

# АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ SOD1 В SOD2 У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КАБАРДИНО-БАЛКАРИИ

## ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF ANTIOXIDANT PROTECTION GENES SOD1 В SOD2 IN PATIENTS WITH BREAST CANCER IN KABARDINO-BALKARIA

**M. Bittueva  
A. Dzamikhova**

*Summary.* Excess formation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of the antioxidant system of the cell lead to the development of various pathological conditions of the body, including malignant neoplasms. Increased production of reactive oxygen species in cancer cells as a result of oncogenic signaling and metabolic disorders leads to increased cellular antioxidant capacity to maintain ROS levels below the toxic threshold.

The main components of antioxidant protection are the enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GP), glutathione transferase (GSTM, GSTP), etc. Superoxide dismutase is found in all aerobic organisms and is present in two types — SOD1 and SOD2. Superoxide dismutase is involved in the protection of cells from the damaging effects of the superoxide anion radical and is the main component of the cell's antioxidant system.

In this work, we studied the role of polymorphic variants of the antioxidant protection genes SOD1 (G7958A) and SOD2 (Ala16Val) in the development of malignant neoplasms in patients with breast cancer in the population of Kabardino-Balkaria. Also, the purpose of our study is to analyze scientific data on the participation of SOD1 and SOD2 gene products in the development of oncopathologies in different population groups.

The study of the antioxidant system in cancer cells is also an urgent task, since one of the important areas of oncology is the development of an anticancer strategy that combines the use of drugs that cause high levels of ROS with compounds that suppress the cellular antioxidant capacity.

*Keywords:* antioxidant system, reactive oxygen species, superoxide dismutase, Cu/Zn-SOD1, Mn-SOD2, gene polymorphism.

**Биттуева Мадина Мухаматовна**  
Кандидат биологических наук, Кабардино-Балкарский Государственный университет  
им. Х.М. Бербекова, г. Нальчик  
madbi@mail.ru

**Дзамихова Альбина Заурбиевна**  
Кабардино-Балкарский Государственный университет им. Х.М. Бербекова, г. Нальчик  
Khazhirokova.alya@mail.ru

*Аннотация.* Избыточное образование активных форм кислорода (АФК) и нарушение антиоксидантной системы клетки ведут к развитию различных патологических состояний организма, в том числе, и к злокачественным новообразованиям. Повышенная продукция активных форм кислорода в раковых клетках в результате онкогенной передачи сигналов и метаболических нарушений приводит к усилению клеточной антиоксидантной способности поддерживать уровни АФК ниже токсического порога.

Главными компонентами антиоксидантной защиты являются ферменты каталаза (CAT), супероксиддисмутаза (SOD), глутатионпероксидаза (GP), глутатионтрансфераза (GSTM, GSTP) и др. Супероксиддисмутаза обнаружена во всех аэробных организмах, и представлена в двух типах — SOD1 и SOD2. Супероксиддисмутаза участвует в защите клетки от повреждающего действия супероксидного анион-радикала и является главным компонентом антиоксидантной системы клетки.

В данной работе изучена роль полиморфных вариантов генов антиоксидантной защиты SOD1 (G7958A) и SOD2 (Ala16Val) в развитии злокачественных новообразований у больных раком молочной железы в популяции Кабардино-Балкарии. Также целью нашего исследования является анализ научных данных об участии продуктов генов SOD1 и SOD2 в развитии онкопатологий в разных популяционных группах.

Изучение антиоксидантной системы в раковых клетках также является актуальной задачей, так как одно из важных направлений онкологии — развитие противораковой стратегии, сочетающей применение препаратов, вызывающие высокие уровни АФК с соединениями, которые подавляют клеточную антиоксидантную способность.

*Ключевые слова:* антиоксидантная система, активные формы кислорода, супероксиддисмутаза, Cu/Zn-SOD1, Mn-SOD2, полиморфизм генов.

Введение

Установлено, что раковые клетки характеризуются повышенным уровнем активных форм кислорода (АФК), которые продуцируются в основном митохондриями. АФК образуется в норме в ходе реакций окислительного фосфорилирования, в процессе клеточного метаболизма. Избыточная продукция активных форм кислорода в опухолевых клетках необходима для клеточной пролиферации и роста. Также установлено участие АФК в регулировании сигнальных механизмов нормальной физиологической реакции. В зависимости от концентрации уровня АФК они могут играть разную роль в развитии рака: низкие концентрации вызывают распространение клеточного сигнала, высокие дозы активизируют процессы апоптоза.

Эволюция аэробного дыхания митохондриями увеличила роль супероксиддисмутаз в регуляции нормальной работы клетки. Главными компонентами антиоксидантной защиты являются ферменты каталаза (CAT), супероксиддисмутаза (SOD), глутатионпероксидаза (GP), глутатионтрансферазы (GSTM, GSTP) и др [1,2]. Любое изменение в работе данных ферментов может привести к возникновению оксидативного стресса и накоплению в клетке свободных радикалов, которые вызывают повреждение мембран клетки, органелл и тканей, что в свою очередь ведет к развитию воспалительного процесса. При этом повышается частота возникновения мутаций, так как в результате действия свободных радикалов, вступающих в химическую реакцию с ДНК, происходит образование ДНК-аддуктов, аналогов оснований, и/или другие нарушения ее структуры. Мутации, возникшие в соматических клетках, могут привести в процессе канцерогенеза к развитию спорадических форм рака. Мутации, возникшие в половых клетках, передаются по наследству, что может привести к появлению наследственных форм опухолей.

Постоянная генерация АФК во время нормально-клеточного метаболизма обычно сбалансирована утилизацией их антиоксидантной системой. Дисбаланс между производством АФК и антиоксидантной защитой приводит к повышению уровня АФК, вызывая окислительный стресс, что приводит к появлению злокачественности. Активными формами кислорода называют молекулы или ионы, образованные неполным одноэлектронным восстановлением — это супероксиды, пероксиды, гидроксильный радикал, синглетный кислород, которые вызывают различные сбои в работе клетки, в том числе нарушая передачу сигнала и экспрессию генов, что может приводить к неконтролируемой пролиферации.

Одним из ключевых ферментов антиоксидантной системы организма является фермент супероксиддисмутаза Cu/Zn (SOD1). Белок, кодируемый геном SOD1, связывает ионы меди и цинка и является одним из двух изоферментов, ответственных за разрушение свободных супероксидных радикалов в организме. Кодируемый изофермент представляет собой растворимый цитоплазматический белок, действующий как гомодимер для превращения встречающихся в природе, но вредных супероксидных радикалов в молекулярный кислород и перекись водорода. Другой изофермент представляет собой митохондриальный белок. Кроме того, этот белок содержит антимикробный пептид, проявляющий антибактериальную и противогрибковую активность [3].

Ген SOD2 (MnSOD) является членом семейства железо/марганцевой супероксиддисмутазы. Он кодирует митохондриальный белок, который образует гомотетрамер и связывает один ион марганца на субъединицу. Этот белок связывается с супероксидными побочными продуктами окислительного фосфорилирования и превращает их в перекись водорода и двухатомный кислород. Дисмутаза SOD2 локализуется в матриксе. Мутации в этом гене связаны с идиопатической кардиомиопатией, преждевременным старением, спорадическими заболеваниями двигательных нейронов и раком [4,5,6].

Важной задачей стоящей перед онкологией, является изучение механизмов работы антиоксидантной системы. В перспективе науки использование молекул Cu/Z-SOD1 и Mn-SOD2 в форме генной терапии, либо синтез молекул, имитирующих активность супероксиддисмутазы, для контроля уровня АФК ниже токсичного порога.

К настоящему времени накоплено много информации, указывающих на роль полиморфизма генов антиоксидантной защиты в развитии злокачественных новообразований. Как известно, наличие этнических особенностей влияет на характер получаемых результатов в силу эффекта основателя (founder-мутации), что подчеркивает важность проводимых популяционных исследований в этой области.

Цель исследования

В данной работе изучена роль полиморфных вариантов генов антиоксидантной защиты SOD1 (G7958A) и SOD2 (Ala16Val) в развитии рака молочной железы в популяции Кабардино-Балкарии. Также целью нашего исследования является анализ научных данных об участии продуктов генов SOD1 и SOD2 в развитии онкопатологий в разных популяционных группах.

Таблица 1. Праймеры, используемые для генотипирования.

Однонуклеотидные полиморфизмы		Праймеры
rs4998557	Forward	5'-CGGTGTGGTGTGGATGTTGTG-3'
	Reverse	5'-GCCCCAGGAGAGGACTGATT-3'
	SF	5'-TTTTTTTTTTTTTCCATTACCTGAATGGCTATACTGCTT-3'
rs4880	Forward	5'-CGGGCTGTGCTTTCTCGTCTT-3'
	Reverse	5'-GCCAACGCCTCCTGGTACTTC-3'
	SR	5'-TTTTGGAGCCCAGATACCCCAAA-3'

\* SF — Single-base extension forward SR — Single-base extension reverse.

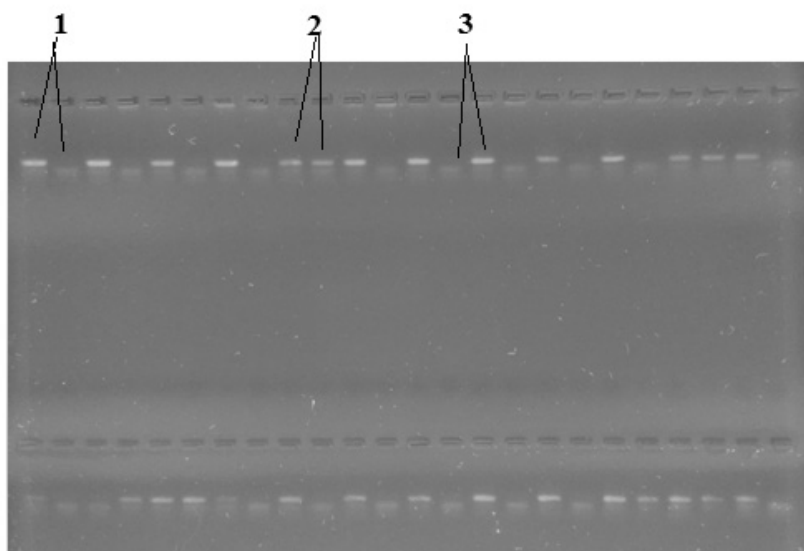


Рис. 1. Электрофореграмма анализа Ala16Val полиморфизма гена SOD2 у больных раком молочной железы. 1- генотип Ala/Ala, 2-Ala/Val, 3- Val/Val

## Материалы и методы

Полиморфизмы генов супероксиддисмутазы меди-цинка (SOD1, CuZn-SOD)-G7958A (rs4998557) и супероксиддисмутазы марганца (SOD2, Mn-SOD)-Val16Ala (rs4880) были генотипированы с помощью аллель-специфичной полимеразной цепной реакции у 75 женщин с диагнозом рак молочной железы и 50 человек здоровой контрольной группы.

Для анализа полиморфных вариантов изучаемых генов SOD1 и SOD2 была использована периферическая кровь участниц эксперимента, собранная на базе ГБУЗ «Онкологический диспансер» МЗ КБР. Для выделения ДНК использовались наборы Diatom DNA Preb 100

(ООО «Изоген»), а также экстракцию ДНК проводили с помощью набора реагентов «QIAamp DNA Blood Mini Kit» (производитель — фирма «Qiagen», Германия). Аллельные варианты (табл. 1) изучались методом полимеразной цепной реакции, с последующей детекцией продуктов в электрофорезном геле (рис. 1). В контрольной и опытной группе были исследованы три этнические группы, проживающие в Кабардино-Балкарии (кабардинцы, балкарцы и русские).

## Результаты исследования и обсуждение

Данные генотипирования полиморфного варианта G7958A гена SOD1 представлены в таблице 2.

Таблица 2. Частоты генотипов по полиморфизму G7958A гена SOD1 в популяционных выборках больных РМЖ и здоровых лиц.

Группа	Генотип	Частота% — (абс. цифры)
Больные РМЖ	GG	82,6% (62 чел.)
	GA	14,6% (11 чел.)
	AA	2,6% (2 чел.)
Здоровые	GG	86,0% (43 чел.)
	GA	12,0% (6 чел.)
	AA	2,0% (1 чел.)

Таблица 3. Частоты генотипов по полиморфизму Ala16Val гена SOD2 в популяционных выборках больных РМЖ и здоровых лиц.

Группа	Генотип	Частота% — (абс. цифры)
Больные РМЖ	Ala/Ala	29,3% — (22 чел.)
	Ala/Val	33,3% — (25 чел.)
	Val/Val	37,3% — (28 чел.)
Здоровые	Ala/Ala	58,0% (29 чел.)
	Ala/Val	22,0% (11 чел.)
	Val/Val	20,0% (10 чел.)

В опытной группе были выявлены частоты анализируемых генотипов. Так гетерозиготных носителей мутантного аллеля А (GA) — 14,6% (11 человек), частота генотипа GG — 82,6% (62 человека), частота гомозиготного мутантного аллеля AA — 2,6% (2 человека). По данным таблицы были рассчитаны частоты аллелей (согласно распределению Харди-Вайенберга) и было установлено, что частота аллеля G — 90%, частота аллеля A — 10%

В контрольной группе частота генотипа GG — 86,0% (43 человека), гетерозиготного генотипа GA 12% (6 человек) и гомозиготного мутантного генотипа AA — 2,0% (1 человек).

Таким образом можно отметить, что частота гетерозиготного фенотипа GA чаще встречалась в группе больных РМЖ (14,6%), в то время как в контрольной группе преобладали гомозиготные варианты аллеля дикого типа GG (86,0%).

Согласно литературным данным полиморфизмы супероксиддисмутазы меди-цинка (SOD1, CuZn-SOD)-

G7958A (rs4998557) и супероксиддисмутазы марганца (SOD2, Mn-SOD)-Val16Ala (rs4880) были изучены в работе Jian-Feng Yi и др у больных с раком желудка и доказана их взаимосвязь с развитием злокачественных новообразований [6].

Также аллель G7958A гена SOD1 была изучена у людей с рожистым воспалением и стрептококковой инфекцией и было установлено, что наличие аллелей SOD1 — G7958, SOD2 — T2734 и CAT C262 было связано с предрасположенностью к данному заболеванию [7]. Аллели G и A SOD1 G7958A по отдельности были связаны с локализацией инфекции в нижних конечностях и верхних частях тела соответственно.

В таблице 3 представлены данные генотипирования по полиморфному варианту гена SOD2 Ala16Val.

Анализ частот аллелей показал, что в гене SOD2 у больных раком молочной железы преобладает генотип Val/Val — 37,3%. Генотип Ala/Val — 33,3%. Меньше всего распространенность генотипа Ala/Ala — 29,3%

(табл. 3). По данным таблицы, можно отметить, что в опытной группе частота аллеля Ala — 52%, частота аллеля Val — 58%

В контрольной группе преобладал генотип Ala/Ala — 58,0%, далее Ala/Val — 22,0%, и гомозиготный генотип Val/Val — 20,0%. Гомозиготный генотип дико-го типа Ala/Ala среди контрольной группы встречался чаще всего (58,0%).

Таким образом можно отметить, что распространенность мутантного гетерозиготного генотипа (Ala/Val) и гомозиготного мутантного генотипа (Val/Val) в опытной группе значительно выше, чем среди контрольной группы. В наших исследованиях отмечена повышенная частота генотипа Val/Val (37,3%) в опытной группе в сравнении с другими анализируемыми генотипами.

Установлено, что при замене аминокислоты аланин на валин (к чему приводит однонуклеотидная замена цитозина на тимин) снижается функциональная активность белка SOD2, так как меняется его местоположение в митохондриях, повреждается участок, отвечающий за связывание с митохондрией и дальнейшей транспортировки фермента в митохондриальный матрикс [8]. Функциональный полиморфизм, при котором происходит замена аминокислот изменяет конформацию белковой молекулы. В результате мутации активность фермента снижается на 30–40% по сравнению с нормальным неповрежденным белком.

Анализируя литературные данные, было установлено что, среди жительниц Чеченской популяции в группе больных с раком молочной железы преобладали гетерозиготные носители Ala/Val — 54,37%, генотип Ala/Ala — 16,99%, генотип Val/Val — 28,64%. Однако данные различия носили статистически недостоверный характер [9]

Было проведено сравнение частот встречаемости аллелей генотипов гена SOD2 Ala16Val в европейской и монголоидной популяциях, среди здоровых лиц [10]. В данной работе установлено что аллель Ala встречается на 15% чаще среди европейской популяции, чем в монголоидной. Также обнаружено, что генотип Ala/Ala на 20% был чаще отмечен у европейцев, тогда как

для монголоидной популяции характерно преобладание на 10% генотипов Ala/Val и Val/Val.

Таким образом, полученные частоты генотипов для полиморфных вариантов изученных генов в настоящей работе близки к значениям в других европейской популяциях для всех этнических групп.

## Заключение

Супероксиддисмутаза (SOD) играет важную роль в антиоксидантной защите клетки от свободных радикалов. Существуют две основные формы фермента — Cu/Zn — SOD1, так называемая медно-цинковая супероксиддисмутаза, локализованная преимущественно в цитоплазме и межмембранном пространстве митохондрий, и Mn — SOD2 марганцевая супероксиддисмутаза, локализована преимущественно в матриксе митохондрий. Антиоксидантная защита клетки обеспечивает снижение уровня активных форм кислорода, которые образуются в процессе метаболизма и нормальных физиологических процессов. При изменении активности ферментов антиоксидантной защиты происходит повышение уровня АФК, вызывая окислительный стресс в клетке. Структура и функция белков системы антиоксидантной защиты может быть изменена в результате генетического полиморфизма, приводящего к появлению мутантных генотипов.

Согласно литературным данным чаще всего изучены полиморфизмы G7958A гена SOD1 и Ala16Val гена SOD2, которые также доказано связаны с развитием злокачественных новообразований.

В наших исследованиях были изучены данные полиморфизмы у жительниц Кабардино-Балкарской республики с заболеванием рак молочной железы. Были установлены повышенные частоты носительства мутантных генотипов в опытной группе, в сравнении с контрольной группой, что указывает на их взаимосвязь с развитием злокачественных новообразований. Изучение полного спектра полиморфизма генов антиоксидантной системы, включая также фермент каталазу (CAT) будет продолжена на популяции Кабардино-Балкарии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Trist B.G., Hilton J.B. Hare D.J. Crouch P.J. et al. Superoxide Dismutase 1 in Health and Disease: How a Frontline Antioxidant Becomes Neurotoxic. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2021. vol.60 no. 17. P. 9215–9246.
2. Даурова Л.В., Биттуева М.М., Боготова З.И., Джамбетова П.М., Паритов А.Ю., Гидова Э.М., Хандохов Т.Х., Ситников М.Н. Изменчивость в гене GSTP1 у больных раком молочной железы в Кабардино-Балкарии. //Современные проблемы науки и образования. 2016. № .6, URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25831> (01.11.2022).
3. Papa L., Manfredi G., Germain D. SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy. *Genes Cancer.* 2014. vol. 5 no. (1–2). P. 15–21.

4. Han L., Suk S.W., Yoon J.H., Park Y.G., et al., [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Choi+YJ&cauthor\\_id=23030347](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Choi+YJ&cauthor_id=23030347) Association of SOD1 and SOD2 single nucleotide polymorphisms with susceptibility to gastric cancer in a Korean population. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica scandinavica* (Denmark). 2013. vol. 121. no.3. P. 246–256.
5. Li-Feng Zhang, Kai Xu, Bo-Wen Tang, Wei Zhang, Wei Yuan, Chuang Yue, Li Shi, Yuan-Yuan Mi, Li Zuo, Li-Jie Zhu. Association between SOD2 V16A variant and urological cancer risk. *Aging* (Albany NY). 2020. vol. 12. no.1. P. 825–843.
6. Jian-Feng Yi 1, Yu-Min Li, Tao Liu, Wen-Ting He, Xun Li, Wen-Ce Zhou, Shi-Liang Kang, Xiang-Ting Zeng, Jun-Qiang Zhang. Mn-SOD and CuZn-SOD polymorphisms and interactions with risk factors in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2010. vol. 16. no. 37. P. 4738–4746.
7. Emene C.C., Kravchenko I.E., Aibatova G.I., Rizvanov A.A. Analysis of Serum Cytokines and Single-Nucleotide Polymorphisms of SOD1, SOD2, and CAT in Erysipelas Patients. *J Immunol Res*. 2017. vol.3. P. 1–14.
8. Miar A., Hevia D., Muñoz-Cimadevilla H., Astudillo A., Velasco J., Sainz R.M., Mayo J.C. Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. *Free Radic. Biol. Med*. 2015. vol. 85. P. 45–55.
9. Бисултанова З.И., Ацаева М.М., Джамбетова П.М. Роль полиморфных вариантов SOD2, GSTT1, GSTM1 и GSTP1 в развитии рака молочной железы у женщин чеченской популяции // Вестник Самарского университета. Естественная серия. 2016. № 1–2. С. 85–90.
10. Колесникова Л.И., Баирова Т.А., Первушина О.А. Распространенность полиморфизма ALA16VAL гена SOD2 в выборках монголоидов и европеоидов, проживающих на территории Восточной Сибири // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2014. № 2(96). С. 29–31.

© Биттуева Мадина Мухаматовна ( madbi@mail.ru ), Дзамихова Альбина Заурбиевна ( Khazhirova.alya@mail.ru ).  
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»

