

ВЛИЯНИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ЛИЦ С ЭНДЕМИЧЕСКИМ ЗОБОМ

© Сапарбаева Лариса Массовна (а), Джамалова Айшат Зеудыевна (b)

(а) Комплексный научно-исследовательский институт им. Ибрагимова Российской академии наук, Российская Федерация, г. Грозный; lara.saparbayeva.93@bk.ru

(b) Комплексный научно-исследовательский институт им.Ибрагимова Российской академии наук, Российская Федерация, г. Грозный; dzhamalovam@list.ru

Аннотация. В работе представлены данные анализа распределения генотипов по полиморфным вариантам генов оксидативного стресса и его влияние на выраженность процессов деструкции ядра при нарушении работы щитовидной железы.

Ключевые слово: оксидативный стресс, генетическая предрасположенность, полиморфизм, щитовидная железа, молекулярно-генетический анализ, полиморфные маркеры, аллельные формы генов.

INFLUENCE OF OXIDATIVE STRESS ON THE CYTOGENETIC STATUS OF PERSONS WITH ENDEMIC GOITER

© Saparbayeva Larisa Maasovna (a), Jamalova Aishat Zeudyevna (b)

(a) Kh. Ibragimov Complex Institute of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation, Grozny; lara.saparbayeva.93@bk.ru

(b) Kh. Ibragimov Complex Institute of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation, Grozny; dzhamalovam@list.ru

Abstract. The paper presents the data of the analysis of the distribution of genotypes for polymorphic variants of genes of oxidative stress and its influence on the severity of the processes of destruction of the nucleus in violation of the thyroid gland.

Key words: oxidative stress, genetic predisposition, polymorphism, thyroid gland, molecular genetic analysis, polymorphic markers, allelic forms of genes.

Введение. Основным подходом в изучении генетической предрасположенности к определенной патологии является методика использования полиморфных маркеров, сцепленных с различными генами-кандидатами.

Наследование эндемического зоба необходимо изучать с учетом социально-бытовых, санитарных условий, физической активностью, потреблением алкоголя. [3].

О роли полиморфных маркеров генов — кандидатов в развитии эндемического зоба имеется незначительное количество проведенных исследований. На популяционном же уровне подобные исследования не проводились, что определяет актуальность данного исследования.

В основном генетические полиморфные маркеры не являются собственно этиологическими вариантами, которые определяют предрасположенность к заболеванию, но часто они находятся в неравновесии по сцеплению с этими вариантами.

Необходимо проанализировать распределение генотипов по полиморфным вариантам генов *SOD1* и *SOD2*, и изучить их функциональную роль.

В организме SOD представлена тремя изоформами, различающимися ионами металлов [Zn²⁺], [Cu²⁺] и [Fe²⁺], входящими в состав их активных центров: *SOD 1 CuZn-[SOD]* находится в цитоплазме, *SOD 2 [Mn-SOD]* – в митохондрии. [1; 5].

Ген *SOD1* человека расположен на длинном плече 21-й хромосомы и регулирует выработку фермента супероксиддисмутаза 1 [2]. Наиболее изучен полиморфный вариант *G7958A (rs4998557)* гена *SOD1*, при котором происходит замена гуанина на аргинин в 7958 последовательности нуклеотида. [4;10].

Следующим геном, отвечающим за эффективность антиоксидантной защиты организма, является *SOD2*, изменчивость в структуре которого влияет на количество и активность вырабатываемой клетками супероксиддисмутаза 2 [1; 7].

Наиболее полно исследован данный полиморфный вариант *SOD2* в генезе онкологических заболеваний, нейродегенеративных состояний, обусловленных повреждающим действием на клетки оксидативного стресса. Недавно изучена роль полиморфизма *SOD2* в развитии ранних репродуктивных потерь, установлено, что носительство супружеской парой аллельного варианта *CC* ассоциировано с повышенным риском неразвивающейся беременности в первом триместре [8; 9; 11].

Материал и методы

В данной статье представлены результаты, полученные при исследовании 34 добровольцев с эндемическим зобом из разных районов Чеченской Республики, исследование проведено на базе ЦКП.

Для молекулярно-генетического анализа полиморфных вариантов генов оксидативного стресса были использованы образцы геномной ДНК, выделенной из цельной крови и из клеток буккального эпителия у женщин с эндемическим зобом. Анализ выполняли в три этапа:

На первом этапе осуществляли экстракцию ДНК микрометодом по общепринятому протоколу. Для контроля концентрации выделенной ДНК нами был проведен количественный анализ с помощью флуориметра Qubit 3.0. Концентрация ДНК варьировала в диапазоне от 8 нг/мкл до 21 нг/мкл.

С образцами выделенной ДНК параллельно проводились две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Результаты анализа позволяли дать три типа заключения: гомозигота по аллели 1; гетерозигота; гомозигота по аллели 2.

На втором этапе осуществляли подготовку смеси для амплификации по стандартной программе амплификации.

Третий этап - детекция продуктов амплификации: разделение продуктов амплификации проводили в 3% агарозном геле, методом горизонтального электрофореза, в качестве красителя вносили 1% раствор этидия

Фрагменты анализируемой ДНК проявлялись в виде светящихся оранжево-красных полос под УФ излучением с длиной волны 310 нм.

При интерпретации результатов важно было помнить о невозможности появления в данных анализах слабоположительных проб. Все полосы на электрофорезе должны были быть четкими и примерно одинаковой интенсивности (допускались только небольшие различия в яркости).

Таблица 1

Интерпретация результатов

Реакционная смесь Аллель 1	Реакционная смесь Аллель 2	Интерпретация результатов
+	-	гомозигота по аллели 1
+	+	Гетерозигота
-	+	гомозигота по аллели 2

После генетического анализа было проведено сравнение результатов полиморфизма с результатами кариологии. [6].

Результаты и обсуждение

Нами проведен молекулярно-генетический анализ генов оксидативного стресса с целью определения степени влияния полиморфизма генов антиоксидантной защиты на частоту выявляемых нарушений ядерного материала клеток.

Данные генотипирования полиморфных вариантов генов *SOD1* и *SOD2* приведены в таблице 2.

Таблица 2

Распределение генотипов полиморфным вариантам генов *SOD1 G7958A*, *SOD 2T58C* *SOD 2C60T* в зависимости от кариологических показателей

Гены	<i>SOD 1 G7958A</i>			<i>SOD 2T58C</i>			<i>SOD 2C60T</i>		
	GG %	GA %	AA %	TT %	TC %	CC %	CC %	CT %	TT %
ЭЗ	68,8	31,2	0	82,4	17,6	0	91,7	8,3	0
контроль	79,7	18,6	1,7	30	54	16,1	-	-	-

Результаты типирования аллельных форм изучаемых генов выявило только гетерозиготное носительство минорных аллелей по всем изученным полиморфизмам *G7958A*, *T58C*, *C60T*, генов *SOD1* и *SOD2*: *GA* 31,2; *TC* 17,6; *CT* 8,3

Нами проанализировано распределение генотипов по полиморфным вариантам *G7958A*, *T58C*, *C60T*, генов *SOD1* и *SOD2* в соответствии с кариологическими показателями. Данные представлены в таблицах 3, 4, 5

Таблица 3

Распределение генотипов полиморфизма варианта *G7958A* гена *SOD1* в зависимости от кариологических показателей

Показатели	м/я	Карио Лизис	Вакуоли Заця	2яд.	Карио Рексис	Насеч Ки	Карио Пикноз	Про Трузии	Апоп Тозные
Генотипы									
GG	0,2	62	64,8	1,6	0,3	6,2	68,4	0,5	0,2
GA	0	80,3	146,0	3,3	0	10,6	86,3	1,3	0,5
AA	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Из таблицы 3 следует, что частота показателей деструктивных изменений ядра у носителей минорного аллеля GA полиморфизма *G7958A* гена *SOD1* выше, по сравнению с индивидами несущих гомозиготный генотип по аллелю дикого типа. У гетерозигот показатели кариолизиса более чем в два раза выше, чем у гомозигот 80,3 против 62,0. Аналогичные результаты наблюдаются в показателях вакуолизации 146,0 против 64,8; насечки 10,6 против 6,2; кариопикноз 86,3 против 68,4; двойные ядра 3,3 против 1,6; апоптозные тела 3,3 против 1,6; и протрузии 1,3 против 0,5.

В целом, сравнительный анализ распределения частоты исследованных параметров нарушений структуры ядра показывают, что по всем показателям носительство минорного аллеля *7958A* гена *SOD1* увеличивает частоту нарушений.

Таблица 4

Распределение генотипов полиморфизма варианта *T58C* гена *SOD2* в зависимости от кариологических показателей

Показатели	м/я	Карио лизис	Вакуоли Заця	2яд.	Карио Рексис	Насеч Ки	Карио Пикноз	Про трузии	Апоп тозные тела
Генотипы									
ТТ	0,08	64,5	54,0	2,0	5,5	6,6	46,9	0,6	0,2
ТС	2,1	15,8	104,0	2,0	1,4	3,6	142	0,2	0,02
СС	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Данные таблицы 4 показывают, что частота показателей деструктивных изменений ядра у носителей минорного аллеля ТС полиморфизма *58C* гена *SOD2* по сравнению с индивидами несущих гомозиготный генотип по аллелю дикого типа сильно варьирует. У гетерозигот показатели начальной стадии апоптоза: кариопикноз, микроядера и вакуолизация, более чем в два раза чаще встречаются, чем у гомозигот: 142,0 против 46,9; 2,1 против 0,08; 104 против 54. Вероятно, носительство минорного аллеля *58C* усиливает процессы начальной стадии апоптоза, не влияя на них в последующем.

Таблица 5

Распределение генотипов полиморфизма варианта *C60T* гена *SOD2* в зависимости от кариологических показателей

Показатели	м/я	Кариолизис	Вакуолизация	2яд.	Кариорексис	Насечки	Кариопикноз	Протрузии	Апоптозные тела
Генотипы									
СС	0,059	92,2	68,9	2,6	0,7	8,3	99,1	0,8	0,3
СТ	0	4,6	1,9	0,05	0,05	0,2	4,4	0,05	0
ТТ	0	0	0	0	0	0	0	0	0

По данным таблицы 5 следует, что частота показателей деструктивных изменений ядра у носителей минорного аллеля *СТ* полиморфизма *60T* гена *SOD2* ниже, по сравнению с индивидами несущих гомозиготный генотип по аллелю дикого типа. У гетерозигот данные всех исследованных кариологических показателей ниже, чем у гомозигот (микроядра 0 против 0,059; кариолизис 4,6 против 92,2; вакуолизация 1,9 против 68,9; кариорексис 0,05 против 0,7; насечки 0,2 против 8,3; кариопикноз 4,4 против 99,1; протрузии 0,05 против 0,8; апоптозные тела 0 против 0,3). Таким образом, полиморфный вариант *C60T* гена *SOD2* не играет роли в деструктивных изменениях ядер клеток эпителиоцитов.

Заключение

Анализ распределения генотипов по полиморфным вариантам генов *SOD1* и *SOD2*, показал только гетерозиготное носительство минорных аллелей по всем изученным полиморфизмам *G7958A*, *T58C*, *C60T*, генов *SOD1* и *SOD2* отличаются более высокой частотой цитогенетических показателей, по сравнению с гомозиготами.

Частота цитогенетических нарушений, а именно: кариопикноз, кариолизис вакуолизация двойные ядра, протрузии и апоптозные тела выше у гетерозиготных носителей минорного аллеля *G7958A* гена *SOD1*. Полиморфизм *T58C* гена *SOD2* оказывает более сильный эффект в отношении цитогенетических показателей по сравнению с остальными изученными полиморфизмами. У гетерозиготных носителей аллеля *T58C SOD2* все параметры завышены по сравнению с носителями гомозиготного генотипа по аллелю дикого типа. Однако полиморфизм *C60T* гена *SOD2* общую картину кариологии не нарушает.

Таким образом, при сравнении результатов кариологического анализа мазков буккального эпителия взятого у пациентов с эндемическим зобом показали, окислительный стресс оказывает влияние на выраженность процессов деструкции ядра при нарушении работы щитовидной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аульченко Ю.С., Аксенович Т.П. Методологические подходы и стратегии картирования генов, контролирующих комплексные признаки человека // Вестник ВОГиС. 2006. № 10 (1). С. 189-202.

2. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э. Геном человека как научная основа предиктивной медицины. В кн.: Геномика медицине. / Ред. В.И. Иванова и Л.Л. Киселева. М.: 2005. 392 с.
3. Галкина Н. В., Трошина Е.Л., Мазурина Н.В. Генетические факторы в развитии диффузного эутиреоидного зоба. ФГУ "эндокринологический научный центр". 2008. Том 4. С. 49-55
4. Кравченко Л.В. Оценка антиоксидантной и антитоксической эффективности природных флавоноидов // Токсикологический вестник. 2005. № 1. С. 14-20.
5. Несяева Е.В. Неразвивающаяся беременность: этиология, патогенез, клиника, диагностика // Акушерство и гинекология. 2005. С. 3-7.
6. Сапарбаева Л.М., Джамалова А.З. Кариологическая оценка клеток буккального эпителия у лиц с заболеваниями щитовидной железы // Вестник Комплексного научно-исследовательского института им. Х.И. Ибрагимова РАН. 2020. № 4 (4). С. 123-127.
7. Хандогина Е.К., Рожкова З.Н., Хандогина А.В. Основы медицинской генетики. Учебное пособие. М.: 2004. 176 с.
8. Ходжаева Д.А., Лунина С.Н., Луценко Н.Н. Роль полиморфизма гена *SOD2* у женщин в генезе неразвивающейся беременности // Вестник РГМУ. 2011. № 2. С. 134-136.
9. Cindrova-Davies T., Hong-Wa Y. et al Oxidative stress, gene expression and protein changes induced in the human placenta during labor. Am. J. Pathol. 2007. № 171 (4). Pp. 1117-1168.
10. Mohammadi K., Maimaitiming S., Emery N., Bellili-Muñoz N., Roussel R., Fumeron F., Hadjadj S., Marre M., Velho G. Allelic variations in superoxide dismutase-1 (*SOD1*) gene are associated with increased risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetic subjects. Mol Genet Metab. 2011 Dec. № 104 (4). Pp. 654-60.
11. Mlakar S.J., Osredkar J., Prezelj J., Marc J. Antioxidant enzymes *GSR*, *SOD1*, *SOD2*, and *CAT* gene variants and bone mineral density values in postmenopausal women: a genetic association analysis. Menopause. 2012 Mar. № 19 (3). Pp. 368-76.

REFERENCES

1. Aulchenko Yu.S., Aksenovich T.P. Methodological approaches and strategies for mapping genes that control complex human traits // Bulletin of VOGiS. 2006. № 10 (1). Pp. 189-202.
2. Baranov V.C., Baranova E.V., Ivaschenko T.E. The human genome as a scientific basis for predictive medicine. In the book: Genomics to medicine. / Ed. in and. Ivanova and L.L. Kiseleva. Moscow: 2005. 392 p.
3. Galkina N.V., Troshina E.L., Mazurina N.V. Genetic factors in the development of diffuse euthyroid goiter. FGU "Endocrinological Research Center". 2008.Vol. 4.Pp. 49-55
4. Kravchenko L.V. Assessment of antioxidant and antitoxic effectiveness of natural flavonoids // Toxicological Bulletin. 2005. № 1. Pp. 14-20.
5. Nesyayeva E.V. Non-developing pregnancy: etiology, pathogenesis, clinical picture, diagnosis // Obstetrics and gynecology. 2005. Pp. 3-7.

6. Saparbayeva L.M., Dzhamalova A.Z. Karyological assessment of buccal epithelial cells in persons with thyroid diseases // Bulletin of the Complex Research Institute named after V.I. H.I. Ibragimov RAS. 2020. № 4 (4). Pp. 123-127.
7. Khandogina E.K., Rozhkova Z.N., Khandogina A.V. Fundamentals of Medical Genetics. Tutorial. Moscow: 2004.176 p.
8. Khodzhaeva D.A., Lunina S.N., Lutsenko N.H. The role of the SOD2 gene polymorphism in women in the genesis of non-developing pregnancy // Bulletin of the Russian State Medical University. 2011. № 2. Pp. 134-136.
9. Cindrova-Davies T., Hong-Wa Y. et al Oxidative stress, gene expression and protein changes induced in the human placenta during labor. Am. J. Pathol. 2007. № 171 (4). Pp. 1117-1168.
10. Mohammadi K., Maimaitiming S., Emery N., Bellili-Muñoz N., Roussel R., Fumeron F., Hadjadj S., Marre M., Velho G. Allelic variations in superoxide dismutase-1 (SOD1) gene are associated with increased risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetic subjects. Mol Genet Metab. 2011 Dec. № 104 (4). Pp. 654-60.
11. Mlakar S.J., Osredkar J., Prezelj J., Marc J. Antioxidant enzymes GSR, SOD1, SOD2, and CAT gene variants and bone mineral density values in postmenopausal women: a genetic association analysis. Menopause. 2012 Mar. № 19 (3). Pp. 368-76.