

ЭКОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ ПОЛИФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, С.И. Макарова, А.Ю. Гришанова

Государственное учреждение научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск, Россия, e-mail: lyakh@sogamn.ru

Основное внимание сосредоточено на полиморфизме генов, кодирующих белки метаболизма и транспорта чужеродных соединений. На литературных и собственных результатах показано, что данные признаки могут выступать в качестве генетических факторов риска полифакторных заболеваний. Рассмотрены эффекты индивидуальных генов, «ген–ген»- и «ген–среда»-взаимодействий. Будущие успехи экогенетических исследований полифакторных заболеваний авторы связывают с усилиями широкого круга специалистов.

Вслед за многими другими научными понятиями понятие «экогенетика» проникло в обиходное сознание еще до того, как было строго определено научной общественностью. В настоящее время еще не предложено его общепринятого определения. Часть исследователей считают, что экологическая генетика – это генетика популяций в природных условиях (Инге-Вечтомов, 1998; Nevo, 2001), и склонны относить к экогенетике любые биохимические взаимодействия – как между организмами (синэкологические, в том числе и биохимические отношения между паразитом и хозяином, или симбионтами), так и аутэкологические. Другие ограничивают экогенетику аутэкологическими отношениями – генетически обусловленными реакциями организма на факторы окружающей среды, в основном химические (Kalow, 1997; Пузырев, 1997; Ляхович, 2004). В этом понимании экогенетика есть фармакогенетика в широком смысле слова (Kalow, 1997), что вытекает из определения F. Vogel (1959) фармакогенетики как науки, исследующей роль генетики в лекарственном ответе. В данном определении слова «в лекарственном ответе» означают «в ответе на лекарственное воздействие». Основание для такого понимания дает то, что применение лекарств всегда хорошо учитывается, и поэтому природа воздействия и такие его параметры, как доза, частота, продолжительность, являются известными. «Воздействием» в экогенетике

является множество факторов окружающей среды, параметры воздействия менее охарактеризованы в сравнении с лекарственным. «Ответом», или «эффектом» в экогенетике в медицинском ее приложении в конечном итоге являются заболевания. Рабочей гипотезой экогенетики является предположение о том, что генетическая индивидуальность организма, порождая биохимическую индивидуальность, т. е. набор ферментов и белков в организме, определяет реакцию на любое внешнее воздействие (Пузырев, 1997). Из этой гипотезы естественным образом вытекают две задачи экогенетики в медицине: поиск факторов окружающей среды и условий их воздействия, способных вызвать заболевание у индивидуумов с соответствующей генетической конституцией, и выявление этой конституции, чувствительной к патогенным факторам.

История исследований причин различных заболеваний показывает, что эти задачи решались с помощью разных исследовательских подходов. Первый, генетический, захватывал редкие сильные аномальные ответы на обычные для подавляющей части популяции воздействия и с использованием близнецового метода и семейного анализа достаточно быстро показывал моногенный характер наследования. Во многих случаях находился дефектный белок. И сейчас на генетических картах хромосом человека обозначены локусы тех генов, мутации которых

лежат в основе подобных реакций, например, на хромосоме 3 – локусы постанестезической одышки, резистентности к тиреоидному гормону, непереносимости сахарозы. В рамках другого, клинико-эпидемиологического, подхода исследовались воздействия, эффекты которых были не столь быстрыми и сильными, и потому само наличие связи требовало доказательства. Эти доказательства связи получали в когортных исследованиях и исследованиях «случай–контроль». Методология классической эпидемиологии обеспечила идентификацию фактора риска, фиксируя связь между воздействием и заболеванием, и его количественную оценку. В таких работах доказано, что курение – фактор риска рака легкого, что рак легкого развивается у каждого десятого курильщика, и сила риска возрастает от дозы и длительности курения. Но эта методология не раскрывала последовательности событий от воздействия до развития заболевания. Для этого требовались лабораторные методы оценки, и клинико-эпидемиологические исследования постепенно трансформировались в молекулярно-эпидемиологические. Молекулярная эпидемиология сочетает методологию классической эпидемиологии с лабораторными оценками маркеров воздействия, или внутренней дозы (концентрации чужеродного соединения или его токсичного метаболита в биологических средах организма, маркеров эффекта, или биологически эффективной дозы (например изменение экспрессии гена) и маркеров индивидуальной предрасположенности (Stam, Binkova, 2000). Она способствовала раскрытию критических этапов в развитии заболеваний. Широкая межиндивидуальная вариабельность маркеров как воздействия, так и эффекта сделала очевидным наличие сложной наследственной составляющей распространенных заболеваний, которая не сводится к единственному локусу, а является полигенной.

Данные по структуре и эпидемиологии заболеваний показывают, что моногенные заболевания многочисленны (в настоящее время известно около 5 тысяч), но ими болеет незначительная часть населения, так как самые распространенные из них, такие, как муковисцидоз, фенилкетонурия, встречаются с частотами 1 на 2–10 тысяч новорожденных, а более редкие – 1 на 100–1000 тысяч (Горбунова, 1999). Большинство же людей

болеет немногочисленными полифакторными заболеваниями, такими, как сердечно-сосудистые (13–20 % общей заболеваемости среди взрослого населения и первое место по смертности) (Мезенцева, Кеббель, 2004), онкологические (250–400 случаев на 100 000 населения и второе место по смертности) (Аксель, 2002), атопические (30–50 % общей заболеваемости) (Кондюрина и др., 1998; Holgate, 1999). Из этого следует, что общественное здоровье преимущественно определяется именно этими заболеваниями и поэтому будет зависеть от экогенетических исследований в медицине, которые определяют прогресс в борьбе с ними.

1990-е годы ознаменовались обширными исследованиями генетических факторов предрасположенности к этим заболеваниям. Существенная часть исследований, особенно онкозаболеваний, была посвящена полиморфизму генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков (ФБК): *CYP1A1*, *CYP2D6*, *NAT2*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* и др. Это обусловлено, по нашему мнению, следующими причинами: 1) первые фармакогенетические примеры были получены именно для этой группы генов (ацетилирование изониазида, 4-гидроксилирование дебризохина и S-мефенитоина); 2) экспериментальные исследования свидетельствовали о возрастании токсичности многих ксенобиотиков в результате метаболизма; 3) накапливающиеся в молекулярно-эпидемиологических исследованиях факты указывали на роль этих ферментов на иницирующих этапах развития заболеваний; 4) высокой частотой многих полиморфизмов этих генов в популяциях.

Опыт десятилетних исследований связи полиморфизма генов ФБК с предрасположенностью к онкологическим заболеваниям показал, что имеет место противоречивость результатов разных авторов, и во многих исследованиях величины относительного риска для индивидуальных генов являются низкими, (это, впрочем, не принижало эпидемиологическое значение данного объекта исследований, поскольку высокие частоты встречаемости полиморфизмов обуславливали значительный атрибутивный риск). Гарт (Garte, 2001), анализируя итоги этого периода, сделал вывод о том, что противоречивость результатов во многом обусловлена ошибочной формулировкой во-

проса исследования: «является ли генетический вариант G*N фактором риска такого-то типа рака?» Правильной постановкой задачи таких исследований является формулировка: «для кого, если вообще для кого-нибудь, вариант G*N является фактором риска такого-то типа рака?», т. е. учет и выявление условий, поиск «суб-групп», в которых данные признаки обуславливают высокий риск заболевания. В работах с правильной постановкой задачи были получены высокие величины относительного риска: отношение шансов (ОШ) в пределах 3,4–14,2. Наши результаты исследований связи полиморфизма генов ФБК с предрасположенностью к аллергическим заболеваниям также свидетельствуют о продуктивности такого подхода. Например, при изучении C481T- и G590A-полиморфизма гена *NAT2* установлено, что двойная гетерозигота является маркером устойчивости к atopическому дерматиту (АД) и бронхиальной астме (БА). Субгруппой, в которой наиболее сильно проявляется защитный эффект данного генотипа, являются девочки, не подвергавшиеся воздействию табачного дыма в семьях: ОШ = 0,08, $P < 0,05$ в исследовании АД (в то время как для всей группы больных – 0,43, $P < 0,05$); а в исследовании БА для субгруппы ОШ = 0,09, $P < 0,05$ (0,54 для всех). Нуль-генотип *GSTT1* является маркером предрасположенности к БА у детей: для всей группы ОШ = 2,69, а для не подвергавшейся воздействию табачного дыма субгруппы – 11,0; $P < 0,01$ (Вавилин, 2000).

Исследования этого периода как онкологических, так и других заболеваний, показали, что комбинации генотипов часто обуславливают более высокий риск, чем индивидуальный ген, т. е. имеет место «ген–ген-взаимодействие». Полученные нами результаты также показывают наличие сильных ген–генных взаимодействий. Так, индивидуальные генотипы *GSTM1*0/0*, *GSTT1*0/0* и *GSTP1-Val₁₀₅/Val₁₀₅* ассоциированы с предрасположенностью к АД у детей с ОШ = 1,02; 2,67 и 3,22 соответственно, а их комбинация – с величиной ОШ = 9,43, $P < 0,05$.

Также было показано, что воздействие химического фактора, в метаболизме которого участвуют продукты исследуемых генов, имеет важное значение в проявлении эффекта гена («взаимодействие ген–среда»), причем это может быть наиболее заметно в области низких

доз. Многие примеры этого были получены для курения – универсального фактора риска всех распространенных заболеваний. В наших исследованиях аллергических заболеваний мы обнаружили, что с чувствительностью к фактору пассивного курения ассоциирован *GSTM1*. Так, без учета этого фактора для генотипа *GSTM1*0/0* в оценке предрасположенности к БА ОШ = 1,46, с учетом 2,26, $P < 0,1$, а для случаев раннего развития астмы – 9,0, $P < 0,05$. Рисквая значимость генетических маркеров гена *NAT2* в отличие от *GSTM1* часто снижается в условиях активного или пассивного курения. Наши результаты для АД подтверждают этот феномен: гомозигота 590A/A гена *NAT2* в условиях отсутствия курения имеет ОШ = 9,0, $P < 0,05$, а при воздействии курения – 2,37. Генотип дикого типа 481C/C и 590G/G этого гена является фактором риска развития БА у детей в отсутствие курения (ОШ = 4,95; $P < 0,05$), а в условиях воздействия пассивного курения ОШ падает до 1,78.

Почти все ФБК принимают участие в метаболизме эндогенных субстратов, и снижение рисковости значимости полиморфных вариантов этих генов под воздействием курения обусловлено, вероятно, сложностью этого фактора. В табачном дыме определено около 4 тыс. компонентов, и вклад гена, продукт которого метаболизирует лишь немногие из них, снижается. Такого рода наблюдения получены не только для человека, но и других видов. Спектр однонуклеотидных замен меняется в зависимости от условий существования видов микроорганизмов и насекомых (Nevo, 2001). Эти данные позволяют взглянуть на полиморфные варианты не как на поломки гена «дикого типа», а как на расширение адаптивных возможностей вида. Именно это, по-видимому, и отражает высокая частота полиморфизма генов ФБК.

Таким образом, имеется достаточно примеров связи полиморфизма генов ФБК с распространенными заболеваниями для того, чтобы сделать вывод об их существенном вкладе в эпидемиологию этих заболеваний. Это стимулирует расширение подобных исследований, прежде всего, в направлении более полного охвата признаков, важных для токсикокинетики и токсикодинамики ксенобиотиков в организме. Растет число работ по изучению транспортных

белков, хотя в сравнении с ФБК этот объект менее представлен в литературе.

Транспортеры вовлечены на уровне организма в абсорбцию, распределение и экскрецию ксенобиотиков, а на клеточном – в поступление и выброс ксенобиотика из клетки. Мембранные транспортные белки, принадлежащие к АТР-Binding Cassette семейству, удаляют различные гидрофобные соединения через плазматическую мембрану из клетки. Ген множественной лекарственной устойчивости *MDR1* – один из членов этого семейства – кодирует АТФ-зависимый мембранный транспортный белок Р-гликопротеин (Р-гр), который в физиологических условиях защищает клетки, предотвращая накопление в них токсических соединений (Schinkel, 1997).

В гене *MDR1* идентифицировано 29 однонуклеотидных замен (Kim *et al.*, 2001). Связь полиморфизма с измененной экспрессией или активностью Р-гр доказана пока только для мутации в 26 экзоне С3435Т и для мутаций в экзоне 21 G2677Т/А и экзоне 1b T129С. Исследования транспортеров как возможных факторов риска возникновения болезней сфокусированы на полиморфизме С3435Т гена *MDR1*. Показана защитная роль доминантного 3435С аллеля гена *MDR1* для пациентов с болезнью Паркинсона (Furuno *et al.*, 2002). Особенно выражена защитная роль этого аллеля у тех больных, которые контактировали с пестицидами – субстратами Р-гр (Drozdziak *et al.*, 2003). Аллель 3435С снижает риск развития и других заболеваний (Jamroziak *et al.*, 2004). Выявлена предрасположенность к индуцированному лечением острому миелоидному лейкозу у носителей 3435ТТ генотипа (Ben-Yehuda *et al.*, 2002). Показано, что мутации в позиции 8 промотора *MDR1* – фактор предрасположенности для гематологических новообразований (Rund *et al.*, 1999). Носители мутантных аллелей более чувствительны к канцерогенам из-за низкой экспрессии Р-гр, и острый миелоидный лейкоз у них появляется раньше, чем у других индивидуумов (Illmer *et al.*, 2002).

Наши исследования ассоциации полиморфизмов *MDR1* в экзонах 12, 21 и 26 и интроне 6 с предрасположенностью к лимфопролиферативным заболеваниями (ЛПЗ) показали, что мутантные аллели Т6+139Т (интрон 6) и 1236Т (экзон 12) являются факторами устойчивости

к ЛПЗ. У носителей С6+139С генотипа риск возникновения ЛПЗ в 2,4 раза ($P < 0,03$) выше, чем у носителей других генотипов (С6+139Т и Т6+139Т), а по сравнению с гомозиготами мутантного типа Т6+139Т – еще более высокий (ОШ = 3,75, $P < 0,02$). Для гомозигот 1236С (экзон 12) риск возникновения заболевания выше в 2,3 раза ($P < 0,06$), чем для носителей двух других генотипов. Наличие или отсутствие мутаций в позициях 2677 и 3435 не влияет на риск развития ЛПЗ.

Таким образом, данные о связи полиморфизма Р-гр с некоторыми полифакторными заболеваниями свидетельствуют, что вклад в эпидемиологию этих заболеваний вносят мутации не только в кодирующей и регуляторной областях гена, но и в некодирующей части, не связанные с заменой аминокислот. Исследование таких полиморфизмов генов поможет прояснить значение этих мутаций как для функции белка, так и для ассоциаций различных генотипов с риском определенных болезней и с их клиническими проявлениями.

Представляется уместным обратить внимание на то, что экогенетические молекулярно-эпидемиологические исследования предоставляют богатый материал для выдвижения новых гипотез о механизмах патогенеза заболеваний, но для этого необходимы точные количественные оценки проявлений клинического фенотипа. Например, нами показана корреляция числа нуль-аллелей *GSTM1* с выраженностью количественных показателей атопии у больных БА (Макарова и др., 2004), а в работе Brasch-Andersen и соавторов (2004) – связь силы ассоциации *GSTM1* и *GSTT1* с предрасположенностью к атопической БА с дозой гена. Эти данные указывают на важную роль в функционировании клеток иммунной системы наряду с цитокиновой сетью генов ФБК. Молекулярные механизмы, реализующие это участие, неизвестны. Их исследование может быть важным в развитии представлений о патогенезе атопических заболеваний и потенциально для поиска новых терапевтических мишеней.

В кратком заключении к изложенному материалу вспомним, что уже основатели фармакогенетики А. Motulski и F. Vogel прозорливо указывали на возможную роль нескольких генов в формировании лекарственного ответа.

Накопленные знания свидетельствуют о том, что в ответе на воздействие среды, которое всегда является более комплексным в сравнении с лекарственным воздействием, участвуют генные сети, включающие десятки и сотни генов (Колчанов, 2000). «Комплектование» и описание закономерностей взаимодействия этих множеств составляют экогенетическую основу полифакторных заболеваний. Данная область исследований требует усилий не только со стороны медиков, генетиков и биохимиков, но и математиков – специалистов по нейросетевому анализу, нечёткой логике, биоинформатике. Ожидаемое значение этих результатов трудно переоценить, особенно для профилактической медицины.

Результаты, использованные в статье, получены при частичной финансовой поддержке РФФИ, гранты «02-04-48328-а» и «05-04-48819-а».

Литература

- Аксель Е.М., Давыдов М.И. Статистика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в 2000 году // Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2000. М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2002. С. 85–106.
- Вавилин В.А., Часовникова О.Б., Ляхович В.В. и др. Полиморфизм глутатион S-трансферазы М1 и Т1 у детей, больных бронхиальной астмой // Вопр. мед. химии. 2000. Т. 46. Вып. 4. С. 388–397.
- Горбунова В.Н. Молекулярные основы медицинской генетики. СПб.: Интермедика, 1999. 212 с.
- Инге-Вечтомов С.Г. Экологическая генетика. Что это такое? // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 2. С. 59–65.
- Колчанов Н.А., Ананько Е.А., Колпаков Ф.А. и др. Генные сети // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34. № 4. С. 533–544.
- Кондюрина Е.Г., Елкина Т.Н., Филатова Т.А., Гавалов С.М. Возрастные аспекты эпидемиологии бронхиальной астмы у детей Новосибирска // Пульмонология. 1998. № 1. С. 38–43.
- Ляхович В.В., Вавилин В.А., Гришанова А.Ю. и др. Фармакогенетика и современная медицина // Вестник РАМН. 2004. № 10. С. 40–45.
- Макарова С.И., Сафронова О.Г., Вавилин В.А. и др. Показатели атопии у детей с бронхиальной астмой возрастают с накоплением нуль-аллелей глутатион S-трансферазы М1 // Бюл. эксперим. биол. медицины. 2004. Т. 138. № 11. С. 520–522.
- Мезенцева Н.Г., Кеббель И.А. Структура патологии сердечно-сосудистой системы на территории Новосибирской области // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. А.Б. Масленникова. Вып. 6. Новосибирск: Альфа Виста, 2004. С. 3–8.
- Пузырев В.П. Медицинские аспекты экогенетики // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 8. С. 20–26.
- Brasch-Andersen C., Christiansen L., Tan Q. *et al.* Possible gene dosage effect of glutathione-S transferases on atopic asthma: Using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers // Hum. Mutat. 2004. V. 24. P. 208–214.
- Ben-Yehuda D., Krichevsky S., Shafran S. *et al.* Therapy-related leukemia: Clinical characteristics and analysis of new molecular risk factors in 96 patients // Blood. 2002. V. 100. P. 324a.
- Drozdziak M., Bialecka M., Mysliwiec K. *et al.* Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease // Pharmacogenetics. 2003. V. 13. № 5. P. 259–263.
- Furuno T., Landi M.T., Ceroni M. *et al.* Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease // Pharmacogenetics. 2002. V. 12. P. 529–534.
- Garte S. Metabolic susceptibility genes as cancer risk factors: time for a reassessment // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2001. V. 10. № 12. P. 1233–1240.
- Holgate S. The epidemic of allergy and asthma // Nature. 1999. V. 402. Suppl. P. 2–4.
- Illmer T., Shuler U.S., Thiede C. *et al.* MDR gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients // Cancer Res. 2002. V. 62. P. 4955–4962.
- Jamroziak K., Mlynarski W., Balcerczak E. *et al.* Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia // Eur. J. Haematol. 2004. V. 72. № 5. P. 314–321.
- Kalow W. Pharmacogenetics in biological perspective // Pharmacol. Rev. 1997. V. 49. № 4. P. 369–379.
- Kim R.B., Leake B.F., Choo E.F. *et al.* Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans // Clin. Pharmacol. Ther. 2001. V. 70. № 2. P. 189–199.
- Nevo E. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress // Proc. Natl Acad. Sci. 2001. V. 98. № 11. P. 6233–6240.
- Rund D., Azar I., Shperling O. A mutation in the promoter of the multidrug resistance gene (MDR1) in human hematological malignancies may contribute to the pathogenesis of resistant disease // Adv. Exp. Med. Biol. 1999. V. 457. P. 71–75.

Schinkel A.H. The physiological function of drug-transporting P-glycoprotein // *Semin. Cancer Biol.* 1997. V. 8. P. 161–170.

Sram R.J., Binkova B. Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to

mutagens and carcinogens, 1997–1999 // *Environ Health Perspect.* 2000. V. 108. Suppl. 1. P. 57–70.

Vogel F. Moderne Probleme der Humangenetik // *Ergeb. Inn. Med. Kinderheilk.* 1959. V. 12. P. 52–125.

ECOGENETICS ASPECT OF MULTIFACTORIAL DISEASES

V.V. Lyakhovich, V.A. Vavilin, S.I. Makarova, A.J. Grishanova

Institute of Molecular Biology and Biophysics, SB RAMS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: lyakh@soramn.ru

Summary

The main attention of paper is focused on gene polymorphisms of xenobiotic metabolizing and transport proteins. There are shown that polymorphisms can be genetic factors of susceptibility to multifactorial diseases on literature and own results. Effects of individual genes, «gene–gene» and «gene–environment» interactions are considered. Future success of ecogenetic studies of multifactorial diseases the authors connect with efforts of wide range specialists.