

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПОДХОД В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТОКСИКОЛОГИИ

Рембовский В.Р., Могилenkova Л.А., Бельтюков П.П.

ФГУП «Научно–исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико–биологического агентства России, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмолковский, ст. Капитолово, корп. №93, 8–(812)–449–61–68, niigpech@rihophe.ru

Резюме. Персонализированный подход в экспериментальной токсикологии расширяет перспективы токсиколого–гигиенической оценки опасных химических соединений с целью выявления индивидуальной чувствительности и особенностей их токсических эффектов с использованием генетических, геномных (эпигеномных) и других методов молекулярной диагностики для совершенствования ранней диагностики химически обусловленных заболеваний с целью сохранения здоровья лиц, контактирующих с этими веществами.

Ключевые слова: химическое вещество, токсичность, персонализированный подход, генотип, эпигеном.

PERSONALIZED APPROACH IN EXPERIMENTAL TOXICOLOGY

Rembovsky V.R., Mogilenkova L.A., Beltyukov P.P.

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal State Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency of Russia

Resume. A personalized approach in experimental toxicology expands the prospects of toxicological and hygienic assessment of hazardous chemical compounds in order to identify individual sensitivity and characteristics of their toxic effects using genetic, genomic (epigenomic) and other molecular diagnostic methods to improve early diagnosis of chemically caused diseases in order to maintain the health of individuals, in contact with these substances.

Key words: chemical substance, toxicity, personalized approach, genotype, epigenome

Введение. Логика развития токсикологии и фармакологии закономерно привела к осознанию необходимости учёта персональных особенностей субъекта воздействия химического фактора, как в исследовательской деятельности, так и при разработке рекомендаций для клинической практики.

Индивидуализированный подход, учитывающий сведения, полученные с использованием достижений молекулярной диагностики, активно внедряемый в клиническую практику [1–5], требует развития аналогичных принципов в экспериментальной и клинической токсикологии в качестве нового направления – персонализированной токсикологии. Это становится возможным благодаря использованию новой информации, получаемой в результате развития молекулярной медицины (целовое генотипирование, геномное секвенирование, эпигенетические исследования и т.п.) с целью выявления особенностей организма, определяющих индивидуальную реакцию на химическое воздействие.

Нами сформулирована концепция развития персонализированной токсикологии как самостоятельного междисциплинарного направления токсикологии [6, 7], основной целью которого является изучение индивидуальных генетических и эпигенетических механизмов реагирования организма на действие химических веществ (ХВ), их влияния на доклинические и клинические проявления интоксикаций и отдаленные эффекты, оценки индивидуального риска для здоровья, связанного с воздействием химического фактора.

В таблице 1 представлены основные отличия изучения влияния опасных ХВ с помощью персонализированной токсикологии от подходов, используемых в рамках традиционной токсикологии.

Таблица 1 – Общие и отличительные подходы к оценке токсичности опасных химических веществ в персонализированной и общей токсикологии

Показатель	Общая токсикология	Персонализированная токсикология
Пол, возраст	+	+
Фенотип	±	+
Генотип	–	+
Эпигенетические характеристики	–	±
Индивидуальные показатели токсичности для экспериментального животного (физиологические, биохимические, иммунологические, патоморфологические)		
фоновые уровни	±	+
в динамике воздействия	±	+
в восстановительный период	±	+
Использование биоматериала человека (в т.ч. рекомбинантных белков) для оценки роли индивидуальных характеристик (фенотип / генотип)	±	+

Терапия на основе генотипирования	$\pm$	+
Методы факторного анализа (главных компонент)	$\pm$	+
Оценка показателей:		
по усредненным данным	+	$\pm$
индивидуальным (групповым генотипам)	– ($\pm$)	+

Примечание. + – применяется в эксперименте; – – не применяется; $\pm$ – не всегда.

Реализация принципов персонализированной токсикологии в экспериментальных исследованиях ограничивается возможностями создания новых лабораторных моделей. Хорошо известны ограничения токсикологического моделирования на лабораторных животных, нередко существенно отличающихся особенностями метаболизма ХВ от человека, что ограничивает возможности экстраполяции экспериментальных данных, полученных в экспериментах на животных, на человека. Более перспективным направлением развития персонализированного подхода в экспериментальной токсикологии может считаться экспериментальное моделирование с использованием трансформированных клеточных линий, характеризующихся различиями в экспрессии ферментов, принимающих участие в метаболизме ХВ. Особенности метаболизма ХВ и лекарственных средств в зависимости от фенотипа могут также быть оценены на основе данных, полученных с использованием образцов микросомальной фракции печени, полученных от лиц с известными генетическими и фенотипическими характеристиками ферментов трансформации ксенобиотиков.

Одним из направлений развития моделирования в экспериментальной токсикологии может считаться создание трансгенных (и/или нокаутных) животных путём редактирования генома, позволяющих моделировать химически обусловленную патологию, сходную с заболеваниями человека при наличии особенностей метаболизма, связанных с индивидуальными генетическими характеристиками организма [8]. Решение вопросов индивидуального (группового) гигиенического нормирования ХВ с применением современных методов весьма проблематично из-за неопределенности в выборе патогенетически значимых параметров токсичности, рассчитанных для каждого подопытного животного в течение всего периода наблюдения (от фоновых значений до уровня в восстановительный период). При индивидуальной оценке воздействия токсиканта или комплекса ХВ встает вопрос подбора адекватных в первую очередь физиологических показателей (вес, поведенческие реакции, температура, частота дыхания, ЭКГ, пульс) и методов молекулярной диагностики (на основе генетических, эпигенетических, омиксных и других характеристик). Для понимания природы токсикодинамического эффекта необходимы сведения о поведении эндогенных продуктов

детоксикации ХВ в биологических жидкостях (например, в плазме, сыворотке крови, моче и др.), а также о возможном связывании их с белками.

Эффекты, наблюдаемые при воздействии ХВ на организм, зависят не только от прямого действия токсиканта на органы–мишени, но и от скорости образования, возможности кумуляции и элиминации токсичных метаболитов ксенобиотика. Очевидно, что скорость элиминации зависит от индивидуальной активности ферментов и ряда транспортных белков. Среди ферментов метаболизма ксенобиотиков, активность которых существенно влияет на скорость химических превращений и элиминации ХВ следует назвать цитохромы Р450, для которых известны токсикологически значимые субстраты, связанные с развитием патологии человека и эффективностью действия лекарственных средств (таблица 2). Важную роль играют эстеразы и ферменты, участвующие в конъюгации гидроксированных продуктов метаболизма ксенобиотиков (N–ацетилтрансферазы, уридилглюкуронилтрансферазы, сульфотрансферазы и др.).

Таблица 2 – Роль некоторых ферментов СYP450 и их связь с развитием патологии

Фермент	Маркерные субстраты и реакции	Ксенобиотики	Взаимосвязь с риском развития патологии
CYP1A1*	<i>O</i> –деэтилирование <i>Этоксирезорурфина</i>	ПАУ, диоксины, нитрозамины (преканцерогены)	Канцерогенез
CYP1A2*	<i>O</i> –деэтилирование <i>Этоксирезорурфина</i> и <i>фенацетина</i>	Гетероциклические и ароматические амины, ариламины, диоксины, пищевые мутагены	Канцерогенез, риск развития инфаркта миокарда
CYP1B1*	<i>Гидроксирование</i> <i>эстрадиола</i>	Диметилбензантрацен, эстрадиол	Канцерогенез
CYP2A6	<i>7–гидроксирование</i> <i>кумарина</i>	Никотин, некоторые канцерогены	Канцерогенез
CYP2C9*	<i>Гидроксирование</i> <i>S–варфарина,</i> <i>лосартана,</i> <i>толбутамида</i>	Многие лекарства	Побочные эффекты лекарств
CYP2C19*	<i>Гидроксирование</i> <i>S–мефенитоина</i> и <i>омепразола</i>	Многие лекарства	Изменения фармакокинетики, побочные эффекты лекарств
CYP2D6*	<i>O</i> –деэтилирование <i>декстрометорфана,</i> <i>гидроксирование</i> <i>буфуралола</i>	Многие лекарства	Изменения фармакокинетики, побочные эффекты лекарств
CYP3A4/5	<i>Гидроксирование</i> <i>тестостерона,</i>	Многие лекарства, пре– канцерогены,	Изменения фармакокинетики,

	<i>мидазолама, деметилование эритромицина</i>	компоненты пищи	побочные эффекты лекарств, канцерогенез
--	---	-----------------	---

Звёздочкой (*) обозначены цитохромы, для которых описаны генетические варианты, характеризующиеся разной активностью

На скорость элиминации в значительной степени влияют уровни экспрессии и изменения активности белков–транспортёров (P–gp, OATP, OAT, MRP и др.). Индивидуальные особенности элиминации токсиканта или продуктов его метаболизма могут существенно влиять на течение интоксикации.

Персонализированный подход в оценке токсических эффектов требует учёта влияния генетических особенностей белков, обеспечивающих не только биотрансформацию и элиминацию ксенобиотиков и продуктов их метаболизма, но и ряда факторов, оказывающих влияние на состояние иммунной системы и системы антиоксидантной защиты.

Доказательность индивидуальности в реализации токсических эффектов может быть достигнута при установлении надёжных ассоциаций между генетическими характеристиками, эпигенетическими модификациями нуклеиновых кислот и патологическими процессами, обусловленными воздействием ХВ [6]. Высокая чувствительность к действию токсичных ХВ может быть обусловлена как снижением, так и повышением активности ферментов биотрансформации при наличии полиморфизма соответствующих генов.

Для некоторых полиморфных вариантов цитохромов (CYP1A1, 1A2) характерно изменение уровней экспрессии при действии природных преканцерогенов – лигандов арилгидрокарбонового рецептора (AhR), который сам по себе является полиморфным белком и его эффекты зависят от особенностей изоформы. Для других (CYP3A4) – индукция может достигаться при действии барбитуратов, а снижение активности – в результате воздействия экстракта зверобоя или грейпфрутового сока. Для CYP2D6, CYP2C9 и CYP2C19 характерна значительная зависимость активности от генетического варианта.

Связь между активностью глутатион–S–трансфераз и химически обусловленной патологией (канцерогенез, бронхиальная астма) показана для «нулевых» генотипов GSTM1 и GSTT1, характеризующихся утратой ферментативной активности и некоторых полиморфных вариантов GSTP1. Для N–ацетилтрансфераз (NAT1, NAT2) показана связь между активностью ферментов и наличием генетических полиморфизмов, что также

может быть причиной химического канцерогенеза, обусловленного эффектами ароматических аминов и продуктов их метаболизма.

Считается, что индивидуальный ответ на воздействие ХВ на лабораторных животных связан с реализацией эффектов опосредуемых нейромедиаторами и цитокинами (дофамин, серотонин, норадреналин, NF- κ B), MAP-киназами, нейротрофическими факторами, факторами транскрипции. Это, в конечном счёте, обуславливает особенности реакций лабораторных животных на стресс, проявляющихся на уровне ЦНС и иммунной системы [9]. Компоненты каскада нейро–эндокринно–иммунных реакций оказывают влияние на регуляцию активности (и экспрессию) генов в ЦНС за счет эпигенетических модификаций, например, изменения скорости метилирования ДНК, компактизации–декомпактизации хроматина, нарушением регуляции некодирующих РНК (например, миРНК в ходе процессинга) и т.д. [6, 9, 10].

Эпигенетические механизмы могут обеспечивать динамичную и долговременную регуляцию нейрональных функций, поддержание нейронных сетей и регуляцию поведения. Описаны механизмы обратной связи между метилированием ДНК и ацетилированием гистонов. Метилирование H3K4, H3K9 и H3K27 играет важную роль в различных поведенческих реакциях на стресс, эти эпигенетические модификации регулируются гистоновыми метилтрансферазами. Наиболее подробно исследованными к настоящему времени в отношении эпигенетических изменений при формировании стрессовых реакций и постстрессорных состояний являются гены серотонинового транспортера Slc6a4 [13], кортикотропин–рилизинг–гормона [14], глюкокортикоидного рецептора – NR3C1 [15], нейротрофического фактора мозга – BDNF [11, 12]. Описаны молекулярные каскады клеточных ответов на стресс, включающие мобилизацию транспозонов [16], изменения работы митохондрий (синтез АТФ, регуляция синтеза белка) [17].

Индивидуальные особенности реагирования организма на воздействие химического фактора не ограничивается только эндогенными причинами, связанными с генетическими особенностями организма. В ряде случаев, принципиальное влияние на индивидуальную реакцию организма на воздействие ХВ может оказывать нарушенное соотношение макро– и микроэлементов в составе пищи и, главным образом, в питьевой воде.

Таким образом, в экспериментальной токсикологии моделирование ответа на воздействие ХВ для реализации принципа «персонализации» превращается в нетривиальную задачу, которая требует конструирования, разработки и валидации моделей на основе трансформированных клеточных линий, рекомбинантных белков и

MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 19 МАЯ 2020

специализированных (трансгенных) линий лабораторных животных. Это позволит создать материально–техническую и лабораторную базу для реализации токсикологических исследований ХВ с учетом генетически обусловленной чувствительности к действию химических агентов; проводить разработку индивидуальных (генетически обоснованных групповых) гигиенических нормативов ХВ, осуществлять поиск маркеров раннего выявления интоксикации – показателей, характеризующих персональную реактивность с учетом выявленных токсикогеномных маркеров.

Литература

1. Баранов В.С. Программа «Геном человека» как научная основа профилактической медицины / Вестник РАМН. 2000. № 10. С. 27–37.
2. Баранов В.С., Баранова Е.В. Эволюция молекулярной медицины: от электронного «генетического паспорта» до геномной электронной карты здоровья / Молекулярно–биологические технологии в медицинской практике. 2016. Т. 24. С. 3–17.
3. Hood L., Friend S.H. Predictive, personalized, preventive, participatory (P4) cancer medicine / Nat. Rev. Clin. Oncol. 2011. Vol. 8, № 3. P. 184–187.
4. Jain K.K. Textbook of Personalized Medicine / Hum. Press.: NY. 2015. 732 p. doi:10.1007/978–1–4939–2553–7
5. Hale V.G., Woo K., Lipton H.L. Oxymoron no more: the potential of nonprofit drug companies to deliver on the promise of medicines for the developing world // Health Affairs. 2005. Vol. 24. № 4. P.1057–1063. doi: 10.1377/hlthaff.24.4.1057
6. Рембовский В. Р., Могиленкова Л. А. Процессы детоксикации при воздействии химических веществ на организм. СПб.: Изд–во ПТУ. 2017. 383 с.
7. Рембовский В.Р., Могиленкова Л.А. Перспективы развития персонализированной токсикологии / Medline.ru. 2019. Т.20. С. 244–249.
8. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы) / Биомедицина. 2014. Т. 3. С. 4–22.
9. Дюжикова Н.А., Даев Е.В. Геном и стресс–реакция у животных и человека / Экологическая генетика. 2018. Т. 16. № 1. С. 4–26. doi: 10.17816/ecogen1614–26.
10. Gräff J., Kim D., Dobbin M.M., Tsai L.H. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes // Physiol. Rev. 2011. Vol. 91. № 2. P. 603–649. doi: 10.1152/physrev.00012.2010
11. Tsankova N.M., Berton O., Renthal W. et al. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action / Nat. Neurosci. 2006. Vol. 9, № 4. P. 519–525. doi: 10.1038/nn1659.
12. Tsankova N.M., Kumar A., Nestler E.J. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures / J. Neurosci. 2004. Vol. 24, № 24. P. 5603–5610. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0589–04.2004
13. Tsuji M., Miyagawa K., Takeda H. Epigenetic Regulation of Resistance to Emotional Stress: Possible Involvement of 5–HT1A Receptor–Mediated Histone Acetylation / J. Pharmacol. Sci. 2014. Vol. 125. № 4. С. 347–354. doi: 10.1254/jphs.14r07cp
14. Xu L., Sun Y., Gao L. et al. Prenatal restraint stress is associated with

MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 19 МАЯ 2020
demethylation of corticotrophin releasing hormone (CRH) promoter and enhances CRH transcriptional responses to stress in adolescent rats / *Neurochem. Res.* 2014. Vol. 39. № 7. P. 1193–1198. doi: 10.1007/s11064-014-1296-0.

15. Murgatroyd C., Spengler D. Epigenetic programming of the HPA axis: early life decides / *Stress*. 2011. Vol.14. №6. P.581–589. doi: 10.3109/10253890.2011.602146.

16. McGowan P.O., Hope T.A., Meck W.H. et al. Impaired social recognition memory in recombination activating gene 1-deficient mice / *Brain Res.* 2011. Vol. 1383. P.187–195. doi: 10.1016/j.brainres.2011.02.054.

17. Misiewicz Z., Iurato S., Kuleshkaya N., Salminen L. et al. Multi-omics analysis identifies mitochondrial pathways associated with anxiety-related behavior / *PLoS genetics*. 2019. Vol. 15. № 9. e1008358. doi: 10.1371/journal.pgen.1008358.

References

1. . Baranov V.S. Program “Human Genome” as a scientific basis for preventive medicine. *Medicines // Vestnik RAMN*. 2000. №10. P. 27–37 [in Russian].

2. Baranov V.S., Baranova E.V. Evolution of Molecular Medicine: from Electronic Genetic Passport to Genomic Electronic Health Records // *Molecular biologic technologies in medical practice [Molekulyarno-biologicheskie tekhnologii v meditsinskoy praktike]*. Novosibirsk: Akademizdat. 2016. Vol.24. P.3–17. [in Russian]

3. Hood L., Friend S.H. Predictive, personalized, preventive, participatory (P4) cancer medicine // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011. Vol. 8. № 3. P. 184–187.

4. Jain K.K. Textbook of Personalized Medicine // Humana Press, NY. 2015. 732 pp. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2553-7>

5. Hale V.G., Woo K., Lipton H.L. Oxymoron no more: the potential of nonprofit drug companies to deliver on the promise of medicines for the developing world // *Health Affairs*. 2005. Vol. 24. № 4. P.1057–1063. doi: 10.1377/hlthaff.24.4.1057

6. Rembovskij V.R., Mogilenkova L.A. Processy detoksikacii pri vozdeystvii himicheskikh veshhestv na organizm. SPb.: izd-vo Politehnicheskogo un-ta, 2017. 383 pp. [in Russian].

7. Rembovsky V.R., Mogilenkova L.A. Prospects for the development of personalized toxicology. *Medline.ru*. 2019. Vol.20. P. S244–S249 [in Russian].

8. Karkishchenko N.N., Rjabyh V.P., Karkishchenko V.N., Koloskova E.M. Creation of humanized mice for pharmacological and toxicological research (progress, failures and prospects) // *Biomedicine*. 2014. Vol. 3. P. 4–22.

9. Dyuzhikova N.A., Daev E.V. Genome and stress-reaction in animals and

- MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 19 МАЯ 2020
- humans / Ecological genetics. 2018. Vol.16. № 1. P. 4–26 [in Russian].
10. Gräff J., Kim D., Dobbin M.M., Tsai L.H. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes // *Physiol. Rev.* 2011. Vol. 91. № 2. P. 603–649. doi: 10.1152/physrev.00012.2010
 11. Tsankova N.M., Berton O., Renthal W. et al. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action / *Nat. Neurosci.* 2006. Vol. 9, № 4. P. 519–525. doi: 10.1038/nn1659.
 12. Tsankova N.M., Kumar A., Nestler E.J. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures / *J. Neurosci.* 2004. Vol. 24, № 24. P. 5603–5610. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0589–04.2004
 13. Tsuji M., Miyagawa K., Takeda H. Epigenetic Regulation of Resistance to Emotional Stress: Possible Involvement of 5-HT_{1A} Receptor-Mediated Histone Acetylation / *J. Pharmacol. Sci.* 2014. Vol. 125. № 4. C. 347–354. doi: 10.1254/jphs.14r07cp
 14. Xu L., Sun Y., Gao L. et al. Prenatal restraint stress is associated with demethylation of corticotrophin releasing hormone (CRH) promoter and enhances CRH transcriptional responses to stress in adolescent rats / *Neurochem. Res.* 2014. Vol. 39. № 7. P. 1193–1198. doi: 10.1007/s11064–014–1296–0.
 15. Murgatroyd C., Spengler D. Epigenetic programming of the HPA axis: early life decides / *Stress.* 2011. Vol.14. №6. P.581–589. doi: 10.3109/10253890.2011.602146.
 16. McGowan P.O., Hope T.A., Meck W.H. et al. Impaired social recognition memory in recombination activating gene 1–deficient mice / *Brain Res.* 2011. Vol. 1383. P.187–195. doi: 10.1016/j.brainres.2011.02.054.
 17. Misiewicz Z., Iurato S., Kuleshkaya N., Salminen L. et al. Multi–omics analysis identifies mitochondrial pathways associated with anxiety–related behavior / *PLoS genetics.* 2019. Vol. 15. № 9. e1008358. doi: 10.1371/journal.pgen.1008358.