

VYUŽITÍ PRINCIPU MENDELOVSKÉ RANDOMIZACE PŘI ODHALOVÁNÍ ETIOLOGICKÉ ROLE PROTEKTIVNÍCH LÁTEK VE VÝŽIVĚ

THE USE OF MENDELIAN RANDOMIZATION PRINCIPLE IN REVEALING THE ETHIOLOGICAL ROLE OF PROTECTIVE SUBSTANCES IN NUTRITION

Bencko Vladimír, Novotný Ladislav

Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF UK a VFN v Praze

SUMMARY

The associations between modifiable exposures and the disease in observational epidemiological studies remain partly biased. Mendelian randomization principle, which is the random distribution of parental genes to off-springs in meiosis during gametogenesis and at conception, represents a chance for methodology of evaluation of the causal relations between external cause and disease. The association between the disease and the genetic polymorphism studied reflects the biological relations between the suspected exposure and the disease or a protection phenomenon, and is generally less prone to the phenomenon of confounding and reverse causation. The use of Mendelian randomization principle has its limitations, it offers new possibilities to test causal relations and clearly shows that means invested into the Human genome project can contribute to the understanding and prevention of adverse effects of modifiable exposure to the human health.

Key words: genetic epidemiology, risk factors, causality, glutathione-S-transferase, brassica genus, isothiocyanate, lung carcinoma.

ÚVOD

I když se genetická epidemiologie těsněji dotýká poznání dědičných aspektů rizika onemocnění, individuální náchylnosti k nemoci a konečně i úplného poznání molekulární patogeneze, může také pomoci k širšímu poznání zevních determinant nemocí (dietní faktory, profesionální expozice, životní styl), které jsou relevantní pro celé populace, nikoli jen pro geneticky zranitelné subpopulace. Tento přístup byl v poslední době popsán jako "mendelovská randomizace" (1-6). Koncept "mendelovské randomizace" využívá druhý Mendelův zákon o segregaci alel při utváření gamet – dědičnost jednoho znaku je nezávislá na dědičnosti ostatních znaků, pokud nejsou v genové vazbě. Zobecnění a rozšíření tohoto principu vede k základnímu epidemiologickému předpokladu mendelovské randomizace, že rozložení dalších (negenetických) faktorů v populaci je nezávislé na genotypu. Očekávaným důsledkem je rovnoměrná distribuce negenetických faktorů mezi genotypy. Touto "randomizací" je možno omezit fenomén zavádění při hodnocení asociace expozice-nemoc. Dalším předpokladem je, že genetické polymorfismy produkují rozdíly ve fenotypech, jimiž odrážejí biologické vlivy ovlivnitelných zevních expozic, které zpětně alterují riziko onemocnění. Pro zkoumání vlivu podezřelé expozice na riziko nemoci či naopak protekce jsou nejvhodnější běžné polymorfismy s dobře charakterizovanou biologickou funkcí. Klíčovým předpokladem je, že distribuce polymorfismů nemá vztah k rozdělení zavádějících faktorů, zejména socioekonomickým a behaviorálním, které jsou nejpravděpodobněji odpovědné za zkreslené interpretace observačních epidemiologických studií (1).

Isothiokyanát a karcinom plic

Observační studie poskytly konzistentní doklady o protektivní roli zeleniny proti karcinomu plic, zejména brukvovitých druhů (*brassicaceae*, dříve křížaté - *cruciferae*), jako brokolice a zelí (7). Tato zelenina je bohatá na glukosinoláty, které jsou po mechanickém rozrušení při přípravě jídla a žvýkáním, uvolněnou rostlinnou myrosinázou rozštěpeny na řadu biologicky aktivních látek. Jednou z nich je skupina isothiokyanátů (ITC), které v experimentálních studiích na zvířatech projevily chemoprotektivní vlastnosti při vývoji experimentálního karcinomu plic. ITC jsou proto považovány za látky vysvětlující pozorovaný ochranný vliv konzumace brukvovitých u lidí (7),

který však nemohl být dosud interpretován jako definitivně protektivní v důsledku dostupnosti výsledků pouze relativně malých studií (8). ITC je v organismu přednostně eliminován glutathion-S-transferázami, zejména GSTM1 a GSTT1 (9), které se vyskytují také ve formě *null*. U jedinců s homozygotním *null* genotypem jsou enzymy inaktivní a v důsledku omezené biotransformace/eliminační kapacity by měly být koncentrace ITC v organismu vyšší.

Tab. 1. Odds ratios (OR a 95% interval spolehlivosti) pro karcinom plic podle konzumace brukvovité zeleniny a *null* genotypů GST u 2141 případů a 2168 kontrol (upraveno dle 10)

genotyp konzumace zeleniny	p / k N	všechny brukvovité ¹⁾	p / k N	zelí ²⁾	p / k N	brokolice a růžičková kapusta ³⁾
všechny genotypy						
příjem nízký	327/250	1 (reference)	367/296	1	1741/1758	1
-střední	677/754	0,77 (0,62-0,95)	668/740	0,80 (0,65-0,98)	249/261	1,04 (0,84-1,29)
- vysoký	1137/1164	0,78 (0,64-0,96)	1106/1132	0,83 (0,69-1,01)	145/149	0,87 (0,66-1,14)
GSTM1 <i>null</i>						
příjem nízký	161/103	1	184/128	1	845/801	1
-střední	330/352	0,65 (0,47-0,89)	323/342	0,69 (0,51-0,93)	113/117	0,98 (0,71-1,35)
- vysoký	531/531	0,67 (0,49-0,91)	515/516	0,73 (0,55-0,97)	61/68	0,72 (0,47-1,09)
GSTT1 <i>null</i>						
příjem nízký	58/37	1	65/46	1	285/270	1
-střední	115/133	0,67 (0,39-1,16)	117/127	0,79 (0,47-1,33)	33/41	0,80 (0,45-1,44)
- vysoký	167/174	0,63 (0,37-1,07)	158/171	0,73 (0,44-1,21)	22/33	0,55 (0,27-1,11)
GSTM1 <i>null</i> / GSTT1 <i>null</i>						
příjem nízký	28/10	1	31/15	1	147/138	1
-střední	60/69	0,26 (0,10-0,63)	62/67	0,37 (0,16-0,84)	17/18	0,91 (0,39-2,13)
- vysoký	87/92	0,28 (0,11-0,67)	82/89	0,42 (0,19-0,94)	11/15	0,35 (0,12-1,01)

p / k - počty případů a kontrol, *null* - homozygotní delece GST; nízký - příjem zeleniny menší než jednou za měsíc; střední - menší než jednou za týden; vysoký - alespoň jednou týdně. 1) adjustováno na věk, pohlaví, region a kouření jako balíčko-roky cigaret, 2) další adjustace na příjem brokolice a růžičkové kapusty, 3) Další adjustace na příjem zelí.

Princip mendelovské randomizace předpokládá, že role genů *GSTM1* a *GSTT1* jsou nezávislé na dalších faktorech, a tak omezuje možnost zavádění faktory dietními a faktory životního stylu. K objasnění role brukvovité zeleniny v prevenci rakoviny byla provedena rozsáhlá multicentrická studie 2135 případů rakoviny plic a 2142 kontrol v 6 zemích střední a východní Evropy, kde je vysoká konzumace tohoto druhu zeleniny obvyklá (10). Incidenční případy a náležité kontroly z nemocnic nebo populace byly získány z 15 center Polska, Slovenské a České republiky, Rumunska, Ruska a Maďarska. Standardizovaný dotazník obsahoval detaily životního stylu a údaje o frekvenci konzumace 23 druhů potravin, včetně tří položek brukvovité zeleniny (zelí, růžičková kapusta a/nebo brokolice) (11). Celkový protektivní efekt byl pozorován u těch, kteří konzumovali všechnu brukvovitou zeleninu "alespoň jednou týdně" ve srovnání s frekvencí konzumace "méně než jednou za měsíc" a byl podobný separovaně pro konzumaci zelí i brokolice/růžičkové kapusty. Když byla studovaná populace rozdělena podle genotypů *GST*, byl ochranný vliv vysoké konzumace brukvovité zeleniny omezen na *null* genotypy *GST* (Tabulka č. 1), nebyl pozorován u pozitivních genotypů *GSTM1* a *-T1* a byl jen mírně ochranný u těch, kteří měli pouze jeden *null* genotyp. Podobné asociace byly pozorovány odděleně u konzumace zelí a brokolice/růžičkové kapusty po vzájemné adjustaci, což naznačuje nezávislý protektivní vliv obou zeleninových zdrojů ICT. Tyto výsledky podporují hypotézu, že ochranný vliv brukvovité zeleniny je nejzřetelnější u osob, které mají nízké hladiny cirkulujících enzymů *GST* v důsledku přítomnosti *null* alel genů *GSTM1* a *-T1*. I když v této studii nebyla přímo měřena koncentrace ITC, tj. intermediární fenotyp, lze očekávat, že u *null* genotypů budou hladiny ITC v organismu při vyšším příjmu brukvovité zeleniny zvýšeny. ITC patří mezi známé aktivátory genů proteinů metabolismu II. fáze, závislých na působení transkripčního faktoru Nrf2 a na přítomnosti responsivních elementů ARE nebo EpRE,

(antioxidační nebo elektrofilní) (12). Protinádorový mechanismus zahrnuje také působení ITC na buněčný cyklus indukci zástavy G2/M fáze a utlumením aktivity regulátorů buněčného cyklu (13). Když se vezme v úvahu velikost ochranného vlivu v menších studiích karcinomu plic, zatížených rizikem ředění efektů chybou měření (13-16), a v této velké multicentrické studii, pak chemoprotektivní účinky brukvovité zeleniny a v uvedeném kontextu zejména isothiokyanátů jsou pozoruhodné.

DISKUSE

Principy „mendelovské randomizace“ se intuitivně využívají od 80. let. Asociační studie kandidátních genů byly navrženy právě k identifikaci kauzálních faktorů utvářejících komplexní znaky (např. tělesná hmotnost, krevní tlak, chronická onemocnění). Neměnnost genotypu poskytuje relativní ochranu před působením zavádějících faktorů a zpětné příčinnosti, které jsou běžné v analýze pouhého fenotypu. Nutným předpokladem nezkršené interpretace je požadavek, aby studovaný funkční polymorfismus produkoval pouze kvantitativní rozdíly v hladinách protektivního či rizikového faktoru, nikoli však kvalitativní rozdíly v jeho biologické funkci. Epigenetická regulace genové exprese hraje důležitou úlohu ve vývoji jedince *in utero* i postnatálně a může představovat cestu tlumení vlivů genetické variace (kanalizace). Na druhé straně se hromadí přesvědčivé nálezy o důležitosti epigenetických změn v procesu karcinogeneze, aterogeneze i vzniku metabolického syndromu, tedy u nejčastějších chronických onemocnění. Případně nekonzistentní nálezy, tj. neutrální nebo dokonce negativní nálezy vztahu genotyp-nemoc, které jsou v rozporu s obvyklou relací mezi intermediárním fenotypem a rizikem nemoci, nelze interpretovat jako selhání principu mendelovské randomizace. Jsou spíše výzvou k podrobnějšímu zkoumání vlivu genotypů na intermediární fenotyp a tím možnost získat přesnější informace o patogenetickém působení genů.

ZÁVĚR

Genetické studie asociací funkčních polymorfismů a ekvivalentních zevních expozic rizikovým či protektivním faktorů mohou přispět k objasnění mechanismů vzniku nemocí s nimi souvisejících a opodstatnění navrhovaných intervencí. Studie tohoto druhu jsou méně náchylné k fenoménu zavádění a reverzní kauzality, které jsou obvyklé v konvenční epidemiologii rizikových faktorů. V současné obvyklé situaci, kdy je realizace velkých randomizovaných studií obtížná, jsou snad optimálním řešením multicentrické studie schopné v relativně krátké době nashromáždit dostatečný počet případů a nezbytných kontrol (10). V postgenomické éře je genotypizace dostupná a využití principu mendelovské randomizace při návrhu a v analýze dat, často velmi pracně nashromážděných, epidemiologických studiích představuje cestu jak zefektivnit výzkum a zároveň zpřesnit výroky o nálezech v příslušných studiích. V hierarchii hledání příčin nemocí a kauzální prevence/léčby může být dobře navržená studie s mendelovskou randomizací, po zvážení shora uvedených omezení, rovnocenná randomizované klinické studii. Konzistentní nálezy relací: Intermediární fenotyp → nemoc a funkční genotyp → nemoc, mohou mít konfirmační význam. Observační studie může být využitím principu mendelovské randomizace v uvedeném kontextu lépe zhodnocena.

LITERATURA

1. Davey Smith, G., Ebrahim, S.: 30th Thomas Francis Jr Memorial Lecture. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int. J. Epidemiol.* 2003, 32, s. 1–22
2. Youngman, L.D., Keavney, B.D., Palmer, A. *et al.*: Plasma fibrinogen and fibrinogen genotypes in 4685 cases of myocardial infarction and in 6002 controls: test of causality by 'Mendelian randomization'. *Circulation* 2000, 102(Suppl.II), s. 31–32.
3. Clayton, D., McKeigue, P.M.: Epidemiological methods for studying genes and environmental factors in complex diseases. *Lancet* 2001, 358, s. 1356–60.
4. Fallon, U.B., Ben-Shlomo, Y., Davey Smith, G.: Homocysteine and coronary heart disease. *Heart Online* 14 March 2001 (<http://heart.bmjournals.com/cgi/eletters/85/2/153>)

5. Keavney, B.: Genetic epidemiological studies of coronary heart disease. *Int. J. Epidemiol.* 2002; 31, s. 730–36.
6. Asociace genotypu s nemocí a odhalování jejich prostředím ovlivnitelných příčin: využití principu mendelovské randomizace, *Čas. Lék. čes.* 2006, v tisku
7. World Cancer research Fund. *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective.* Washington: American Institute for Cancer research, 1997.
8. Hecht, S.S.: Chemoprevention of lung cancer by isothiocyanates. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996, 401, s. 1-11.
9. Cruciferous vegetables, isothiocyanates and indoles. *IARC Hanbook of Cancer Prevention, Volume 9.* 2004, 273 s.
10. Brennan, P., Hsu, C., Moullan, N., Szeszenia-Dabrowska, N. *et al.*: Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a mendelian randomisation approach. *Lancet* 2005, 366, s. 1558-1560.
11. Scelo, G., Constantinescu, V., Csiki, I. *et al.*: Occupational exposure to vinyl chloride, acrylonitrile and styrene and lung cancer risk (Europe). *Cancer Causes Control* 2004, 15, s. 445-452.
12. Talaly, P. Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D.: Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Advan. Enzyme Regul.* 2003, 43, s. 121-134.
13. Zhang, Y., Tang, L., Gonzalez, V.: Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2003, 2, s. 1045-1052.
14. London, S.J., Yan, J.M., Chung, F.L., *et al.*: Isothiocyanates, glutathione S-transferase-M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet* 2000, 356, s. 724-729.
15. Zhao, B., Seow, A., Lee, E.D.J., *et al.*: Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferases-M1, -T1 polymorphisms and lung cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2001, 10, s. 1063-1067.
16. Spitz, M.R., Duphorne, C.M., Detry, M.A., *et al.*: Dietary intake of isothiocyanates: Evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000, 9, s. 1017-1020.

Poděkování: Publikace vychází z dat získaných v rámci aktivit ve prospěch výzkumného projektu IARC, Lyon, Francie EC INCO-COPERNICUS IC15-CT96-0313, genotypizace byla podpořena projektem NCI Bethesda, USA, R01 CA 0-92039-01A2 a opírá se o referenci č. 10

Prof.. MUDr. Vladimír Bencko, DrSc.
 Studničkova 7, 128 00 Praha 2
 Fax +420 224 919 967
 e-mail: vladimir.bencko@lf1.cuni.cz