
Andres Gerontology Center, California, USA,

³Минский государственный медицинский университет, Беларусь,

⁴The Cancer Care Center, New York, USA

ИЗУЧЕНИЕ ЧАСТОТ МИНИСАТЕЛЛИТА *HRas1* СРЕДИ ДЕТЕЙ С ПАПИЛЛЯРНЫМ РАКОМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ



«Редкие» аллели минисателлита гена *HRas1* являются хорошо известным фактором предрасположенности к онкологическим заболеваниям. Нами были изучены частоты минисателлита *HRas1* среди пациентов с папиллярным раком щитовидной железы, повышенная частота которого наблюдается после аварии на Чернобыльской АЭС. *HRas1* минисателлит был генотипирован у 32 пациентов, прооперированных по поводу папиллярного рака щитовидной железы в 1996–2001 гг., и в контрольной группе из 75 человек, которые проживали на территории Республики Беларусь. Из 64 аллелей, выявленных у пациентов, 14 оказались «редкими» (21,9 %), в контрольной группе было обнаружено 17 «редких» аллелей (11,3 %) из 150. Увеличенная частота «редких» аллелей в группе пациентов достоверна статистически ($p < 0,01$). Мы предполагаем, что «редкие» аллели минисателлита *HRas1* связаны с более высоким риском образования рака щитовидной железы у детей и подростков после аварии на Чернобыльской АЭС.

© Д.Г. ЯРМОЛИНСКИЙ, Н.А. КАРТЕЛЬ, Г. ЕРМАК,
Ю.Е. ДЕМИДЧИК, ДЖ. ФИГГЕ, 2004

Введение. Одним из наиболее важных в медико-биологическом отношении последствий аварии на Чернобыльской АЭС (ЧАЭС) является возросшая частота папиллярного рака щитовидной железы среди детей и подростков. Для указанного заболевания считается установленной связь с радиационным поражением, так как до 90-х годов на территории Республики Беларусь у детей отмечали только единичные случаи папиллярных карцином щитовидной железы; через четыре года после аварии на Чернобыльской АЭС специалистами было отмечено резкое увеличение частоты рака щитовидной железы у детей и подростков, проживавших на загрязненных радионуклидами территориях.

Считается, что щитовидная железа эффективно аккумулировала радиоактивный йод, выброс которого наблюдался в первые дни и недели после повреждения реактора. Это привело к острому внутреннему облучению данного органа и развитию онкологической патологии [1].

Известно, что в развитии значительной части папиллярных карцином щитовидной железы, возникновение которых связывают с аварией на ЧАЭС, участвуют хромосомные перестройки *Ret/PTC1* и *Ret/PTC3* [2]. Однако, по всей вероятности, это не единственная причина развития таких неоплазий, существуют множество других неизвестных факторов, которые оказывают влияние на развитие заболевания.

Ген *HRas1*, который был картирован в локусе 11p15.5, кодирует хорошо изученный на данный момент мембранный белок, участвующий в передаче митогенных сигналов через мембрану. Известно, что с этим геном тесно сцеплен минисателлит, расположенный на расстоянии приблизительно одной тысячи пар оснований от сайта полигенирования. Звеном данного минисателлита является последовательность из 28 пар оснований, которая повторяется от 30 до 100 раз. Описаны четыре основных аллельных варианта минисателлита, которые по своим частотам в сумме представляют в популяциях приблизительно 90–94 % всех аллелей. Кроме того, обнаружено свыше десяти так называемых «редких» аллелей, на долю которых приходится 6–10 % аллелей популяции. Считается, что «редкие» аллели возникают в результате мейотических рекомбинаций [3].

Было показано, что в области минисателлита гена *HRas1* связываются некоторые тран-

скрипционные факторы семейства *rel/NF-kB*, регулирующие активность гена *HRas1*. Также отмечалось, что длина минисателлита гена *HRas1* влияет на эффективность связывания данных транскрипционных факторов, причем «редкие» аллели показывают более высокую аффинность [4, 5].

Минисателлит, который тесно сцеплен с геном *HRas1*, рассматривается как один из генетических факторов предрасположенности к онкологическим заболеваниям. Имеется множество данных, свидетельствующих о связи между риском развития онкологического заболевания и наличием в геноме пациента «редкого» аллеля минисателлита гена *HRas1*. Такая корреляция показана для злокачественных опухолей молочной железы, мочевого пузыря, легких, кишечника, яичников, для неходжкинской лимфомы и других онкологических заболеваний [3, 6–10].

Целью нашей работы являлось изучение частот аллелей минисателлита гена *HRas1* среди пациентов, прооперированных по поводу папиллярного рака щитовидной железы. Также предполагалось изучить контрольную группу индивидуумов, проживавших на территории Республики Беларусь.

Материалы и методы. Препараты тканей папиллярных опухолей щитовидной железы, а также информация о диагнозе и характеристиках пациентов были получены из Республиканского научно-практического центра опухолей щитовидной железы (Минск, Республика Беларусь). Образцы были заморожены сразу после операции и в дальнейшем хранились при -70°C . ДНК была выделена при помощи реагента Trizol (GibcoBRL) согласно методике производителя. Препараты ДНК, выделенные из крови людей, которые проживали на территории Республики Беларусь, были любезно предоставлены И.С. Цибовским из Института криминалистики, криминологии и судебной экспертизы (Минск, Республика Беларусь).

Полимеразная цепная реакция проводилась в 30 мкл смеси следующего состава: 100 нг геномной ДНК, 20 мМ трис-НCl (рН 9,5 при 25°C), 5 мМ сульфат аммония, 1,2 мМ хлорида магния, 0,4 мКМ каждого из праймеров *HRas1* и *HRas2*, 200 мКМ каждого из нуклеотидов, 5 % диметилсульфоксида, 2 % тритона X100, 12 % сахарозы,

0,5 ед. Таq-полимеразы. Последовательности использованных праймеров были следующими: *HRas1* — GAGCTAGCAGGGCATGCCGC, *HRas2* — AGCACCGGTGTGGAAGGAGCC. Амплификацию проводили по программе, которая включала денатурацию в течение 3 мин при 96°C , десять циклов, состоящих из денатурации при 95°C в течение 20 с, отжига при 63°C 1 мин и элонгации при 68°C 4 мин. Последующие 20 циклов амплификации в качестве дополнения включали в себя удлинение элонгации на 10 с на каждый цикл.

Продукты амплификации разделяли в длинном 3%-ном полиакриламидном геле (39 : 1) в трис-формиатном буфере в течение 20 ч. Для детекции фрагментов ДНК использовали окраску нитратом серебра.

На основании того, что в популяции преобладают четыре основных аллеля, после предварительного скрининга были отобраны две гетерозиготы, несущие аллели a1/a3 и a2/a4. Смесь амплифицированных аллелей a1–a4 носили на гель через каждые четыре дорожки для того, чтобы избежать артефактов, связанных с искривлением дорожек геля.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel 2000 и Statistica 6.0.

Результаты исследований. Все обследованные пациенты были прооперированы по поводу папиллярного рака щитовидной железы в Республиканском научно-практическом центре опухолей щитовидной железы (Минск, Республика Беларусь) в 1996, 1998 и 2001 гг. В момент аварии на ЧАЭС все они проживали на территории Республики Беларусь, в областях, которые подверглись загрязнению радиоактивным йодом в 1986 г. В возрасте до 10 лет находились 20 пациентов, 9 пациентов — от 10 до 20 лет и 2 пациента родились после аварии. Учитывая эпидемиологические данные, свидетельствующие о низкой частоте папиллярного рака щитовидной железы в данной когорте пациентов до 1986 г., можно заключить, что большая часть исследованных случаев заболевания связана с аварией на ЧАЭС.

На рис. 1 показано, что подобранные нами условия полимеразной цепной реакции позволяют амплифицировать все типы аллелей минисателлита гена *HRas1*. На электрофорограмме

Изучение частот минисателлита *HRas1*...

представлены аллели a1–a4 и редкие аллели, которые отличаются длиной от «общих» аллелей.

Проведение электрофореза в низкопроцентном длинном полиакриламидном геле в течение ночи позволяет получать высокое разрешение крупных фрагментов ДНК, что необходимо для определения «редких» аллелей, находящихся в области a1–a4 аллелей и отличающихся на одно звено минисателлита. На рис. 2 в качестве примеров приведены электрофорограммы обнаруженных редких аллелей минисателлита гена *HRas1*.

Результаты генотипирования минисателлита гена *HRas1* в контрольной группе и среди изученных нами пациентов с папиллярным раком щитовидной железы представлены в табл. 1. Частоты основных аллелей минисателлита гена *HRas1* среди пациентов и здоровых людей не отличались. Однако частота «редких» аллелей среди пациентов с раком щитовидной железы, возникновение которого связано с аварией на ЧАЭС, приблизительно в два раза выше, чем в контрольной популяции. Различия подтверждены статистически с помощью критерия χ^2 . Процент носителей «редких» аллелей среди пациентов приблизительно в два раза выше, чем среди здоровых людей.

Распределение комбинаций аллелей в генотипах соответствует закону Харди-Вайнберга как в когорте изученных пациентов, так и в контрольной группе. Маленький объем выборки не позволяет установить статистически достоверные корреляции между наличием «редких» аллелей минисателлита *HRas1* и клиническими характеристиками пациентов.

Обсуждение полученных данных. Изучение частот аллелей минисателлита гена *HRas1* по-

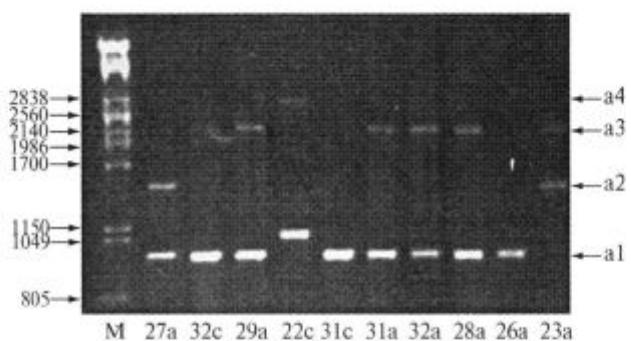


Рис. 1. Продукты амплификации минисателлита гена *HRas1*. Слева указаны размеры фрагментов маркера (M), с правой стороны — аллели a1–a4. На рисунке видны «основные» аллели всех четырех типов. В образце 22с виден редкий аллель

казалось, что среди пациентов, прооперированных по поводу папиллярного рака щитовидной железы в Республиканском научно-практическом центре опухолей щитовидной железы в 1996–2001 гг., частота «редких» аллелей выше, чем среди людей, отобранных случайно из белорусской популяции.

В настоящее время является доказанной связь между риском развития ряда онкологических патологий и наличием в геноме пациентов редкого аллеля минисателлита гена *HRas1*. В табл. 2 представлены некоторые данные об изучении полиморфизма минисателлита гена *HRas1* среди пациентов с различными онкологическими патологиями. Krontiris et al. [3] провели метаанализ результатов генотипирования минисателлита гена *HRas1* в 23 исследованиях и показали, что наличие «редких» аллелей минисателлита *HRas1* является фактором риска для наиболее частых видов неоплазий. Большинством авторов отмечено приблизи-

Таблица 1
Частота встречаемости аллелей минисателлита *HRas1* среди пациентов с папиллярным раком щитовидной железы и среди индивидуумов без онкологии

Показатель	Исследовано аллелей	Обнаруженные частоты аллелей минисателлита гена <i>HRas1</i>				
		a1	a2	a3	a4	«редкие»
Пациенты	64	42 (65,6 %)	4 (6,3 %)	2 (3,1 %)	2 (3,1 %)	14 (21,9 %)
Контрольная группа	150	105 (70,0 %)	12 (8,0 %)	13 (8,7 %)	3 (2,0 %)	17 (11,3 %)
Оценка различий по критерию χ^2		0,583 (P > 0,05)	0,266 (P > 0,05)	2,483 (P > 0,05)	0,413 (P > 0,05)	7,078 (P < 0,01)

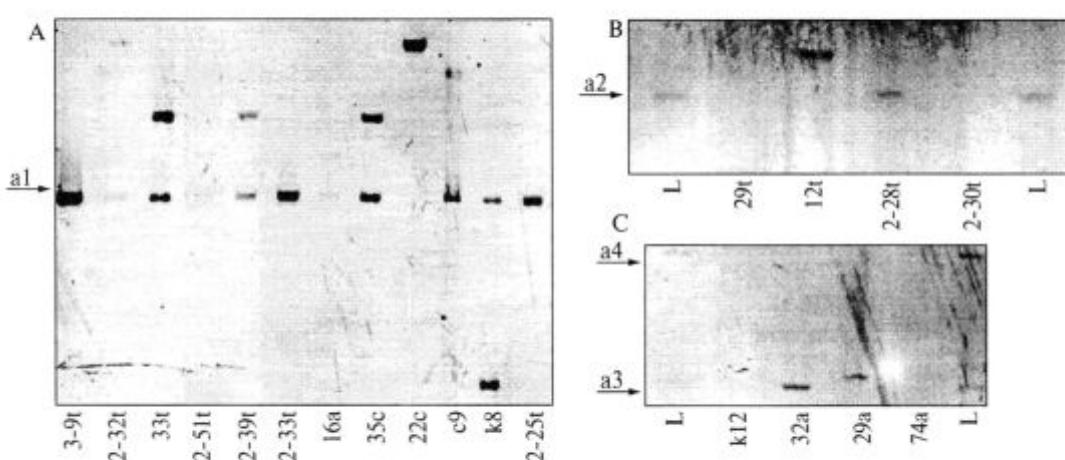


Рис. 2. Электрофорограммы аллелей минисателлита *HRas1*, разделенных в полиакриламидном геле: А — аллели а1 и близкие «редкие» аллели, В — аллели области а2, С — аллели а3 и а4. Стрелками отмечены аллели а1—а4. L — смесь аллелей а1—а4, которые были получены при амплификации аллелей двух гетерозигот и использовались как маркер

тельно двукратное увеличение частоты «редких» аллелей минисателлита гена *HRas1* среди заболевших раком людей в сравнении с контрольной группой. В нашей работе, посвященной изучению папиллярного рака щитовидной железы, развитие которого связано с аварией на ЧАЭС, мы наблюдали аналогичные различия.

Несмотря на большое число работ, посвященных изучению папиллярного рака щитовидной железы, остаются невыясненными точные механизмы развития этого заболевания. В частности, мало известно о генетических факторах предрасположенности к такому виду патологии. Приблизительно 5 % всех случаев папиллярного рака щитовидной железы имеют

семейную историю. С использованием микросателлитных маркеров было показано, что на хромосоме 21 находится локус, связанный с развитием этого заболевания [11]. Было также показано, что с предрасположенностью к папиллярному раку щитовидной железы связаны некоторые точечные мутации в гене *c-ret* [12, 13]. Мутации этого же гена являются основной причиной развития как спорадического, так и семейного медуллярного рака щитовидной железы [14]. Также картирован ген TCO, который находится в локусе 19p13.2 и является фактором предрасположенности к немедуллярному раку щитовидной железы с клеточной окси菲尔ей [15].

Таблица 2
Частоты аллелей минисателлита *HRas1*, %, среди пациентов с онкологической патологией и среди здоровых индивидуумов, полученные разными авторами

Вид аллеля минисателлита <i>HRas1</i>	[3] (различные онкологические патологии)		[10] (рак яичников)		[9] (немелкоклеточный рак легкого)		Наша работа (рак щитовидной железы, связанный с аварией на ЧАЭС)	
	Пациенты (n = 737)	Контроль (n = 652)	Пациенты (n = 270)	Контроль (n = 216)	Пациенты (n = 466)	Контроль (n = 892)	Пациенты (n = 64)	Контроль (n = 150)
a1	60	62	50	61	70,6	73,2	65,6	70,0
a2	11	12	14	11	8,2	10,3	6,3	8,0
a3	10	11	7	9	1,7	2,0	3,1	8,7
a4	7	9	7	6	0,6	1,5	3,1	2,0
«Редкие» аллели	12	6	22	13	18,9	13,0	21,9	11,3

Примечание n — количество изученных аллелей минисателлита *HRas1*.

Наши данные позволяют заключить, что наличие в геноме пациентов «редких» аллелей минисателлита *HRas1* является также фактором риска развития папиллярного рака щитовидной железы под воздействием радиации. Таким образом, этот тип онкологического заболевания, как и другие, связан с нарушением экспрессииprotoонкогена *HRas1*. Следует отметить, что при спорадических формах папиллярного рака щитовидной железы с высокой частотой обнаружаются мутации в онкогенах семейства c-Ras, что считается одной из частых причин развития данного заболевания [16]. Точечные мутации в онкогене c-ras в опухолях педиатрического папиллярного рака щитовидной железы, связанного с аварией на ЧАЭС, обнаружены не были [17].

Полученные нами результаты могут оказаться важными для оценки риска онкологических заболеваний щитовидной железы при проведении лучевой терапии в области шеи.

SUMMARY. The «rare» alleles of *HRas1* gene minisatellite are well-known factor of predisposition to many kinds of cancer. We have studied *HRas1* minisatellite frequencies among patients with papillary thyroid cancer which is related to consequences of Chernobyl accident. The *HRas1* minisatellite was analysed in 32 patients who suffered from papillary carcinoma and underwent operation in 1996–2001 and in 75 Belorussian residents. Of 64 *HRas1* alleles revealed in patients 14 were defined as «rare» (21,9 %); in the control group we have detected 17 «rare» alleles (11,3 %) of the examined 150 alleles. The higher frequency of «rare» *HRas1* minisatellite alleles in patient group was statistically significant ($p < 0,01$). We can suppose that the «rare» alleles of *HRas1* minisatellite are associated with increased risk of papillary thyroid cancer formation in children and adolescents after Chernobyl accident.

РЕЗЮМЕ. Рідкі алелі мінісателіта гена *Hras1* є добре відомим фактором схильності до онкологічних захворювань. Нами були досліджені частоти мінісателіта *Hras1* серед пацієнтів з папілярним раком щитовидної залози, збільшена частота спостерігалася після аварії на Чорнобильській АЕС. *Hras1* мінісателіт був генотипований у 32 пацієнтів, прооперованих з приводу капілярного рака щитовидної залози у 1996–2001 рр., і в контрольній групі з 75 людей, що проживали на території Республіки Білорусь. З 64 алелів, знайдених у пацієнтів, 14 виявилися «рідкими» (21,9 %), в контрольній групі було виявлено 17 «рідких» алелів (11,3 %) із 150. Збільшена частота «рідких» алелів в групі пацієнтів статистично вірогідна ($p < 0,01$). Вважаємо, що «рідкі» алелі мінісателіта *Hras1* пов’язані з більш

високим ризиком виникнення рака щитовидної залози у дітей та підлітків після аварії на Чорнобильській АЕС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Демидчик Е.П., Цыб А.Ф., Лушников Е.Ф. и др. Рак щитовидной железы у детей (последствия аварии на Чернобыльской АЭС). — М.: Медицина, 1996. — 208 с.
- Писарчик А.В., Ярмолинский Д.Г., Демидчик Ю.Е., Ермак Г.З., Картель Н.А., Фигге Дж. Перестройки ret/PTC1 и ret/PTC3rl в клетках рака щитовидной железы, возникшие у жителей Белоруссии в период после аварии на ЧАЭС // Генетика. — 2000. — **36**, № 7. — С. 959–964.
- Krontiris T.G., Devlin B., Karp D.D., Robert N.J., Risch N. An association between the risk of cancer and mutations in the *HRAS1* minisatellite locus // N. Engl. J. Med. — 1993. — **329**. — P. 517–23.
- Green M., Krontiris T.G. Allelic variation of reporter gene activation by the *HRAS1* minisatellite // Genomics. — 1993. — **17**. — P. 429–434.
- Trepicchio W.L., Krontiris T.G. Members of the rel/NF-kappa B family of transcriptional regulatory proteins bind the *HRAS1* minisatellite DNA sequence // Nucl. Acids Res. — 1992. — **20**. — P. 2427–2434.
- Van Gils C.H., Conway K., Li Y., Taylor J.A. *HRAS1* variable number of tandem repeats polymorphism and risk of bladder cancer // Int. J. Cancer. — 2002. — **100**. — P. 414–418.
- Гаспарьян А.В., Сельчук В.Ю., Якубовская М.Г., Зборовская И.Б., Татосян А.Г. Рестрикционный полиморфизм protoонкогена с-Ha-ras-1 у пациентов с первично-множественными злокачественными новообразованиями и немелкоклеточным раком легкого // Генетика. — 1997. — **33**. — С. 96–100.
- Vega A., Barros F., Lleonart M.E., Ramony C.S., Carracedo A. *HRAS1* minisatellite alleles in colorectal carcinoma: relationship to microsatellite instability // Anticancer Res. — 2001. — **21**. — P. 2855–2860.
- Rosell R., Calvo R., Sanchez J.J., Maurel J., Guillot M., Monzo M., Nunez L., Barnadas A. Genetic susceptibility associated with rare *HRAS1* variable number of tandem repeats alleles in Spanish non-small cell lung cancer patients // Clin. Cancer Res. — 1999. — **5**. — P. 1849–1854.
- Weitzel J.N., Ding S., Larson G.P., Nelson R.A., Goodman A., Grendys E.C., Ball H.G., Krontiris T.G. The *HRAS1* minisatellite locus and risk of ovarian cancer // Cancer Res. — 2000. — **60**. — P. 259–261.
- McKay J.D., Lesueur F., Jonard L., Pastore A., Williamson J., Hoffman L., Burgess J., Duffield A., Papotti M., Stark M., Sobol H., Maes B., Murat A., Kaariainen H., Bertholon-Gregoire M., Zini M., Rossing M.A., Toubert M.E., Bonichon F., Cavarec M., Bernard A.M., Boneu A., Leprat F., Haas O., Lasset C., Schlumberger M., Canzian F., Goldgar D.E., Romeo G. Localization of a susceptibility gene for familial nonmedullary thyroid

- carcinoma to chromosome 2q21 // Amer. J. Hum. Genet. — 2001. — **69**. — P. 440–446.
12. Lesueur F., Corbex M., McKay J.D., Lima J., Soares P., Griseri P., Burgess J., Ceccherini I., Landolfi S., Papotti M., Amorim A., Goldgar D.E., Romeo G. Specific haplotypes of the RET proto-oncogene are overrepresented in patients with sporadic papillary thyroid carcinoma // J. Med. Genet. — 2002. — **39**. — P. 260–265.
13. Rey J.M., Brouillet J.P., Fonteneau-Allaire J., Boneu A., Bastie D., Maudelonde T., Pujol P. Novel germline RET mutation segregating with papillary thyroid carcinomas // Genes Chromosomes Cancer. — 2001. — **32**. — P. 390–391.
14. Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer // J. Clin. Oncol. — 1999. — **17**. — P. 380–93.
15. Canzian F., Amati P., Harach H.R., Kraimps J.L., Lesueur F., Barbier J., Levillain P., Romeo G., Bonneau D. A gene predisposing to familial thyroid tumors with cell oxyphilia maps to chromosome 19p13.2 // Amer. J. Hum. Genet. — 1998. — **63**. — P. 1743–1748.
16. Suarez H.G., du Villard J.A., Severino M., Caillou B., Schlumberger M., Tubiana M., Parmentier C., Monier R. Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors // Oncogene. — 1990. — **5**. — P. 565–570.
17. Santoro M., Thomas G.A., Vecchio G., Williams G.H., Fusco A., Chiappetta G., Pozharskaya V., Bogdanova T.I., Demidchik E.P., Cherstvoy E.D., Voscoboinik L., Tronko N.D., Carsi A., Bunnell H., Tonnachera M., Parma J., Dumont J.E., Keller G., Hofler H., Williams E.D. Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancers // Brit. J. Cancer. — 2000. — **82**. — P. 315–22.

Поступила 07.04.03