

© Кайдашев І. П., Шликова О. А., Ізмайлова О. В.

УДК {577.21+615} : 616-071

ЭВОЛЮЦИОНИРОВАНИЕ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ЧАСТЬ II)

Кайдашев І. П., Шликова О. А., Ізмайлова О. В.

ВГУЗ України «Українська медичинська стоматологічна академія», г. Полтава

Фармакогенетика в першу чергу має справу з терапевтичними ефектами і несприятливими наслідками дії лікарських препаратів, отрут та інших видів хімічних і екологічних факторів. Однак, незабаром після виникнення фармакогенетики, ця сфера була розширена: докладно вивчені генетичні поліморфізми, і не тільки щодо відомих перерахованих дій, але і як фактори сприйнятливості до хвороб цілому. У багатьох із цих досліджень причини початку розвитку хвороби були невідомі. Паралельно з функціональною природою генів у фармакогенетичних дослідженнях розглядаються поряд з факторами метаболізму ферментів і багато інших, такі як фактори транспортування, відновлення ДНК, регулювання клітинного циклу і передачі сигналу. Загальне число публікацій, що вивчають зв'язок поліморфізмів з ризиком розвитку захворювань, перевищує в кілька разів ті, які вивчають поліморфізми у зв'язку з відповіддю на лікарські препарати. Ці дослідження проаналізовані, систематизовані з метою підвищення ефективності майбутніх стратегій у фармакогенетиці і дослідженнях геноміки, зосереджено увагу на ідентифікації генотипів, які призводять до розвитку певних мультифакторних і полігенних захворювань.

Ключові слова: фармакогенетика, поліморфізм генів, клінічна фармакологія

Фармакогенетика в первую очередь имеет дело с терапевтическими эффектами и неблагоприятными последствиями действия лекарственных препаратов, ядов и других видов химических и экологических факторов. Однако, вскоре после того, как фармакогенетика возникла, эта сфера была расширена: обстоятельно изучены генетические полиморфизмы, и не только относительно известных перечисленных воздействий, но и как факторы восприимчивости к болезням в целом. Во многих из этих исследований причины начала развития болезни были неизвестны. Параллельно с функциональной природой генов в фармакогенетических исследованиях рассматриваются наряду с факторами метаболизма ферментов и многие другие, такие как факторы транспортировки, восстановления ДНК, регулирования клеточного цикла и передачи сигнала [1]. Общее число публикаций, изучающих связь фармакогенетики полиморфизмов с риском развития заболеваний, превышает в несколько раз те, которые изучают полиморфизмы в связи с ответом на лекарственные препараты, и поэтому в данном обзоре не возможно дать значимых сведений по исследованиям сотен генов-кандидатов факторов восприимчивости к болезни. Тем не менее, было бы интересно проанализировать, систематизировать эти исследования с целью повышения эффективности будущих стратегий в фармакогенетике и исследованиях геномики. Кроме того, почти все недавние обще-

системные скрининги генома не сосредотачивали внимание на поиске ответа организма на действие лекарственных препаратов, а на идентификации генотипов, которые предрасполагают к развитию определенных мультифакторных и полигенных заболеваний.

Химическая токсикология и канцерогенез

Реакция организма на чужеродное соединение может привести к возникновению биологически и химически активных веществ или неактивных соединений и, следовательно, набор токсикогенных и детоксикационных генов отдельного человека может определять риск развития заболевания. Ферменты, имеющие различные варианты в кодировании белка такие, как ацетилтрансфераза, глутатион-S-трансфераза M1 и T1, параоксоназа, миелопероксидаза, могут приводить к широкому спектру действия: от полного отсутствия активности до очень высокой активности в зависимости от наличия ферментов и индивидуальных генотипов. Поэтому очевидно, что такие генетические варианты могут играть определенную роль в химическом канцерогенезе, в химически индуцированных нейродегенеративных заболеваниях или химически индуцированном повреждении эндотелия и атеросклерозе. Следующие два примера, CYP2D6 и GSTM1, могут служить иллюстрацией некоторых общих моментов и проблем, которые также показаны на рисунке 1.

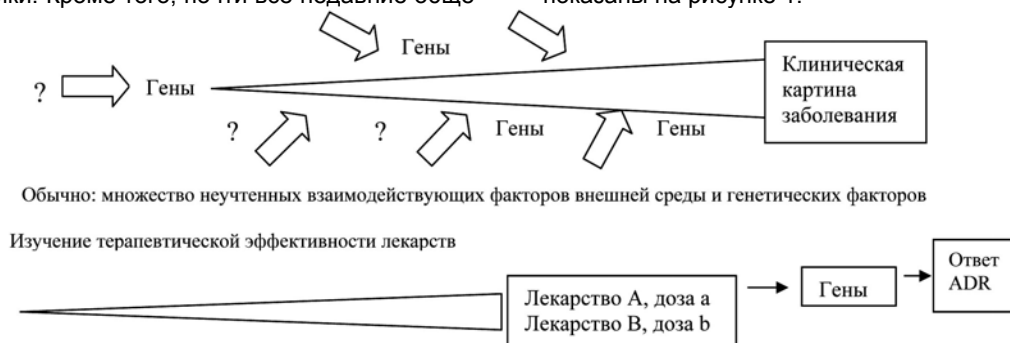


Рисунок 1. Различия между фармакогеномикой исследований восприимчивости к заболеваниям (верхняя часть), и ответа на лекарственные препараты (нижняя часть).

В патогенезе заболеваний, в основном несколько внутренних факторов (указаны знаки вопроса, так как эти внешние факторы, в основном, не достаточно задокументированы) взаимодействуют в различных временных точках с одним геном или с несколькими генами. С другой стороны, исследования воздействий лекарственной терапии (например, тип и доза лекарства, подбор оптимальных плазменных концентраций препаратов в зависимости от различий фармакокинетических и фармакодинамических вариантов). В теории, это должно облегчить идентификацию генов, модулирующих ответ на лекарственные препараты, чем поиск и идентификация генов, ответственных за развитие болезни. ADR – Adverse drug reaction - Неблагоприятные реакции на препараты.

Вскоре после открытия полиморфизма CYP2D6, ученые начали исследования генетических полиморфизмов как фактора риска развития рака легкого. Мотивацию этого исследования можно понять: существуют большие индивидуальные различия в восприимчивости к раку легких, а также ученые в те времена знали, что все ферменты цитохрома P450 могут быть биоактиваторами прокарциногена. Более того, результаты одного из этих исследований показали, что носители генов, определяющих быстрый метаболизм имеют существенно повышенный риск [2]. Тем не менее, в настоящее время существуют сомнения в том, что CYP2D6 играет значительную роль в развитии рака легких. Есть некоторые мнения о канцерогенных веществах, которые могли бы быть биоактиваторами CYP2D6, но нет никаких доказательств того, что они являются критическими в развитии рака легких. В настоящее время хотелось бы увидеть большее число исследований, доказывающих влияние CYP2D6 на рак легких [3].

Глутатион S-трансфераза M1 является ферментом II фазы, участвующим в детоксикации ряда полициклических ароматических углеводородов. Около 50% белого населения имеют полное отсутствие

фермента вследствие большой геномной делеции [4]. Это явилось основанием для изучения этого фермента в связи с риском заболевания раком легких, а в некоторых исследованиях действительно описан повышенный риск у людей, имеющих недостаток фермента, но такие эффекты не были подтверждены в достаточно мощных мета-анализах [5]. Кроме того, первоначальный анализ генома на наличие факторов риска развития рака легких не выявили, как фактор риска, недостаток фермента детоксикации [6].

Изучение большого числа вариаций генома

подавляющее число унаследованных вариантов в геноме человека только в последнее время стало очевидным после почти полного исследования последовательности ДНК генома человека. Можно предполагать [7], что в самое ближайшее время геном будет полностью секвенирован у ряда человеческих особей и это даст более четкое понимание различий между индивидуальными изменениями в человеческом геноме. В настоящее время в человеческом геноме были выявлены около 12 миллионов однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) [8-10], кроме того, существует более 100000 вставок и делеций. Охарактеризован также большой класс генетических вариантов обусловленных переменным числом tandemных повторов полиморфизмов (VNTR) (табл. 1). Они включают переменное количество динуклеотидных повторов, таких как, например, различное количество TA в TATA боксе в основном промоторе билирубина глюкуронилтрансферазы UGT1A1, и больше единиц повторов, как, например, 16 аминокислотных (48 bp) повторов в рецепторе дофамина D4 [11]. Лишь недавно было показано, что существует, по крайней мере 1500 крупных геномных сегментов с переменным числом tandemных повторов. Общее число унаследованных эпигенетических вариаций может быть даже больше 20% всех генов, дифференциально метилированных в промоторных регионах или в регионах кодирования [8-10].

Таблица 1
Тип и количество межиндивидуальной изменчивости в геноме человека

Генетические изменения/варианты	Абревиатура	Описание	Частота в геноме человека
Однонуклеотидный полиморфизм	SNP	Обычно два различных нуклеотида (биаллельный SNP) в определенном положении, реже может встречаться триаллельный вариант	12,000,000
Делеция/Инверсия	InDel	Удаления (или вставки, в зависимости от частоты аллеля) в размере от 1 до 1000 нуклеотидов. Чаще проявляются делеции одного или трех пар оснований	> 1,000,000a
Изменение числа tandemных повторов	VNTR	Микросателлитные полиморфизмы, так называемые краткие tandemные повторы (STR), обычно tandemные повторы из двух, трех или четырех нуклеотидов, но также повторяющиеся до 10 нуклеотидов могут быть идентифицированы в этой группе	> 500,000a
		Минисателлитные это VNTR полиморфизмы у которых 10–100 нуклеотидов повторяются в переменном количестве. Повторяющиеся сегменты часто не имеют абсолютно идентичных последовательностей.	
		VNTRs с большими единицами повторов (100–1000 bp) называются сателлитами	
Изменение числа копий	CNV	Наследуемые удаления или увеличения ДНК сегментов длиной более чем 1 kb. В настоящее время известно около 1500 CNV распространенных в хромосомах, что составляет 12% от длины всего генома.	> 1500 локусов, охватывающих 12% генома

Главный вопрос, возникающий после определения этих массовых геномных и эпигеномных вариаций заключается в том, чтобы определить биологическую и медицинскую значимость таких геномных изменений (рис. 2). Полиморфизмы, влияющие на экспрессию генов, могут находиться где угодно - как непосредственно в основном промоторе, так и через несколько сотен или несколько десятков тысяч оснований (в 5' направлении, или даже в 3' направлении в интроне и нетранслируемых областях (UTRs) этого гена). Учитывая, что первичные транскрипты представляют собой весь регион между транскрипционным стартом и 3' концом транскрипта, все полиморфизмы в этом сегменте могут повлиять на сплайсинг. Интересно, что более чем половина всех генов имеют несколько транскрипционных стартовых точек. Расположение точек начала транскрипции зависит от вида ткани, где экспрессируется ген [12]. Полиморфизмы в кодируемом регионе могут быть несинонимическими – т.е. приводить к замене аминокислот в белковой последовательности, или они могут быть синонимическими. Синонимические полиморфизмы, тем не менее, могут отражаться на функциональных свойствах клетки, вследствие изменения стабильности мРНК или нарушения транскрипции белка, так как тРНК для различных синонимических кодонов присутствует в клетках с неравной частотой. Использование таких различных кодонов может не только привести к различиям в эффективности трансляции, но, основываясь на приведенном примере функциональных полиморфизмов в Р-гликопротеине, такие полиморфизмы могут даже привести к возникновению различий в структуре белка [13].

Изменчивость наблюдаемая в числе копий: CYP2A6, CYP2D6, GSTM1, GSTT1 и 1500 других подобных участков.

Делеции или дубликации больших фрагментов генома размером от 1 кб до более чем 100 кб традиционно считались специфическими для нестабильных опухолевых геномов и исключительно редкими для генома здоровых незлокачественных клеток. Современное исследование целостного генома (genome-wide analyses) с использованием SNP-микрочипов и сравнительного гибридизационного анализа, которые показали наличие более 1400 делеций или удвоений, охватывающих 12% последовательности генома "здорового" человека [10, 14-19], заставили пересмотреть традиционные взгляды. Этот класс генетических полиморфизмов, называется изменчивостью числа копий (CNV), и представляет собой стабильные генетические вариации, которые подчиняются Менделевскому распределению как SNP, InDel или VNTR полиморфизмы. Собственно, такие CNV полиморфизмы не настолько новы в фармакогенетике. Большие делеции CYP2A6 и глутатион-S трансферазы (GSTs) M1 и T1 [4, 20]. Последние результаты, свидетельствуют о том, что такие частые геномные вариации – (1500 CNV полиморфизмов) имеют такое же большое влияние на предрасположенность к болезни или на эффект лекарственных препаратов, как и 12 млн. однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs). Для системного исследования этих видов генных вариаций сегодня необходимо разработать точные и доступные аналитические методики, так как существующие 500-к или 1000-к микрочиповые методы и количественные ПЦР методы, специфичные только для одного локуса, например для CYP2D6 или GSTs [21, 22], по-прежнему имеют ряд ограничений.



Функциональное расположение:	Промотор регуляторных элементов	Несинонимический кодон	Синонимический кодон	интрон	Нетранслируемая область (UTR)
Функциональный эффект	Транскрипционная регуляция экспрессии генов	Белковая активность, стабильность, взаимодействие	Стабильность мРНК Сплайсинг РНК Эффективность транскрипции	РНК сплайсинг	мРНК устойчивость эффективность трансляции (напр., связывание мРНК)
Аналитические методы	Представляющий генный анализ, EMSA, qRT-PCR, ChIP, дисбаланс экспрессии аллелей	Гетерологичная экспрессия, кинетика фермента, Вестерн Блоттинг, дрожжевые дигибридные системы	Анализ стабильности мРНК, RT-PCR, захват экзона, двойной-представляющий сплайсинг	RT-PCR захват экзона, двойной-представляющий сплайсинг	Анализ стабильности мРНК Вестерн Блоттинг

Рисунок 2. Несколько возможных функциональных эффектов генетических полиморфизмов (однонуклеотидный полиморфизм (SNP), небольшие инверсии-делеции InDels, различное число тандемных повторов VNTRs), в зависимости от их локализации в геноме.

Фармакогеномика по ту сторону геномной зародышевой линии наследования

Приобретенные генные вариации

Дополнительные сложности для фармакогенетических исследований возникают вследствие хромосомных aberrаций и изменения числа хромосом (анеуплоидии) в опухолевых клетках. Неозлокачественные клетки, например, клетки периферической крови, которые обычно используются для изучения геномной ДНК в фармакогенетическом анализе, обладают диплоидным геномом. В опухолевых же клетках, часто наблюдается анеуплоидия и различные хромосомные aberrации. Эти нарушения затрудняют прогнозирование фенотипов при обычных процедурах генотипирования, которые не используют ДНК из самой опухоли. Было показано, что в лейкоэмических клетках с дополнительной хромосомой, содержащей не мутировавший (дикий тип) аллель гена TPMT, наблюдалось существенно сниженное накопление тиогуанин нуклеотидов и метотрексат полиглутамата [23]. Тем не менее генотип TPMT, определенный в здоровых неозлокачественных клетках, ассоциировался с ответом на меркаптопурин в начальных курсах лечения [24].

Влияние генетических и эпигенетических факторов

Исследователям и врачам, занимающимся фармакогенетикой и геномикой известно и многократно преподавалось следующее: анализ наследственных генетических вариаций имеет большое преимущество, потому что анализ генома одной клетки организма дает достоверную информацию о всех других клетках независимо от возраста, тканевой локализации или экологических факторов. Однако существуют соматические мутации клеток, а также тканеспецифические эпигенетические эффекты, такие как, метилирование ДНК, модификация гистонами или экспрессией микро-РНК, которые значительно и постоянно могут изменять модель экспрессии гена в клетке. Такие изменения могут существенно изменить эффективность действия лекарственных препаратов или инициировать неблагоприятные последствия и, следовательно, они должны учитываться в клинической фармакологии [25]. Таким образом, перспективным направлением фармакогенетики станут научные исследования в области эпигеномики и малых регуляторных РНК. Уже сегодня получены первые результаты возможной химиотерапии рака с помощью микро РНК.

Примеры эпигеномных изменений: DPD и MGMT

Экспрессия генов, кодирующих дигидропиримидин дегидрогеназу (DPD), является хорошим маркером диагностики DPD дефицита и возможной токсичности 5-фторурацила. С помощью унаследованных генетических полиморфизмов можно объяснить лишь около одной трети случаев недостаточности фермента DPD и токсичности 5-фторурацила [26, 27], но на метилирование в DPYD промоторе может приходиться значительная часть пока еще необъясненной DPD низкой активности как в опухоли, так и здоровой ткани, которая имеет столь важное значение для неблагоприятного исхода в ответ на лекарственные препараты [28-31]. Другим примером является опухоль-специфическое гиперметилование в MGMT. MGMT является ДНК-репарирующим ферментом и его инактивация в результате изменений в структуре его метилирования может привести к увеличению чувствительности опухоли к алкилирующим препаратам, таким, как циклофосфамид или кармустин [32].

РНК интерференция, малые интерферирующие РНК и микро РНК

Явление интерференции РНК (RNAi), регулирующей экспрессию генов, было впервые описано у нематод *Caenorhabditis elegans* [33]. У позвоночных животных и человека, малые, 19 - 22 нуклеотидов длиной, молекулы микро-РНК присутствуют почти во всех клетках. Они генетически закодированы и регулируют экспрессию специфических последовательностей генов путем угнетения трансляции и деградации мРНК участвуя в нормальном развитии и регуляции клеток, а также в онкогенезе [34, 35]. Было установлено, что однонуклеотидный полиморфизм в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) AGTR1 гена (rs5186), влияет на распознавание этого участка микро РНК-155 и изменяет угнетающее действие микро РНК [36]. Эти данные показывают, что генетические различия не только в кодирующих регионах промотерах и участках сплайсинга интронов генов, но и в их 3'-UTR могут иметь функциональное значение для регуляции с помощью микро-РНК. Кроме того, 14 областей человеческого генома с вариациями числа копий CNV вмещает 21 из известных микро РНК человека, что может приводить к делеции всех этих микро РНК [18]. Однако, пока не существует данных о фенотипических изменениях у носителей этих CNVs.

Искусственные двуспиральные молекулы РНК, длиной 21-22 п.о. называемые малыми интерферирующими РНК (миРНК), сегодня могут применяться для экспериментального выключения экспрессии гена [37]. Интерференция РНК представляет общий интерес в качестве инструмента для анализа генных функций. МиРНК оказались способны не только заглушить экспрессию гена, но и сделать это аллель-специфическим образом, даже если разница между аллелями составляет одно основание (SNP) [38-39]. Это дает большие возможности терапии направленной на конкретный ген, где болезнетворные аллели могут быть специально ориентированы на миРНК. При этом миРНК может быть специфично направлена на аллель, содержащий болезнетворный ген, что позволяет решить ряд практических проблем [40].

Молекулярные маркеры, определяющие лекарственную терапию

Терапия, определяемая использованием молекулярных маркеров, становится все более и более распространенной в медицинской практике. Состояние экспрессии HER2/neu и рецепторов к эстрогенам при раке молочной железы определяет терапию веществами, которые нацелены на HER2 или рецепторы эстрогена (ER), а именно трастузумаб (Herceptin) и тамоксифен. Для анализа HER2 рекомендуется применять иммуногистохимические тесты (для определения самого белка) или прямое обнаружение экспрессии гена HER2 с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) [41,42]. В случае HER2, может применяться количественная ПЦР как для выявления HER2 амплификации на уровне хромосом, так и транскрипции HER2 в крови. Результаты этого метода хорошо совпадают с данными иммуногистохимического анализа и *in situ* гибридизации, но метод пока еще не получил широкого диагностического применения [43-47].

Однако, на сегодняшний день геномный анализ не всегда может быть полноценно применим. По современным данным нет количественного метода, подоб-

ного ПЦР в реальном времени, который мог бы быть клинически рекомендован для определения уровней мРНК ESR1 (ген, кодирующий α эстрогеновый рецептор) или HER2 или чтобы оценить события амплификации гена на уровне геномной ДНК. В случае эстрогенового рецептора причина заключается в том, что уровень концентрации рецептора на опухолевых клетках (собственно статус эстрогеновой чувствительности опухоли) определяется не экспрессией мРНК, а стабильностью белка рецептора [48].

Сегодня такой целевой подход получил высокоэффективную технологию на основе микрочипов, которые с большой точностью позволяют одновременно количественно определить мРНК 25000 известных

генов человека, а также экспрессию некоторых известных мРНК, и даже определение вариантов сплайсинга. Эти подходы могут служить для дифференциальной диагностики заболеваний, прогностических целей и для предвидения реакций на медикаментозную терапию [49-51].

Технические основы фармакогенетики и геномики

Прогресс и успех клинической фармакологии зависит от надежности биоаналитических методов и понимания их возможностей и ограничений. В данной работе мы сконцентрируем наше внимание на основных технологиях, которые применяются в лабораториях фармакогенетики и геномики (таблицы 2 и 3).

Таблица 2
Важнейшие технологии, применяемые для генотипического анализа в фармакогенетике и геномике

Метод	Короткое описание и цель, достигаемая при выполнении
Дидеокси (концевое) секвенирование	Чтение последовательностей ДНК, идентификация новых полиморфизмов
Денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография (ДВЭЖХ)	Вариантные и дикие формы ДНК образуют различные гибридные молекулы (гомодуплексные и гетеродуплексные), которые можно разделить ионной обращено фазовой хроматографией, чтобы установить полиморфизм.
PCR-RFLP	Геномная область амплифицируется с помощью ПЦР и разрезается ферментами, специфичными к определенным последовательностям (эндонуклеазы рестрикции). Образовавшиеся фрагменты потом анализируются методом электрофореза.
Пиросеквенирование	Метод ДНК секвенирования, основанный на синтетическом принципе [134]. Применяется в SNP типировании и анализе метилирования ДНК. Принцип лежащий в основе метода также является базисом современного крупноступенчатого секвенирования ДНК, известного как 454 «следующее поколение» способное обеспечить секвенирование более чем 100 миллионов пар оснований в день.
Одно-основное (праймерное) накопление (также известно как мини-секвенирование)	Короткие нуклеотиды отжигаются так, что их 3'-концы прямо направлены к полиморфному участку. Элонгация только одного отдельного основания осуществляется путем использования смеси флуоресцентно меченых ddNTP без dNTP. Продукты определяются или секвенированием, или детекционной системой MALDI-TOF. Используется как мультиплексная реакция в генотипировании SNP.
ДНК микрочипы (микроплатформа)	ДНК молекулы, связанные с твердой фазой микрочипов для одновременного генотипирования большого числа SNP (до миллиона) в одном образце. Применяется в исследовании больших частей генома.
РНК/кДНК микрочипы (микроплатформы)	Применяются в анализе экспрессии генов путем количественной оценки транскриптов в отдельном образце или при сравнении между двумя образцами. Удобно для определения количества большого числа различных транскриптов (также для больших областей генома) в отдельных образцах.
ПЦР	ПЦР является базовой/основной технологией во всех современных фармакогенетических геномных исследованиях.
ПЦР в реальном времени	Определение образования продуктов ПЦР во время прохождения ПЦР достигается использованием различных флуоресцентных меток или методов переноса энергии флуоресценции для генотипирования отдельных SNP во множестве образцов.
qRT-PCR (количественная обратнотранскриптазная ПЦР)	Применяется для определения количества транскриптов в образце после обратнотранскриптазной реакции. Удобно для определения числа РНК в большом количестве образцов.

Статистика, биоинформатики и системная биология

Существуют почти 12 млн. ОНП в человеческом геноме (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/Notes/build127_announce.txt).

В самом ближайшем будущем, клиническому фармакологу придется иметь дело не только с клиническими и лабораторными данными о своих добровольцах и больных, но и с данными о 500000 или 1 млн. ОНП у пациентов [52-53]. Биолог, изучающий клетки в лабораторных условиях, будет также иметь дело с таким же количеством вариантов генетических изменений в клетке. И это не только эти 1 или 3 млн. ОНП взятые отдельно, но и взаимодействие многих из них – это явление известно в генетике, как эпистаз – способность образовывать определенные фенотипы. Таким образом, необходимо будет принимать во внимание огромное количество взаимодействующих факторов, что явится предметом транскриптомики, метаболомики и множества других широких подходов. Эти взаимосвязи могут быть довольно сложными – отчасти антагонистическими, частично дополняющими и усиливающими друг друга и они, безусловно, не будут ограничиваться только взаимодействием между двумя генами, а реализовываться интерактивными связями нескольких генов. Число эпигенетических различий будет больше, поскольку существуют мно-

жественные различия между типами тканей, возрастом человека и т.д. Таким образом, развитие биоинформатики и генетической статистики играет решающую роль в дальнейшем развитии фармакогенетики и геномики. Еще существует слишком много вариаций и взаимодействий, которые только еще должны быть экспериментально изучены, поэтому необходимо срочно разработать методы выявления таких изменений, которые являются наиболее биологически значимыми.

Некоторые подходы к идентификации потенциально наиболее важных областей генома уже развиваются и будут развиваться дальше. Начиная с первых межвидовых сравнений гемоглобина, поиск гомологий между белковыми последовательностями стал важным инструментом обнаружения таких последовательностей в геноме, которые имеют решающее значение для реализации биологических функций некоторых белков. Связь между разными генетическими вариантами, имеющимися в одной хромосоме, является основным методом генетической статистики. Если человек имеет определенный генетический вариант в определенной позиции, то, вероятно, что он также будет иметь другие варианты, расположенные рядом на расстоянии от 10000 до 50000 п.о. и те же группы можно будет найти у нескольких родственников этого человека (рис. 3).

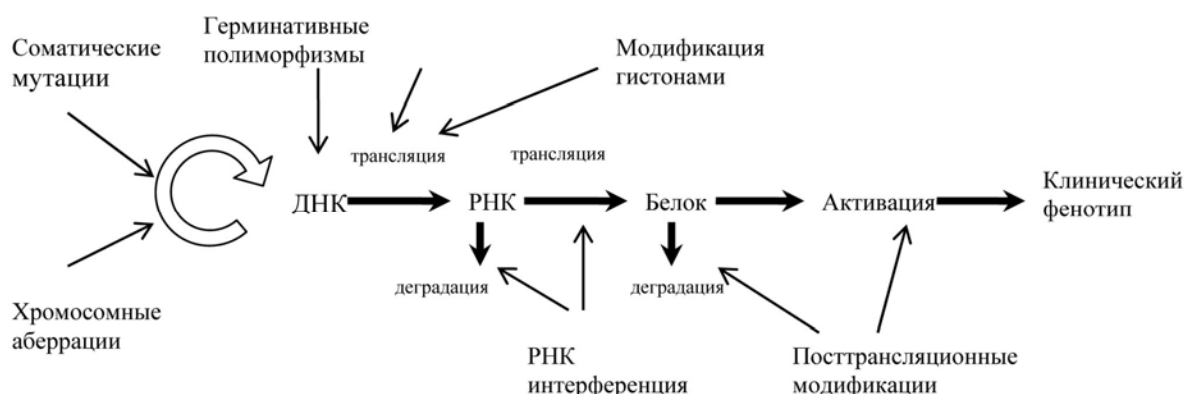


Рисунок 3. Взаимоотношения между геномными изменениями, изменениями РНК и белковой экспрессии с биологическими и клиническими эффектами. Указаны также несколько – но не все – механизмы регуляции.

Взаимосвязь между различными генетическими вариантами уже учитывалась при проведении ранних исследований, таких как, например, описание генетической изменчивости в цитохроме Р450 [54], а также учитывалась при исследовании человеческого генома (www.hapmap.org) [8]. Стало очевидным, что существуют рекомбинации «горячих точек» и гаплотипных блоков, то есть участки жесткой связи. Знание таких связей может существенно облегчить генотипирование, поскольку из всех взаимосвязанных полиморфизмов должен быть проанализирован только один. Можно сосредоточиться на изучении так называемых ОНП, что даст нам знания обо всех вариантах, поскольку все варианты взаимосвязаны между собой. Основываясь на селекции типов вариантов, можно ввести большее количество вариантов в каждом конкретном геноме и тем самым иметь очень высокую плотность генетических маркеров в карте [55-56].

Хотя изменения располагаются в хромосомах в линейной последовательности, известна их организация в так называемые гаплотипные блоки, в которых есть десятки, сотни или даже тысячи вариантов довольно плотных сочетаний. Вне гаплотипных блоков между гаплотипами существует лишь сравнительно редкая связь. Системный анализ продленности специфических линкерных блоков может быть информативным с точки зрения функциональной и эволюционной роли конкретных вариантов и гаплотипов. Расширение гомозиготных гаплотипов – указывающая индикация таких вариантов, которые продуцируются эволюционно в последнее время. Таким образом, этот анализ может существенно помочь выявить действительно важные варианты среди более чем 12 млн. SNPs в геноме человека [58-59]. Однако пока нет убедительных перспективных подтверждений этого подхода (табл. 3).

Биоинформационные базы данных и программное обеспечение для фармакогенетики и геномики Таблица 3

Цель	Компьютерные оболочки	Вебсайт
Базы данных		
Геном человека	Национальный центр по информационной биотехнологии в США (NCBI)	www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/
	Ensembl	www.ensembl.org/Homo_sapiens/
Базы данных однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП (SNP))	Американская (dbSNP at NCBI)	www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/
	Японская (db JSNP)	http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/
Парное неравновесное сцепление и гаплотипы	НарМар программа	www.hapmap.org
Анализ экспрессии генов	Объемная генная экспрессия (GEO) в NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
Метаболические пути	Киотская энциклопедия генов и генотипов (KEGG)	www.genome.jp/kegg/
Программное обеспечение		
Изучение гомологий	BLAST at NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Линейное секвенирование и идентификация новых SNP	Gap4	http://staden.sourceforge.net/
Картирование гаплотипа (позаппное)	Fastphase	http://stephenslab.uchicago.edu/software.html (существует также программа для подсчета проанализированных in-silico связанных SNP)
Парные неравновесные связи и визуализация блоков гаплотипов	Haploview	www.broad.mit.edu/mpg/haploview/
Расширение гаплотипов гомозиготности (EHH)	Обзор	www.broad.mit.edu/mpg/sweep/
Анализ SNP полиморфизмов затрагивающих функцию промотера	TRANSFAC	http://transfac.bioinf.med.uni-goettingen.de/
Анализ SNP полиморфизмов затрагивающих сайт сплайсинга и ESEs	Автоматические аналитические сплайсинг сайты (Детская больница милосердия Миссури, США)	https://splice.cmh.edu/
	ESEИдентификатор 3.0 (Cold Spring Harbor Laboratory)	http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home

Очевидно, что риск развития заболевания и ответ на лекарственные препараты, может зависеть от комбинации нескольких генов, это привело к тому, что в последние годы сделаны попытки коммерциализации использования прогностических маркеров. Прогностические сочетанные маркеры (PCM) могут быть определены как выражения взаимодействия в кросс-таблицах, анализе дисперсии и логистическом регрессионном анализе данных. Ситуации, в которых такие рекурсивные разметки должны быть выполнены в сканировании целого генома, еще окончательно не установлены.

Исследование широких геномных ассоциаций
Исследование риска заболеваемости

Подавляющее большинство выполненных фармакогенетических исследований, использовали подход – исследования генов кандидатов. Суть подхода заключается в предварительном анализе генов, которые могут быть актуальны в соответствии с биологической целесообразностью. Альтернативный - общегеномный линкерный анализ - еще редко применяется в фармакогенетике. Этот подход был успешно

применен в связи с исследованием семейных карт причинных мутации для многих моногенных болезней, а также наборы из нескольких сотен VNTR маркеров, были достаточными, чтобы определить например локус гена муковисцидоза.

Изучение широких геномных ассоциаций у индивидуумов стали применять совсем недавно, но уже есть основания считать его успешным подходом в выявлении медико-ассоциированных полиморфизмов. Такой подход начал активно развиваться после того, когда стало технически возможным исследование одиночных нуклеотидных полиморфизмов в геноме [60]. Уже в первых широких геномных микрочипных зондированиях "всего лишь" 10000 ОНП стали полезны в семейных исследованиях. Сейчас возможно микрочипное зондирование для 500000 или 1000000 ОНП маркеров равномерно распределенных в едином геноме человека. Более экономичный подход заключается в тестирование ОНП гаплотипных блоков, как доказано многими исследованиями (табл. 4).

Таблица 4
Обобщенная информация о некоторых заболеваниях, ассоциированных с генетическими маркерами

Заболевание	Размер выборки N случаев/контроль	Техника ^a	Идентифицируемый локус (ген)	Определяемый полиморфизм	PNSG ^b	Отношение шансов (95% доверительный интервал) ^c	Источник
Коронарная болезнь сердца	1926/2938	A500k	9p21	rs1333049	Нет	1.90 (1.61–2.24)	[68]
Гипертензия	1952/2938	A500k	None				[68]
Ревматоидный артрит	1860/2938	A500k	PTPN22	rs6679677	Да	3.32 (1.93–5.69)	[68]
			HLA-DRB1	rs6457617	Да	5.21 (4.31–6.30)	
			7q32	rs11761231	Нет	1.64 (1.35–1.99)	
Диабет 1 типа	1963/2938	A500k	PTPN22	rs6679677	Да	5.19 (3.15–8.55)	[68]
			HLA-DRB1	rs9272346	Да	18.5 (12.7–27.0)	
			12q13	rs11171739	Нет	1.75 (1.48–2.06)	
			12q24	rs17696736	Нет	1.94 (1.65–2.29)	
			PTPN2	rs12708716	Нет	1.55 (1.27–1.89)	
Диабет 2 типа	1924/2938	A500k	TCF7L2	rs4506565	Да	1.88 (1.56–2.27)	[68]
			CDKAL1	rs9465871	Нет	2.17 (1.60–2.95)	
			FTO	rs9939609	Нет	1.55 (1.30–1.84)	
Желчно-каменная болезнь	2113 /1965 ^d	A500k	ABCG8	rs11887534 (D19H)	Да	7.10 (0.90–158.6)	[67]
Инфаркт миокарда	4587/12767 ^d	IH300k	9p21	rs10757278	Нет	1.64 (1.47–1.82)	[69]
Диабет 2 типа	2376/2432 ^d	IH300k	PPARG	rs1801282	Да	1.20 (1.07–1.33)	[59]
			SLC30A8	rs13266634	Да	1.18 (1.09–1.29)	
			HHEX	rs1111875	Да	1.10 (1.01–1.19)	
			TCF7L2	rs7903146	Да	1.34 (1.21–1.49)	
			KCNJ11	rs5219	Да	1.11 (1.02–1.21)	
			IGF2BP2	rs4402960	Нет	1.18 (1.08–1.28)	
			CDKAL1	rs7754840	Нет	1.12 (1.03–1.22)	
			9p21	rs10811661	Нет	1.20 (1.07–1.36)	
			Chr11	rs9300039	Нет	1.48 (1.28–1.71)	
			FTO	rs8050136	Нет	1.11 (1.02–1.20)e	
Диабет 2 типа	6529/7252 ^d	A500k	SLC30A8	rs13266634	Да	1.07 (1.00–1.16)	[71]
			HHEX	rs1111875	Да	1.14 (1.06–1.22)	
			TCF7L2	rs7903146	Да	1.38 (1.31–1.46)	
			KCNJ11	rs5219	Да	1.15 (1.09–1.21)	
			PPARG	rs1801282	Да	1.09 (1.01–1.16)	
			9p21	rs10811661	Нет	1.20 (1.12–1.28)	
			IGF2BP2	rs4402960	Нет	1.17 (1.11–1.23)	
			CDKAL1	rs7754840	Нет	1.08 (1.03–1.14)e	
Ревматоидный артрит	1522/1850	IH300 IH550	TRAF1	rs3761847	Нет	1.32 (1.23–1.42) e	[72]
Экссфолиативная глаукома	290/14672 ^d	IH300	LOXL1	rs1048661+rs3825942	Нет	27.05 (14.9–49.2)	[66]

Продолжение таблицы 4

Заболевание	Размер выборки N случаев/контроль	Техника ^a	Идентифицируемый локус (ген)	Определяемый полиморфизм	PNSGb	Отношение шансов (95% доверительный интервал) ^c	Источник
Рак молочной железы	4398/4316 ^d	Custom array	FGFR2	rs2981582	Нет	1.63 (1.52–1.72)	[73]
			TNRC9	rs12443620	Нет	1.23 (1.17–1.30)	
			TNRC9	rs8051542	Нет	1.19 (1.12–1.27)	
			MAP3K1	rs889312	Нет	1.27 (1.19–1.36)	
			LSP1	rs3817198	Нет	1.17 (1.08–1.25)	
			H19	rs2107425	Нет	0.95 (0.89–1.01)	
			8q	rs13281615	Нет	1.18 (1.10–1.25)	
Рак толстой и прямой кишки	7334/5246 ^d	IN550	8q24	rs6983267		1.47 (1.34–1.62)	[74]

Примечание: ^a анализ микрочипов;

^b Ранее был известен ген восприимчивости или локус;

^c Если не указано другое, то ссылаются на шансы относительного риска носителей гомозиготного варианта по сравнению с носителями дикого типа;

^d Первоначальный скрининг генома был проведен только с подмножества установленных размеров образцов для окончательного анализа;

^e Отношение шансов наличия аллеля по сравнению с его отсутствием (аллельное отношение шансов)

Одним из первых успешных результатов анализа ОНП генома было определение полиморфизма комплементарного фактора H (CFH) His402Tyr с отношением шансов больше 7 для носителей гомозиготных вариантов [61]. В этом исследовании, включавшем 96 случаев, и 50 контролей, были проанализированы 116,204 ОНП; впоследствии были подтверждены эти результаты в двух других исследованиях, и согласованы с линкерными последовательностями локуса, полученными ранее в семейных исследованиях [62–65]. Данные, доказывающие успех ассоциированного исследования генома, были получены при выявлении генетического полиморфизма основной части субтипа открытоугольной глаукомы, так называемой эксфолиативной глаукомы [66] и желчекаменной болезни. Согласно этим данным, определение гаплотипов из двух не-синонимических вариантов или ОНП увеличивает риск развития заболевания более чем в 30 и 7 раз, соответственно [67]. К сожалению, эти случаи не являются репрезентативными для других многофакторных заболеваний, и вероятность соотношения 7 или 30 для одной гены не типичны, как правило, следует ожидать полигенетические заболевания. Тем не менее, вероятность соотношения между 1.0 и 2.0 прослеживается во многих недавно опубликованных работах по ассоциированным исследованиям генома (табл. 4), но возникает целый ряд вопросов, связанных с причинно-следственной связью, лежащей в основе этих выводов, а также относительно медицинского значения этих результатов.

Некоторые геномные анализы полигенных болезней, приведены в таблице 4 [59, 57, 70, 73, 75, 76]. Было проведено крупнейшее исследование, включающее 14000 пациентов, страдающих от семи болезней и 3000 человек общего контроля [75]. Запланированное исследование имело достаточную мощ-

ность для того, чтобы обнаружить ассоциации с низким коэффициентом отношения шансов, коэффициентом 1.5, и эти исследования обнаружили ряд ранее неизвестных и неожиданных генетических локусов восприимчивости. Наиболее интересным был факт, что некоторые из выявленных локусов восприимчивости являются общими для различных болезней, с указанием общей этиологии [70, 75–77]. Как показано в колонке 2 таблицы 4, наиболее важным приоритетом во многих геномных ассоциативных исследованиях было получение подтверждения сразу множества вопросов, насколько это возможно, видимо, чтобы избежать риска малой мощности исследований. Тем не менее, изучение методов разработки исследований, не менее важно, чем статистические возможности, в плане получения надежных и воспроизводимых данных [78,79].

Кроме того, были учтены некоторые общие вопросы, касающиеся таких типов анализов. Самое главное, разработана стратегия практических стандартов в этих исследованиях [80], которая, являлась уроком, извлеченным из полученных многочисленных данных за 20 лет исследований фармакогенетики и геномной ассоциации заболеваний. Способность к воспроизводимости является важным шагом, оправдывающим дальнейшие поисковые работы, но это не исключает некоторые систематические ошибки. Кроме того, также важны, как ложноположительный данные, так и ложнонегативные, и действительно, число генных вариантов не имеющих связи с различными заболеваниями (табл. 4), может быть довольно большим. Воспроизводимость исследований ген-ассоциированных болезней остается открытым, центральным вопросом. Причиной этого являются не только нерешенные вопросы многократного тестирования, но также и комплекс взаимодействий между

различными генами, а также между генами и факторами внешней среды (этническая принадлежность, сезон, место проведения и т. д.).

Важно, отметить, что ряд локусов были выявлены практически во всех исследованиях. Тем не менее, мы не будем рассматривать ассоциированные исследования генома как рецепт гарантированного успеха. В связи с известным феноменом публикационной предвзятости, мы не можем предположить, что все такие геномные исследования, в достаточной степени находятся в открытом доступе. Следует отметить, однако, что было одно отрицательное вспомогательное исследование, приведенное в таблице 4. Автор объяснял отсутствие значимых ассоциаций в исследовании тем, что исследования не были оптимальными для гипертензии, по-прежнему существуют недостатки тестирования вариантов и возможных мультифакториальных причин гипертензии, которые пока не могут быть обнаружены применяемыми подходами [68].

Как указано в таблице 4, многие отличия по конкретным заболеваниям, идентифицированные в ассоциативных исследованиях генома, были столь малы, что не имеют значения в лечении отдельных пациентов, но они могут дать новое представление об этих болезнях.

Исследование терапевтического эффекта лекарственных препаратов

Исследование болезней, ассоциированных с геномом, могут предоставить важные подсказки для дальнейших клинических фармакогенетических исследований, в которых мы захотим определить прогностические геномные маркеры ответа на терапию лекарственными препаратами или их побочные действия. Одна из проблем, возникающая во многих исследованиях лекарственного ответа это способность находить отличия между ответом на применение лекарственного препарата и различными формами естественного течения болезни. Это является особой проблемой при заболеваниях, с циклическим течением (обострение, ремиссия и т.д.).

Перспективы дальнейших исследований

Множество фактов накоплено после более чем 40 лет фармакогенетических и фармакогеномных исследований. Проведены многочисленные масштабные исследования генома в 2007 году и данные этих исследований будут оптимизированы для медицинского применения. Тем не менее фармакогенетические и геномные научные исследования базируются на едином принципе (рис. 4), и существует множество подходов для улучшения возможностей каждого из его этапов. С точки зрения клинической фармакологии, исследования должны начинаться с четко определенных и хорошо спланированных клинических исследований, и, должны заканчиваться усовершенствованием в лечении пациентов.



Рисунок 4. Основной принцип фармакогенетических и фармакогеномных исследований. Показанные здесь маршруты не могут быть единственными, но они должны показать, как различные подходы могут быть объединены для получения фармакогенетических знаний, являющихся ценными как для развития новой терапии, так и усовершенствования существующей.

Тем не менее, в процессе всего исследования должно применяться множество молекулярных и информационных наук. Наличие постоянной структуры фармакогенетических научных исследований с начала исследований (определения раковых CYP2D6-ассоциаций), и до новых ассоциированных исследований генома заключается в том, что генетические полиморфизмы по всей видимости, связаны с медицинскими фенотипами, но остается неясным, как именно это происходит. Поэтому существует потребность провести различие между теми ассоциациями, которые являются подлинными и ведущими к окончательным результатам, и те, в которых еще необходимо выяснить основные механизмы. Пока это требование не было выполнено.

Для таких целей хорошо подходят исследования фармакологии, но с успехом могут также применяться *ex vivo* исследования с использованием человеческих клеток. Например, было определено, что клеточные линии от генетически неродственных индивидуумов, из различных органов и тканей могут существенно помочь в функциональной проверке ОНП в клинико-генетических исследованиях фенотипических ассоциаций [81]. Лимфобластные и фибробластные клеточные линии из NapMar проекта, в которых уже генотипировали более 4000000 ОНП, в настоящее время в мире используются именно для таких исследований. В отличие от экспериментов с первичной клеткой, эти клетки позволяют проводить повторяющиеся измерения со всеми разными генотипами и в то же время в значительной степени улучшают возможность для межлабораторной проверки. Есть, конечно, ограничения с артефактами, которые могут возникать в связи с использованием бластных клеточных культур или с иммортализацией. Необходимо вести вне-

дрение других типов клеток. Экстракорпоральные подходы уже значительно изменили клиническую фармакологию. Например, взаимодействия лекарственных препаратов при их употреблении, не могут быть достаточно точно предсказаны в исследованиях лекарственного метаболизма *in vitro*. Аналогичные подходы разрабатываются в научных исследованиях фармакодинамики, относительно показаний и побочных эффектов лекарственных препаратов [82].

Что касается приоритетов в области научных исследований, определение генетических аберраций на пути трансдукции сигнала могут стать самыми интересными новыми направлениями, при изучении многих типов рака. Тем не менее, до сих пор существует сравнительно мало данных о влиянии полиморфизмов на внутриклеточную трансдукцию сигнальных путей. Основной проблемой сегодня для прогресса всей медико-биологической науки становится введение профессиональной специализации врачей, способной интегрировать подходы геномики, транскриптомики, протеомики, эпигеномики и клинических потребностей [83].

Литература

- Kalow W, Meyer UA, Tyndale R (2005) *Pharmacogenomics*, 2nd edn. Taylor & Francis, Oxford.
- Ayesh R, Idle JR, Ritchie JC, Crothers MJ, Hetzel MR (1984) Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature* 312:169–170.
- Roots I, Drakoulis N, Ploch M, Heinemeyer G, Loddenkemper R, Minks T, Nitz M, Otte F, Koch M (1988) Debrisoquine hydroxylation phenotype, acetylation phenotype, and ABO blood groups as genetic host factors of lung cancer risk. *Klin Wochenschr* 66[Suppl 11]:87–97.
- Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR (1988) Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7293–7297.
- Benhamou S, Lee WJ, Alexandrie AK, Boffetta P, Bouchardy C, Butkiewicz D, Brockmoller J, Clapper ML, Daly A, Dolzan V, Ford J, Gaspari L, Haugen A, Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kihara M, Kremers P, Le Marchand L, London SJ, Nazar-Stewart V, Onon-Kihara M, Rannug A, Romkes M, Ryberg D, Seidegard J, Shields P, Strange RC, Stucker I, To-Figueras J, Brennan P, Taioli E (2002) Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis* 23:1343–1350.
- Spinola M, Meyer P, Kammerer S, Falvella FS, Boettger MB, Hoyal CR, Pignatiello C, Fischer R, Roth RB, Pastorino U, Haeussinger K, Nelson MR, Dierkesmann R, Dragani TA, Braun A (2006) Association of the PDCD5 locus with lung cancer risk and prognosis in smokers. *J Clin Oncol* 24:1672–1678.
- Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, Axelrod N, Huang J, Kirkness EF, Denisov G, Lin Y, Macdonald JR, Pang AW, Shago M, Stockwell TB, Tsiamouri A, Bafna V, Bansal V, Kravitz SA, Busam DA, Beeson KY, McIntosh TC, Remington KA, Abril JF, Gill J, Borman J, Rogers YH, Frazier JE, Scherer SW, Strausberg RL, Venter JC (2007) The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol* 5:e254.
- The International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437:1299–320.
- Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, Burton J, Cox TV, Davies R, Down TA, Haefliger C, Horton R, Howe K, Jackson DK, Kunde J, Koenig C, Liddle J, Niblett D, Otto T, Pettett R, Seemann S, Thompson C, West T, Rogers J, Olek A, Berlin K, Beck S (2006) DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 38:1378–1385.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444:444–454.
- Kaiser R, Konneker M, Henneken M, Dettling M, Muller-Oerlinghausen B, Roots I, Brockmoller J (2000) Dopamine D4 receptor 48-bp repeat polymorphism: no association with response to antipsychotic treatment, but association with catatonic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 5:418–424.
- Tzvetkov MV, Meineke C, Oetjen E, Hirsch-Ernst K, Brockmoller J (2007) Tissue-specific alternative promoters of the serotonin receptor gene HTR3B in human brain and intestine. *Gene* 386:52–62.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM (2007) A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315:525–528.
- Conrad DF, Andrews TD, Carter NP, Hurles ME, Pritchard JK (2006) A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet* 38:75–81.
- Hinds DA, Kloek AP, Jen M, Chen X, Frazer KA (2006) Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Genet* 38:82–85.
- Khaja R, Zhang J, MacDonald JR, He Y, Joseph-George AM, Wei J, Rafiq MA, Qian C, Shago M, Pantano L, Aburatani H, Jones K, Redon R, Redon R, Armengol L, Estivill X, Murali RJ, Lee C, Scherer SW, Feuk L (2006) Genome assembly comparison identifies structural variants in the human genome. *Nat Genet* 38:1413–1418.
- McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC, Dallaire S, Gabriel SB, Lee C, Daly MJ, Altshuler DM (2006) Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet* 38:86–92.
- Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, MacAulay C, Ng RT, Brown CJ, Eichler EE, Lam WL (2007) A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet* 80:91–104.
- Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE (2007) Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genet* 8:639–646.
- Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994) Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300:271–276.
- Schaeffeler E, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM (2003) CYP2D6 genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan real-time PCR. *Hum Mutat* 22:476–485.
- Sprenger R, Schlagenhauser R, Kerb R, Bruhn C, Brockmoller J, Roots I, Brinkmann U (2000) Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics* 10:557–565.
- Cheng Q, Yang W, Raimondi SC, Pui CH, Relling MV, Evans WE (2005) Karyotypic abnormalities create discordance of germline genotype and cancer cell phenotypes. *Nat Genet* 37:878–882.
- Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, Cario G, Schrauder A, Zimmermann M, Welte K, Ludwig WD, Bartram CR, Zanger UM, Eichelbaum M, Schrappe M, Schwab M (2005) Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA* 293:1485–1489.
- Dolinoy DC (2007) Epigenetic gene regulation: early environmental exposures. *Pharmacogenomics* 8:5–10.
- Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G, McLeod HL (2000) Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics* 10:217–223.
- van Kuilenburg AB, Muller EW, Haasjes J, Meisma R, Zoetekouw L, Waterham HR, Baas F, Richel DJ, van Gennip AH (2001) Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common

- IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res* 7:1149–1153.
28. Ezzeldin HH, Lee AM, Mattison LK, Diasio RB (2005) Methylation of the DPYD promoter: an alternative mechanism for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in cancer patients. *Clin Cancer Res* 11:8699–8705.
 29. Noguchi T, Tanimoto K, Shimokuni T, Ukon K, Tsujimoto H, Fukushima M, Noguchi T, Kawahara K, Hiyama K, Nishiyama M (2004) Aberrant methylation of DPYD promoter, DPYD expression, and cellular sensitivity to 5-fluorouracil in cancer cells. *Clin Cancer Res* 10:7100–7107.
 30. Yu J, Shannon WD, Watson MA, McLeod HL (2005) Gene expression profiling of the irinotecan pathway in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 11:2053–2062.
 31. Zhang X, Soong R, Wang K, Li L, Davie JR, Guarcello V, Diasio RB (2007) Suppression of DPYD expression in RKO cells via DNA methylation in the regulatory region of the DPYD promoter: a potentially important epigenetic mechanism regulating DPYD expression. *Biochem Cell Biol* 85:337–346.
 32. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343:1350–1354.
 33. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843–854.
 34. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353:1793–1801.
 35. Schier AF (2007) The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* 316:406–407.
 36. Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS, Hatzigeorgiou AG, Antonarakis SE (2007) Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *Am J Hum Genet* 81:405–413.
 37. Dorsett Y, Tuschl T (2004) siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 3:318–329.
 38. Feng X, Zhao P, He Y, Zuo Z (2006) Allele-specific silencing of Alzheimer's disease genes: the amyloid precursor protein genes with Swedish or London mutations. *Gene* 371:68–74.
 39. Gonzalez-Alegre P, Bode N, Davidson BL, Paulson HL (2005) Silencing primary dystonia: lentiviral-mediated RNA interference therapy for DYT1 dystonia. *J Neurosci* 25:10502–10509.
 40. Miller VM, Xia H, Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson BL, Paulson HL (2003) Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7195–7200.
 41. Xia X, Zhou H, Huang Y, Xu Z (2006) Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit in vivo. *Neurobiol Dis* 23:578–586.
 42. Rodriguez-Lebron E, Paulson HL (2006) Allele-specific RNA interference for neurological disease. *Gene Ther* 13:576–581.
 43. Carlson RW, Moench SJ, Hammond ME, Perez EA, Burstein HJ, Allred DC, Vogel CL, Goldstein LJ, Somlo G, Gradishar WJ, Hudis CA, Jahanzeb M, Stark A, Wolff AC, Press MF, Winer EP, Paik S, Ljung BM (2006) HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations. *J Natl Compr Canc Netw* 4[Suppl 3]:S1–S22.
 44. Schnitt SJ (2006) Estrogen receptor testing of breast cancer in current clinical practice: what's the question? *J Clin Oncol* 24:1797–1799.
 45. Lamy PJ, Nanni I, Fina F, Bibeau F, Romain S, Dussert C, Penault-Llorca F, Grenier J, Ouafik LH, Martin PM (2006) Reliability and discriminant validity of HER2 gene quantification and chromosome 17 auesomy analysis by real-time PCR in primary breast cancer. *Int J Biol Markers* 21:20–29.
 46. Savino M, Garrubba M, Parrella P, Baorda F, Copetti M, Murgo R, Zelante L, Carella M, Valori VM, Santini SA (2007) Development of real-time quantitative reverse transcription-PCR for Her2 detection in peripheral blood from patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 384:52–56.
 47. Tse C, Brault D, Gligorov J, Antoine M, Neumann R, Lotz JP, Capeau J (2005) Evaluation of the quantitative analytical methods real-time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for determining HER-2 status in breast cancer patients. *Clin Chem* 51:1093–1101.
 48. Chu I, Arnaout A, Loiseau S, Sun J, Seth A, McMahon C, Chun K, Hennessy B, Mills GB, Nawaz Z, Slingerland JM (2007) Src promotes estrogen-dependent estrogen receptor alpha proteolysis in human breast cancer. *J Clin Invest* 117:2205–2215.
 49. Cheok MH, Evans WE (2006) Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6:117–129.
 50. Joyce T, Pintzas A (2007) Microarray analysis to reveal genes involved in colon carcinogenesis. *Expert Opin Pharmacother* 8:895–900.
 51. Miller LD, Liu ET (2007) Expression genomics in breast cancer research: microarrays at the crossroads of biology and medicine. *Breast Cancer Res* 9:206.
 52. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 242:84–89.
 53. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgeson S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376–380.
 54. Daly AK, Brockmüller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans WE, Gonzalez FJ, Huang JD, Idle JR, Ingelman-Sundberg M, Ishizaki T, Jacqz-Aigrain E, Meyer UA, Nebert DW, Steen VM, Wolf CR, Zanger UM (1996) Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics* 6:193–201.
 55. The International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437:1299–320.
 56. Marchini J, Howie B, Myers S, McVean G, Donnelly P (2007) A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet* 39:906–913.
 57. Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD (2005) The International HapMap Project Web site. *Genome Res* 15:1592–1593.
 58. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265.
 59. Warren LL, Hughes AR, Lai EH, Zaykin DV, Haneline SA, Bansal AT, Wooster AW, Spreen WR, Hernandez JE, Scott TR, Roses AD, Mosteller M (2007) Use of pairwise marker combination and recursive partitioning in a pharmacogenetic genome-wide scan. *Pharmacogenomics J* 7:180–189.
 60. Kulle B, Schirmer M, Toliat MR, Suk A, Becker C, Tzvetkov MV, Brockmoller J, Bickeboller H, Hasenfuss G, Numberg P, Wojnowski L (2005) Application of genomewide SNP arrays for detection of simulated susceptibility loci. *Hum Mutat* 25:557–565.
 61. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J (2005) Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308:385–389.
 62. Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA (2005) Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308:421–424.
 63. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Noureddine M, Gilbert JR, Schnetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA (2005) Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308:419–421.

64. Abecasis GR, Yashar BM, Zhao Y, Ghasvand NM, Zarepari S, Branham KE, Reddick AC, Trager EH, Yoshida S, Bahling J, Filippova E, Elner S, Johnson MW, Vine AK, Sieving PA, Jacobson SG, Richards JE, Swaroop A (2004) Age-related macular degeneration: a high-resolution genome scan for susceptibility loci in a population enriched for late-stage disease. *Am J Hum Genet* 74:482–494.
65. Weeks DE, Conley YP, Tsai HJ, Mah TS, Schmidt S, Postel EA, Agarwal A, Haines JL, Pericak-Vance MA, Rosenfeld PJ, Paul TO, Eller AW, Morse LS, Dailey JP, Ferrell RE, Gorin MB (2004) Age-related maculopathy: a genomewide scan with continued evidence of susceptibility loci within the 1q31, 10q26, and 17q25 regions. *Am J Hum Genet* 75:174–189.
66. Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P, Walters GB, Gudbjartsson DF, Stefansson H, Jonsson T, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Stefansdottir G, Masson G, Hardarson GA, Petursson H, Arnarsson A, Motallebipour M, Wallerman O, Wadelius C, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Jonasson F, Stefansson K (2007) Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science* 317:1397–1400.
67. Buch S, Schafmayer C, Volzke H, Becker C, Franke A, von Eller-Eberstein H, Kluck C, Bassmann I, Brosch M, Lammert F, Miquel JF, Nervi F, Wittig M, Roskopf D, Timm B, Holl C, Seeger M, ElSharawy A, Lu T, Egberts J, Fandrich F, Folsch UR, Krawczak M, Schreiber S, Nurnberg P, Tepel J, Hampe J (2007) A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nat Genet* 39:995–999.
68. the Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447:661–678.
69. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Sigurdsson A, Baker A, Palsson A, Masson G, Gudbjartsson DF, Magnusson KP, Andersen K, Levey AI, Backman VM, Matthiasdottir S, Jonsdottir T, Palsson S, Einarsson H, Gunnarsdottir S, Gylfason A, Vaccarino V, Hooper WC, Reilly MP, Granger CB, Austin H, Rader DJ, Shah SH, Quyyumi AA, Gulcher JR, Thorgerisson G, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K (2007) A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 316:1491–1493.
70. Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadóttir A, Gretarsdottir S, Holm H, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Baker A, Thorleifsson G, Kristjansson K, Palsson A, Blondal T, Sulem P, Backman VM, Hardarson GA, Palsdottir E, Helgason A, Sigurjonsson R, Sverrisson JT, Kostulas K, Ng MC, Baum L, So WY, Wong KS, Chan JC, Furie KL, Greenberg SM, Sale M, Kelly P, MacRae CA, Smith EE, Rosand J, Hillert J, Ma RC, Ellinger PT, Thorgerisson G, Gulcher JR, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K (2007) Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature* 448:353–357.
71. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Bostrom K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Rastam L, Speliotes EK, Taskiran MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjogren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Ricke D, Purcell S (2007) Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316:1331–1336.
72. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, Liew A, Khalil H, Chandrasekaran A, Davies LR, Li W, Tan AK, Bonnard C, Ong RT, Thalamuthu A, Pettersson S, Liu C, Tian C, Chen WV, Carulli JP, Beckman EM, Altshuler D, Alfreidsson L, Criswell LA, Amos CI, Seldin MF, Kastner DL, Klareskog L, Gregersen PK (2007) TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis—a genomewide study. *N Engl J Med* 357:1199–209.
73. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struwing JP, Morrison J, Field H, Luben R, Wareham N, Ahmed S, Healey CS, Bowman R, Meyer KB, Haiman CA, Kolonel LK, Henderson BE, Le Marchand L, Brennan P, Sangrajrang S, Gaborieau V, Odefrey F, Shen CY, Wu PE, Wang HC, Eccles D, Evans DG, Peto J, Fletcher O, Johnson N, Seal S, Stratton MR, Rahman N, Chenevix-Trench G, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Axelsson CK, Garcia-Closas M, Brinton L, Chanock S, Lissowska J, Peplonska B, Nevanlinna H, Fagerholm R, Eerola H, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Hunter DJ, Hankinson SE, Cox DG, Hall P, Wedren S, Liu J, Low YL, Bogdanova N, Schurmann P, Dork T, Tollenaar RA, Jacobi CE, Devilee P, Klijn JG, Sigurdson AJ, Doody MM, Alexander BH, Zhang J, Cox A, Brock IW, MacPherson G, Reed MW, Couch FJ, Goode EL, Olson JE, Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Uitterlinden A, Rivadeneira F, Milne RL, Ribas G, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Hopper JL, McCreddie M, Southey M, Giles GG, Schroen C, Justenhoven C, Brauch H, Hamann U, Ko YD, Spurdle AB, Beesley J, Chen X, Mannermaa A, Kosma VM, Kataja V, Hartikainen J, Day NE, Cox DR, Ponder BA (2007) Genome-wide association study identifies five novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447:1087–1093.
74. Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Kemp Z, Spain S, Penegar S, Chandler I, Gorman M, Wood W, Barclay E, Lubbe S, Martin L, Sellick G, Jaeger E, Hubner R, Wild R, Rowan A, Fielding S, Howarth K, Silver A, Atkin W, Muir K, Logan R, Kerr D, Johnstone E, Sieber O, Gray R, Thomas H, Peto J, Cazier JB, Houlston R (2007) A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet* 39:984–988.
75. Huang Y (2007) Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 26:183–201.
76. Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, de Knijff P, McPherson R, Bruschke AV, Lie KI, Kastelein JJ (1998) The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. *N Engl J Med* 338:86–93.
77. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS, McCarthy MI, Hattersley AT (2007) Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316:1336–1341.
78. Brockmoller J, Cascorbi I, Henning S, Meisel C, Roots I (2000) Molecular genetics of cancer susceptibility. *Pharmacology* 61:212–227.
79. Serretti A, Kato M, Kennedy JL (2007) Pharmacogenetic studies in depression: a proposal for methodologic guidelines. *Pharmacogenomics J*.
80. Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, Boerwinkle E, Hunter DJ, Thomas G, Hirschhorn JN, Abecasis G, Altshuler D, Bailey-Wilson JE, Brooks LD, Cardon LR, Daly M, Donnelly P, Fraumeni JF Jr, Freimer NB, Gerhard DS, Gunter C, Guttmacher AE, Guyer MS, Harris EL, Hoh J, Hoover R, Kong CA, Merikangas KR, Morton CC, Palmer LJ, Phimister EG, Rice JP, Roberts J, Rotimi C, Tucker MA, Vogan KJ, Wacholder S, Wijsman EM, Winn DM, Collins FS (2007) Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* 447:655–660.
81. Shukla SJ, Dolan ME (2005) Use of CEPH and non-CEPH lymphoblast cell lines in pharmacogenetic studies. *Pharmacogenomics* 6:303–310.
82. Shah RR (2005) Drug-induced QT interval prolongation—regulatory guidance and perspectives on hERG channel studies. *Novartis Found Symp* 266:251–280 discussion 280–285.
83. Merikangas KR, Risch N (2003) Genomic priorities and public health. *Science* 302:599–601.

Summary

THE EVOLUTION AND CURRENT CONDITION OF PHARMACOGENETIC RESEARCHES

I.P. Kaidashev, O.A. Shlykova, O.V. Izmaylova

Key words: pharmacogenetics, genes polymorphism, clinical pharmacology

Pharmacogenetics primarily deals with the therapeutic effects and adverse action consequences of medications, poisons and other chemical and environmental factors. However, shortly after the origination of pharmacogenetics, this area has extended: genetic polymorphisms have been thoroughly studied, not only with respect to these known effects, but also as factors in susceptibility to diseases in general. In many of these early studies the causes of the diseases were unknown. In parallel with the functional nature of the genes in pharmacogenetic studies, along with factors of metabolic enzymes, many other factors such as transport, DNA resumption, cell cycle regulation and signal transduction are considered. Total number of publications studying the relationship of polymorphisms with the risk of disease, are in large excess over those which study the polymorphisms in relation to the response to medications. These studies are analyzed and systematized in order to improve future strategies in pharmacogenetics and genomics research. The attention is focused upon the identification of genotypes which predispose to certain multifactorial and polygenic diseases.

Ministry of Public Health of Ukraine

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava

Матеріал надійшов до редакції 9.02.2011 р.