

На правах рукописи

ЯЛАЕВ БУЛАТ ИЛДУСОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ
ФАКТОРОВ ФОРМИРОВАНИЯ ОСТЕОПОРОЗА**

1.5.7 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Уфа - 2022

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики человека Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН)

Научный руководитель:

Хусаинова Рита Игоревна

Доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Глотов Андрей Сергеевич
Доктор биологических наук

Руководитель отдела геномной медицины
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научно-исследовательский
институт акушерства, гинекологии и репродуктологии
имени Д.О. Отта»

Солодилова Мария Андреевна
Доктор биологических наук

Доцент, профессор кафедры биологии, медицинской
генетики и экологии Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Курский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Северо-Западный государственный медицинский
университет им. И.И. Мечникова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «27» апреля 2022 года в « » часов на заседании диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 71, конференц-зал ИБГ УФИЦ РАН (ком. № 406).

С диссертацией можно ознакомиться на сайтах ВАК РФ и ИБГ УФИЦ РАН (<http://ibg.anrb.ru/dissertacionnyj-sovet/dissertacii-soiskatelej/>), email: molgen@anrb.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного
совета 24.1.218.01
доктор биологических наук, доцент



Гульназ Фаритовна Корытина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Остеопороз (ОП) (МКБ-10 – M80-M85) – это прогрессирующее многофакторное заболевание костной ткани из группы метаболических остеопатий, в основе которого лежит уменьшение костной массы, обусловленное снижением минеральной плотности костной ткани (МПКТ), а также нарушение микроархитектоники костей, возникающее вследствие патологических изменений трабекул в губчатой кости и пористости кортикальной кости (Аккави et al., 2018). Как следствие, возникает хрупкость костей и значительно увеличивается риск переломов. Основной причиной развития этих процессов является нарушение метаболизма, при котором катаболизм и костная резорбция начинают преобладать над остеобластогенезом и минерализацией костной ткани (Fogel-Samwald et al., 2020). В настоящее время растет количество пациентов с диагностированным остеопорозом по всему миру (Limin et al., 2017). Остеопороз и ассоциированные с ним переломы связаны с увеличением смертности, что представляет экономическую и социальную проблему для здравоохранения из-за длительного лечения и инвалидизации населения, а также сокращения продолжительности и снижения качества жизни (Wiedl et al., 2020).

На сегодняшний день актуальным является исследование популяционных и гендерных различий в молекулярном патогенезе первичного остеопороза, формирования переломов, низкого уровня МПКТ и ответа на терапию в зависимости от индивидуального генетического профиля пациентов. Исследование генетической архитектуры остеопороза с использованием технологии полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) выявило порядка 60 маркеров риска развития заболевания, которые по отдельности имеют незначительный эффект (Styrkarsdottir et al., 2008; Rivadeneira et al., 2009; Zheng et al., 2011; Estrada et al., 2012). При многофакторном заболевании маловероятно существование распространенных генетических вариантов с большим эффектом, в то время как идентификация редких вариантов является трудоемким процессом. Актуальной задачей является определение менее распространенных вариантов с умеренным эффектом для выявления отсутствующей (пропущенной) наследственности остеопороза. Недостающее звено молекулярного патогенеза ОП может быть связано с нарушением сродства микроРНК в мРНК таргетных генов и изменением профиля метилирования в ряде генов костного ремоделирования (Cheng et al., 2019).

Таким образом, несмотря на существенные успехи в определении молекулярного патогенеза остеопороза, остается ряд ключевых вопросов о генетической архитектуре заболевания, что приводит к необходимости дальнейшего комплексного анализа генетических и эпигенетических факторов ОП с применением современных возможностей биоинформатического анализа с учетом гендерных и региональных особенностей генофонда коренных народов Волго-Уральского региона.

Степень разработанности исследования. За последние пять десятилетий история изучения генетики остеопороза прошла несколько этапов: оценка наследуемости, исследование генов-кандидатов, полногеномных ассоциаций и секвенирование отдельных

участков генома. Близнецовые исследования в 1980-90 гг. показали, что до 80% вариабельности уровня МПКТ и около 35% переломов обусловлены наследственными факторами (Clark et al., 2015; Nguyen et al., 2020). Однако, выявленные закономерности не позволяют прогнозировать тяжесть течения заболевания и эффективность лечения ОП. Существуют популяционные и региональные различия в распределении частот полиморфных вариантов генов, вовлеченных в патогенез остеопороза, что приводит к противоречивым данным об ассоциациях ДНК-локусов с остеопорозом (Marini et al, 2014; Marozik et al., 2019).

Исследования молекулярно-генетической архитектуры метаболических остеопатий, в том числе и остеопороза, проводились на базе Института Биохимии и генетики УФИЦ РАН в течение последних 15 лет (Селезнева и др., 2008; Хусаинова и др., 2015). Благодаря этим работам идентифицированы маркеры риска переломов в целом у женщин Волго-Уральского региона, этноспецифические маркеры для женщин татарской этнической принадлежности, выявлены ассоциации ряда полиморфных вариантов с переломами позвонков и шейки бедра. Впервые выявлены ассоциации полиморфных локусов сайтов связывания микроРНК мРНК таргетных генов с переломами, разработаны несколько клинико-генетических моделей. Эти данные вносят существенный вклад в понимание молекулярно-генетических основ ОП, но вопросы разработки ранней диагностики остеопороза с использованием генетических маркеров, оценки вклада эпигенетических механизмов в патогенез данного заболевания, а также поиска высокоспецифичных фармакогенетических локусов чувствительности к антирезорбтивной терапии по-прежнему остаются актуальными.

Цель исследования. Поиск генетических, эпигенетических маркеров развития остеопоретических переломов и низкого уровня минеральной плотности костной ткани в отдельности и в коморбидном состоянии, а также ответа на антирезорбтивную терапию остеопороза с учетом гендерных и этнических факторов у женщин и мужчин из Волго-Уральского региона России.

Задачи исследования:

1. Поиск ассоциаций полиморфных вариантов rs3102735, rs3134069, rs2073617, rs2073618, rs3102734, rs7844539 гена остеопротегерина (*OPG*), rs1544410 гена рецептора витамина Д (*VDR*) с переломами, низким уровнем МПКТ в отдельности и в коморбидном состоянии у женщин и мужчин с учетом их этнической принадлежности.
2. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК в мРНК структурных генов костной ткани *COL1A1* (rs1061947), *COL11A1* (rs1031820), *COL11A1* (rs9659030) и генов, участвующих в метаболизме соединительной и костной ткани: *VDR* (rs11540149), *FGF2* (rs6854081), *SOX9* (rs1042673), *ZNF239* (rs10793442), *TPD52* (rs10098470), *SPARK* (rs1054204), *FBXO5* (rs1712) и *MMP1* (rs5854) с переломами, низким уровнем МПКТ в отдельности и в сочетании у женщин и мужчин с учетом их этнической принадлежности.

3. Поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов микроРНК *miR-146-a* (rs2910164) и *miR-196-a-2* (rs11614913) с переломами, низким уровнем МПКТ в отдельности и в коморбидном состоянии у женщин и мужчин с учетом их этнической принадлежности.
4. Разработка комплексных прогностических моделей остеопоротических переломов и низкого уровня минеральной плотности костной ткани на основе анализа клинко-генетических предикторов у женщин и мужчин из Волго-Уральского региона России.
5. Оценка профиля метилирования промоторных регионов генов *RANKL*, *COPZ2*, *RUNX2* и *SOST* у женщин с остеопоротическими переломами при низком уровне минеральной плотности костной ткани и поиск ассоциаций с постменопаузальным остеопорозом.
6. Анализ ассоциаций локусов rs2297480 гена фарнезил-дифосфат синтазы (*FDPS*), rs2282679 гена витамин-Д-связывающего белка (*DBP*), rs1544410 гена рецептора витамина Д (*VDR*) и rs1801197 гена рецептора кальцитонина (*CALCR*) с динамикой уровня минеральной плотности костной ткани и витамина Д на фоне антирезорбтивной терапии.
7. Полигенная оценка риска переломов в целом, различных локализаций, низкого уровня минеральной плотности костной ткани в отдельности и в коморбидном состоянии на основе анализа 140 полиморфных локусов генов-кандидатов и данных репликации полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) с учетом этнической принадлежности.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное исследование генетических и эпигенетических факторов риска развития переломов и формирования низкого уровня минеральной плотности костной ткани в целом и с учетом локализации патологического процесса у мужчин и женщин из Волго-Уральского региона с учетом гендерных и этнических факторов на основе изучения полиморфных вариантов гена остеопротегерина, витамина Д, сайтов связывания микроРНК, профиля метилирования ДНК в таргетных генах, вовлеченных в костный метаболизм, а также в фармакогенетический ответ на антирезорбтивную терапию. Впервые использован метод полигенной оценки риска развития остеопороза на основе 140 локусов кандидатных генов и результатов полногеномного анализа ассоциаций (GWAS). Впервые построены полигенные шкалы риска развития ОП и установлены модели прогнозирования переломов с учетом уровня МПКТ у женщин из Волго-Уральского региона в целом, а также у женщин русской и татарской этнической принадлежности. Впервые выявлена ассоциация пониженного уровня метилирования гена *RUNX2* с переломами и низким уровнем МПКТ в коморбидном состоянии у женщин.

Научно-практическая значимость работы. Результаты поиска генетических и эпигенетических маркеров остеопороза вносят значительный вклад в понимание молекулярных механизмов риска развития переломов и низкого уровня минеральной плотности костной ткани у мужчин и женщин из Волго-Уральского региона России. Полученные данные имеют высокую практическую значимость. На основе метода полигенной оценки риска разработаны модели с высоким потенциалом для ранней диагностики остеопороза с использованием ДНК-маркеров и внедрения в клиническую практику, что

позволит проводить скрининг и выявлять людей, предрасположенных к развитию остеопороза, с целью мониторинга и проведения профилактических мероприятий с учетом этнического компонента популяций Волго-Уральского региона. Результаты исследования могут использоваться при подготовке специалистов медико-биологического профиля в высших учебных заведениях и при постдипломной подготовке врачей.

Методология и методы исследования. Методология исследования состоит в использовании системного подхода на основе комплексного молекулярно-генетического исследования, а также анализа литературных данных отечественных и зарубежных авторов в области генетики остеопороза. Для проведения данной работы использованы репрезентативные выборки мужчин и женщин, опрошенные по специально разработанным анкетам, позволяющим выявлять этническое происхождение, клинический анамнез и информацию о течении и лечении заболевания. Все участники подписали информированное согласие на включение в исследование в соответствии со стандартами, разработанными Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (WMA) «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования», а также с одобрения локального биоэтического комитета Института биохимии и генетики УФИЦ РАН (протокол №14 от 15.09.2016). Используются современные методы исследования: выделение геномной ДНК фенольно-хлороформной экстракцией, полимеразная цепная реакция синтеза ДНК в режиме реального времени по технологии генотипирования KASP™, пиросеквенирование на платформе PyroMark Q24. Применены современные методы статистического анализа: логистический регрессионный анализ, ROC-анализ и полигенная оценка риска с применением пакетов программ PLINK и Rstudio.

Положения, выносимые на защиту:

1. Полиморфные варианты rs3102734, rs3134069 гена *OPG* являются генетическими маркерами переломов в целом и периферийных костей у женщин, rs7844539 – низкого уровня МПКТ позвоночника у женщин и rs2073618 – у мужчин.
2. Лocus сайты связывания микроРНК являются маркерами риска переломов в целом у мужчин (rs1031820), у женщин русского происхождения (rs10098470), шейки бедра у мужчин и женщин (rs6854081), шейки бедра у женщин (rs10098470, rs6854081) и мужчин русского происхождения (rs11540149), позвоночника у мужчин (rs1031820, rs10098470) и женщин (rs11540149), лучевой кости у мужчин (rs11540149) и женщин (rs6854081), низкого уровня МПКТ позвоночника у мужчин русского происхождения (rs5854).
3. Полиморфный вариант rs2910164 гена *miR-146a* является маркером повышенного риска переломов позвоночника у женщин в целом и шейки бедра у женщин татарского происхождения, rs11614913 гена *miR-196-a-2* – переломов у мужчин в целом и низкого уровня МПКТ позвоночника у мужчин русского происхождения.
4. Клинико-генетические модели прогнозируют переломы шейки бедра у мужчин и женщин и позвоночника у мужчин.

5. Гипометилирование промоторного региона гена *RUNX2* является маркером переломов при низком уровне МПКТ у женщин постменопаузального возраста из Волго-Уральского региона России.
6. Модели на основе оценки полигенного риска прогнозируют развитие постменопаузального остеопороза в целом, переломов и низкого уровня МПКТ по отдельности у женщин из Волго-Уральского региона, а также у женщин татарского и русского происхождения.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается применением современных молекулярно-генетических и статистических методов исследований, репрезентативностью выборки и объемом проделанной работы. Результаты согласуются с данными, представленными в отечественной и зарубежной литературе. Выводы соответствуют поставленным задачам и отражают полученные результаты. Результаты представлены на разных конференциях, в том числе XXV международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018» Москва, 2018; II всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии», Уфа, 2018; VIII международной школе молодых учёных по молекулярной генетике «Генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем», Звенигород, 2018; VIII всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы внутренней патологии. Дисплазии соединительной ткани», Омск, 2019; международной научной конференции студентов, магистрантов и молодых учёных «Генетика XXI века», Уфа, 2019; VII Российском конгрессе по остеопорозу, остеоартриту и другим метаболическим заболеваниям скелета с международным участием, Ярославль, 2020; конгрессе «World congress on osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases», Барселона, 2020; виртуальном конгрессе «The European Calcified Tissue Society Digital congress», 2021; IX съезде российского общества медицинских генетиков, Москва, 2021; XXVIII международной научной конференции «Ломоносов-2021», Москва, 2021.

Личный вклад автора в проведенные исследования. Автор совместно с научным руководителем д.б.н., доц. Хусаиновой Р.И. участвовал в определении темы, цели и задач диссертационной работы, самостоятельно изучил отечественную и зарубежную литературу по теме диссертации, лично написал рукопись данной работы, работал над написанием статей по обзору литературы и результатам диссертационного исследования. Соискатель самостоятельно проводил анкетирование участников исследования, сбор биологического материала, генотипирование исследуемых образцов ДНК, статистический анализ и обобщение полученных результатов. Процент участия в работе составляет более 90%.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликована 21 печатная работа, в том числе 8 статей в журналах, входящих в перечень ВАК, в числе которых 3 статьи в журналах, индексируемых Scopus и Web of Science.

Соответствие диссертации паспорту научной деятельности. Работа соответствует формуле специальности 1.5.7. – генетика, биологические науки. Исследованы молекулярно-генетические основы ОП, проведен поиск генетических и эпигенетических маркеров остеопоротических переломов различных локализаций, низкого уровня МПКТ в отдельности и в коморбидном состоянии. Используются современные методы молекулярно-генетического и статистического анализа, позволяющие выявить генетическую предрасположенность к развитию заболевания.

Структура и объем работы. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, библиографический список и приложение. Список литературы включает 172 источника, среди них – 10 отечественных и 162 зарубежных. Работа изложена на 277 страницах машинописного текста, содержит 49 рисунков и 83 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования. В исследовании были использованы образцы ДНК 1463 индивидов, проживающих в Республике Башкортостан и Свердловской области: 987 женщин постменопаузального возраста ($61,9 \pm 7,9$) и 476 мужчин старше 45 лет ($62 \pm 10,8$). Формирование выборки осуществлялось на базе Городских клинических больниц №5, №21 и №22 г. Уфы и Областной клинической больницы №1 г. Екатеринбурга. Этнический состав женщин: 67% русских и 33% татар, мужчин: 72% русских, 28% метисов от браков русских и татар. Группа женщин с переломами состояла из 417 человек, без переломов – 570. У 781 женщины проведено измерение уровня МПКТ (шейки бедра – у 539, поясничного отдела позвоночника – у 555). Группа мужчин с переломами состояла из 158 человек, контроля – 200. У 431 мужчины проведено измерение уровня МПКТ в шейке бедра, у 440 мужчин – поясничного отдела позвоночника.

Методы исследования. Выделение ДНК проводили методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew et al., 1984). Реакцию амплификации полиморфных локусов гена *OPG*, сайтов связывания микроРНК, генов микроРНК и генов чувствительности к антирезорбтивной терапии проводили с использованием конкурентной аллель-специфической ПЦР в реальном времени и технологии KASP-генотипирования. Бисульфитную конверсию проводили термоциклированием образцов ДНК в составе реакционной смеси наборов EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit, очистку конвертированной ДНК на спиновых колонках MinElute с использованием набора EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit производства QIAGEN®. Полимеразную цепную реакцию конвертированной ДНК проводили с использованием 2 праймеров, один из которых биотинилирован, с использованием набора PyroMark PCR Kit, пиросеквенирование – секвенирующим праймером с использованием набора PyroMark Gold Q24 Reagents на платформе Pyromark Q24. Работа частично выполнена на оборудовании ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК». Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

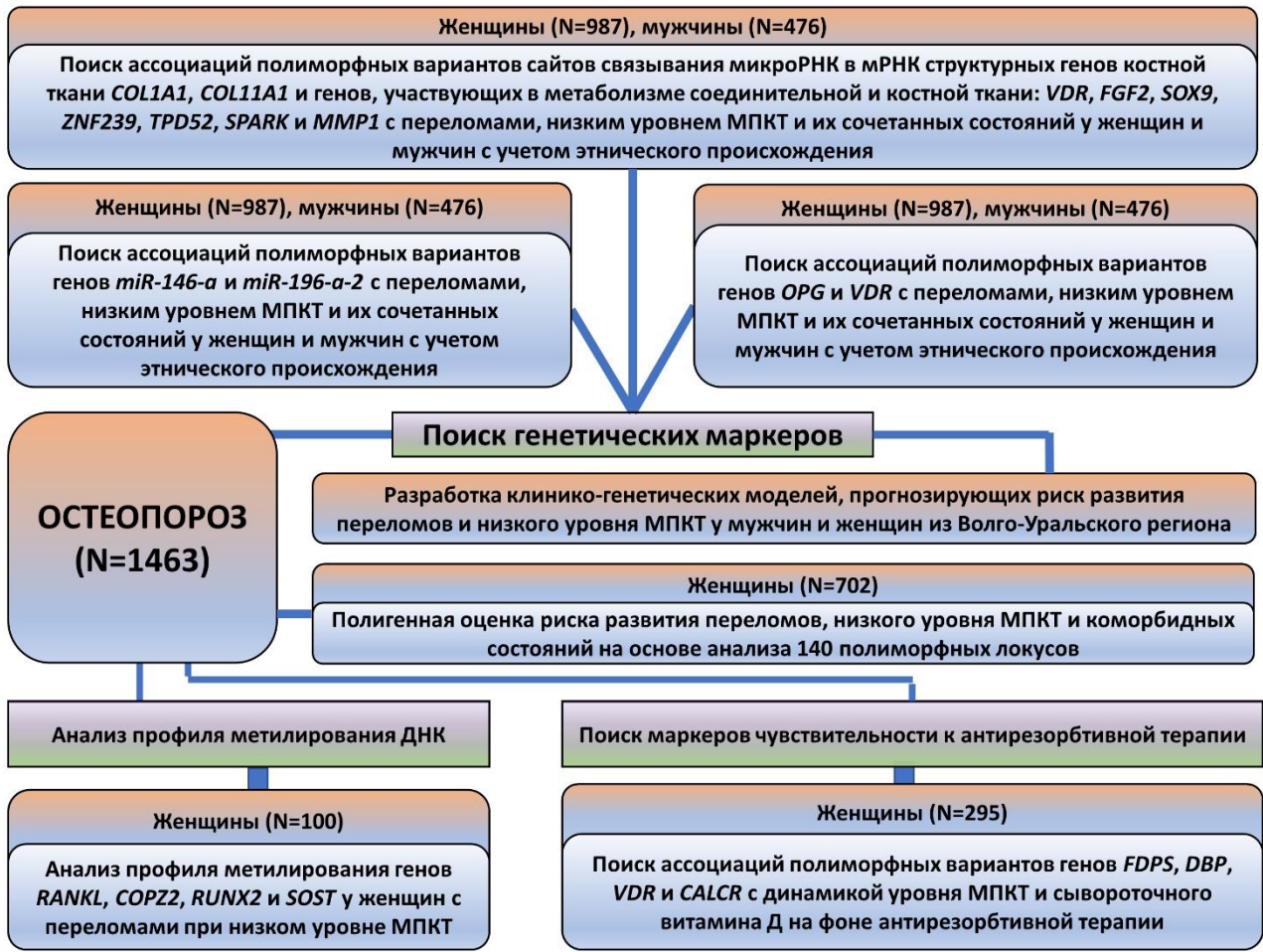


Рисунок 1 – Блок-схема дизайна исследования.

Статистическая обработка данных. Для поиска ассоциаций аллелей и генотипов с переломами и низким уровнем МПКТ по типу «случай-контроль» применено программное обеспечение PLINK 1.09 с использованием критерия согласия Пирсона. Степень ассоциации оценивалась в значениях показателя отношения шансов odds ratio (OR). Коррекцию на множественное тестирование проводили методикой Бенджамини-Хохберга (FDR). Тесты выполнялись для двустороннего уровня значимости, статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$, где p – уровень значимости критерия. Логистический регрессионный анализ проводился по типу «случай-контроль» (в роли предикторов – рисковые аллели полиморфных локусов, в роли зависимой переменной – переломы и низкий уровень МПКТ по отдельности и в сочетанном состоянии на базе PLINK 1.09. Поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов чувствительности к аминокислотам и витамину Д на фоне антирезорбтивной терапии проводился с использованием метода DID-регрессии (метод разность разностей Difference-in-differences). Эффект воздействия определяется как разность между изменением результирующей переменной в группе воздействия и ее изменением в контрольной группе. Для анализа значимых сдвигов уровня минеральной плотности костной ткани в ответ на прием бисфосфонатов и витамина Д до и после лечения применялся тест Вилкоксона. Оценка полигенного риска выполнялась путем вычисления суммы аллелей риска у индивидуума, взвешенной по величине эффектов аллелей риска через данные логистической

регрессии. Для определения качества полученной модели прогнозирования применяли ROC (Receiver Operating Characteristics) на базе программного обеспечения RStudio 1.4.1717 – анализ, при котором оценивалась чувствительность и специфичность модели, а также показатель AUC (Area Under Curve). Полигенная оценка риска включала контроль качества базовых данных с исключением полиморфных локусов, находящихся в неравновесии по сцеплению и не поддерживающих равновесие Харди-Вайнберга. Полигенный балл вычислялся на основе размера «весов», получаемых из данных анализа логистической регрессии для определения показателя эффекта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено изучение полиморфных вариантов генов *OPG*, *VDR*, сайтов связывания микроРНК в таргетных генах и генах микроРНК, профиля метилирования генов *RUNX2*, *COPZ2*, *RANKL*, *SOST* и проведена полигенная оценка риска 140 ДНК-локусов для разработки моделей прогнозирования остеопороза. Кроме того, проведена оценка динамики уровня МПКТ шейки бедра и поясничного отдела позвоночника при различных генотипах локусов rs2297480 (*FDPS*), rs2282679 (*DBP*), rs1544410 (*VDR*) и rs1801197 (*CALCR*) на фоне антирезорбтивной терапии.

Поиск ассоциаций полиморфных вариантов гена остеопротегерина с переломами и низким уровнем минеральной плотности костной ткани

Проведен анализ полиморфных вариантов rs3102735 (с.-1010A>G), rs3134069 (с.-928T>G), rs2073617 (с.-223C>T), rs2073618 (с.9C>G, р.Asn3Lys), rs3102734 (с.30+15C>T) и rs7844539 (с.817+8A>C) гена *OPG* в выборках женщин и мужчин и поиск ассоциаций с переломами в целом, различных отделов скелета, уровнем МПКТ в целом, а также варибельности уровня МПКТ позвоночника и шейки бедра. Частоты редких аллелей (MAF) изученных локусов гена *OPG* варьируют от 0,06 по локусу rs3134069 у мужчин до 0,493 по локусу rs2073618 у женщин, по всем локусам сохранялось равновесие Харди-Вайнберга.

Обнаружено, что аллель *Т полиморфного варианта rs3134069 гена *OPG* ($\chi^2=11,463$, OR=1,968, ДИ=1,322-2,929, $p=0,0007$, $p_{\text{fdr}}=0,0125$), аллель *Т ($\chi^2=8,797$, OR=1,789, ДИ=1,213-2,639, $p=0,003$, $p_{\text{fdr}}=0,013$) и генотип *Т*Т полиморфного варианта rs3102734 значимо ассоциированы с переломами в целом ($\chi^2=11,003$, OR=2,002, ДИ=1,321-3,033, $p=0,0009$, $p_{\text{fdr}}=0,01$), генотип *Т*Т rs3134069 (с.-928T>G) – с переломами периферических отделов скелета у женщин ($\chi^2=8,676$, OR=1,957, ДИ=1,245-3,076, $p=0,003$, $p_{\text{fdr}}=0,0129$) (рис. 2).

Множество исследований посвящено изучению полиморфных вариантов гена *OPG* при остеопорозе, тем не менее, результаты противоречивы. Для женщин с генотипом *С*С локуса rs3102735 гена *OPG* риск переломов увеличивается в 17 раз (Юренева и др., 2015). Генотип *А*G полиморфизма -163A/G (rs3102735) гена *OPG* повышал риск возникновения остеопоретических переломов позвоночника у женщин в постменопаузе (Myakotkin et al., 2011). По данным работы Юрeneuveй и ее коллег (2015), полиморфные варианты rs3102735 и

rs4355801 были ассоциированы с риском развития переломов дистального отдела лучевой кости независимо от показателей минеральной плотности костной ткани (Юренева и др., 2015). В нашем исследовании данные ассоциации не подтвердились. Ассоциации локусов rs3134069 и rs2073618 с переломами позвонков частично согласуются с нашими результатами (Langdahl et al., 2002). Выявлена ассоциация аллеля *C rs7844539 с низким уровнем МПКТ в поясничном отделе позвоночника у женщин ($\chi^2=5,071$, OR=1,981, ДИ=1,084-3,623, $p=0,024$ ($p_{\text{fdr}}=0,073$)), суммы генотипов *C*G+*G*G локуса rs2073618 ($\chi^2=4,201$, OR=1,732, ДИ=1,021-2,937, $p=0,040$ ($p_{\text{fdr}}=0,120$)) – у мужчин. В европейских популяциях обнаружены ассоциации уровня МПКТ с локусами rs2073618 и rs3134069 (Gonzalez-Mercado et al., 2019).

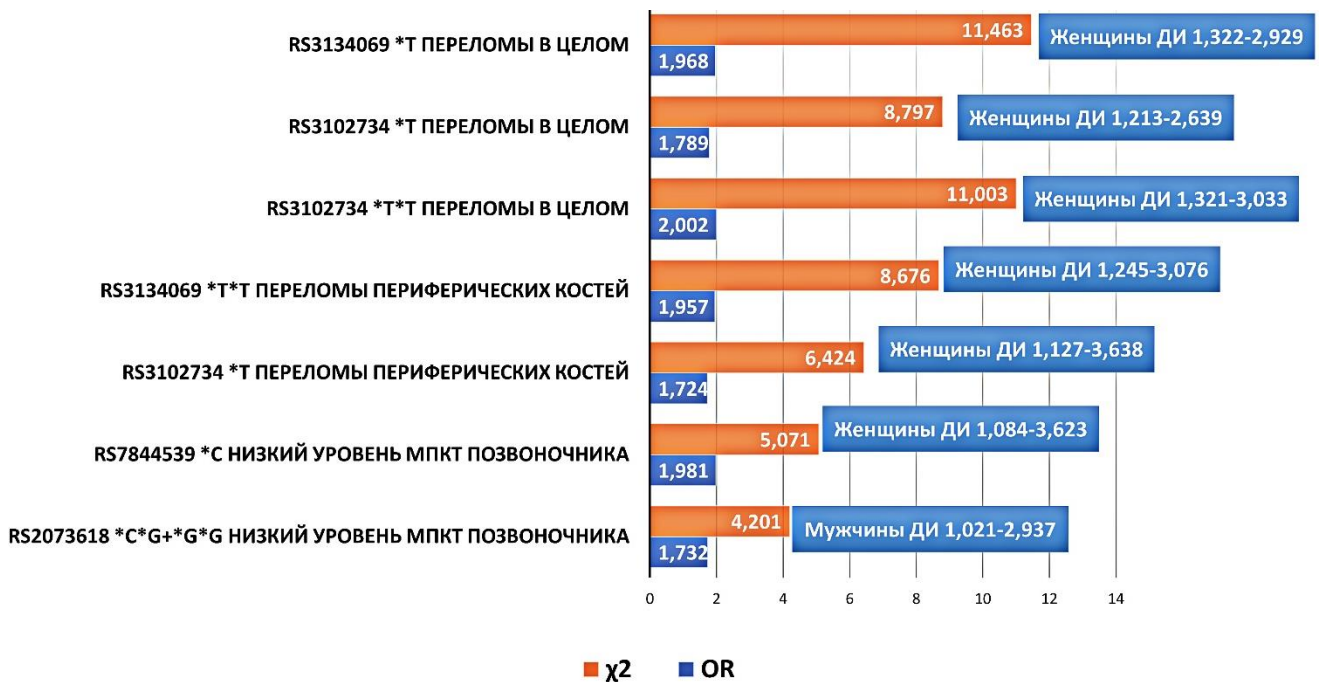


Рисунок 2 – Обнаруженные ассоциации полиморфных вариантов гена *OPG* с переломами и низким уровнем минеральной плотности костной ткани ($p<0,05$).

Поиск ассоциаций полиморфного варианта rs1544410 гена *VDR* с переломами и низким уровнем минеральной плотности костной ткани

Ген рецептора витамина Д (*VDR*) рассматривается как один из важных генов-кандидатов для изучения генетических факторов остеопороза. За последние 2 десятилетия опубликовано большое количество работ, в которых показана ассоциация полиморфного варианта rs1544410 гена *VDR* с ОП, однако, имеются и противоречивые данные. В нашей работе выявлена тенденция к ассоциации аллеля *G с низким уровнем МПКТ в целом в общей выборке мужчин ($\chi^2=3,75$, OR=1,342, ДИ=0,996-1,807, $p=0,05$), у женщин ассоциаций не выявлено. Результаты согласуются с данными зарубежных исследований (Denisson et al., 2001; Hosrt-Sikorska et al., 2012). Так, у женщин в постменопаузе из Беларуси и Литвы генотип *G*G в три раза чаще встречался у пациентов с ОП по сравнению с контрольной группой. Считается, что данный полиморфизм связан с уровнем МПКТ, но его влияние относительно невелико и сильно зависит от внешних факторов, например, от диеты и уровня инсоляции (Marozik et al., 2018).

Изучение полиморфных вариантов в генах и сайтах связывания микроРНК

Проведен анализ полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК в мРНК структурных генов костной ткани *COL1A1* (rs1061947), *COL11A1* (rs1031820), *COL11A1* (rs9659030) и генов, участвующих в метаболизме соединительной и костной ткани: *VDR* (rs11540149), *FGF2* (rs6854081), *SOX9* (rs1042673), *ZNF239* (rs10793442), *TPD52* (10098470), *SPARK* (1054204), *FBXO5* (rs1712) и *MMP1* (rs5854), полиморфных вариантов генов микроРНК *miR-146-a* (rs2910164) и *miR-196-a-2* (rs11614913), а также поиск ассоциаций с переломами, низким уровнем МПКТ у женщин и мужчин (рис. 3). Для подбора полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК использовался веб-ресурс PolymiRTS (<https://compbio.uthsc.edu>).

Обнаружена ассоциация аллеля *G ($\chi^2=7,457$, OR=2,25, 95% ДИ 1,239-4,086, $p=0,006$, $p_{\text{fdr}}=0,036$), генотипов *G*G+*G*T ($\chi^2=7,131$, OR=2,25, 95% ДИ 1,253-5,097, $p=0,008$, $p_{\text{fdr}}=0,048$) локуса rs6854081 гена *FGF2* с переломами шейки бедра, генотипа *G*T – с переломами лучевой кости ($\chi^2=8,056$, OR=12, 95% ДИ 2,067-69,680, $p=0,005$, $p_{\text{fdr}}=0,035$) у женщин в целом, генотип *G*G – с переломами шейки бедра у мужчин ($\chi^2=7,563$, OR=4,254, ДИ=1,393-12,985, $p=0,006$, $p_{\text{fdr}}=0,03$). Аллель *G может уменьшать аффинность связывания для miR-146a/b, приводя к снижению ингибирования трансляции гена *FGF2*. Известно, что увеличение экспрессии фактора роста фибробластов 2 усиливает остеокластогенез, приводя к снижению уровня МПКТ, что согласуется с нашими результатами (Zhu et al., 2017).

Выявлена ассоциация аллеля *А полиморфного локуса rs11540149 гена *VDR* ($\chi^2=5,796$, OR=2,199, ДИ=1,140-4,242, $p=0,016$, $p_{\text{fdr}}=0,048$) и генотипа *Т*С локуса rs5854 гена *MMP1* ($\chi^2=4,244$, OR=2,105, ДИ=1,023-4,333, $p=0,04$, $p_{\text{fdr}}=0,12$) с переломами позвоночника у женщин. Обнаружена ассоциация аллеля *Т полиморфного локуса rs1712 гена *FBXO5* с низким уровнем МПКТ в поясничном отделе позвоночника у женщин ($\chi^2=4,554$, OR=1,575, ДИ=1,345-1,960, $p=0,033$, $p_{\text{FDR}}=0,460$). Известна ассоциация данного локуса с уровнем МПКТ шейки бедра в работе Shu-Feng L. et al. (2011). У мужчин генотип *G*G rs1031820 гена *COL11A1* ассоциирован с переломами в целом ($\chi^2=12,633$, OR=2,736, ДИ=1,553-4,820, $p=0,000379$, $p_{\text{fdr}}=0,003$), аллель *G rs1031820 гена *COL11A1* ($\chi^2=8,72$, OR=2,08, ДИ=1,268-3,417, $p=0,003$, $p_{\text{fdr}}=0,02$), аллель *Т ($\chi^2=18,1$, OR=5,74, ДИ=2,332-14,11, $p=2*10^{-5}$, $p_{\text{fdr}}=2*10^{-4}$) и генотип *Т*С rs10098470 гена *TPD52* – с переломами позвоночника ($\chi^2=8,72$, OR=0,48, ДИ=0,293-0,789, $p=0,003$, $p_{\text{fdr}}=0,02$). Аллель *А ($\chi^2=8,406$, OR=2,974, ДИ=1,376-6,426, $p=0,004$, $p_{\text{fdr}}=0,045$) и сумма генотипов *А*G+*А*А rs11540149 гена *VDR* ассоциированы с переломами лучевой кости ($\chi^2=7,205$, OR=3,282, ДИ=1,317-8,180, $p=0,00727$, $p_{\text{fdr}}=0,03635$). У женщин русского этнического происхождения аллель *Т rs10098470 гена *TPD52* ассоциирован с переломами в целом ($\chi^2=5,934$, OR=5,492, ДИ=1,180-25,55, $P=0,015$, $p_{\text{fdr}}=0,045$), аллель *G ($\chi^2=9,820$, OR=2,793, ДИ=1,433-5,444, $p=0,002$, $p_{\text{fdr}}=0,024$) и генотип *G*T ($\chi^2=7,915$, OR=3,19, ДИ=1,367-7,443, $p=0,005$, $p_{\text{fdr}}=0,03$) локуса rs6854081 гена *FGF2*, аллель *Т ($\chi^2=9,425$, OR=6,396, ДИ=1,649-24,81, $p=0,002$, $p_{\text{fdr}}=0,030$) и генотип *Т*С ($\chi^2=5,928$, OR=6,72, ДИ=1,679-26,888, $p=0,015$, $p_{\text{fdr}}=0,045$) локуса rs10098470 гена *TPD52* – с переломами шейки бедра.

У мужчин русской этнической принадлежности аллель *А локуса rs11540149 гена *VDR* ассоциирован с переломами шейки бедра ($\chi^2=7,221$, OR=3,907, ДИ=1,345-11,35, $p=0,007$, $p_{\text{fdr}}=0,035$), генотип *Т*С локуса rs5854 гена *MMP1* – с низким уровнем МПКТ в поясничном отделе позвоночника ($\chi^2=6,038$, OR=1,888, ДИ=1,134-3,140, $p=0,01$, $p_{\text{fdr}}=0,04$). Аллель *G rs2910164 гена *miR-146a* ассоциирован с переломами позвоночника у женщин в целом ($\chi^2=4,433$, OR=1,97 ДИ=1,04-3,73, $p=0,035$), аллель *С – с переломами шейки бедра у женщин татарской этнической принадлежности. Аллель *Т rs11614913 гена *miR-196-a-2* ассоциирован с переломами в целом у мужчин ($\chi^2=4,559$, OR=1,414, ДИ=1,028-1,944, $p=0,033$), аллель *С – с низким уровнем МПКТ в поясничном отделе позвоночника у мужчин русского происхождения (рис. 3). Ассоциация аллеля *С rs11614913 гена *miR-196-a-2* с низким уровнем МПКТ позвоночника согласуется с данными исследований, в которых изменение активности гена *miR-146-a* было ассоциировано с аллелем *С и патогенетическими процессами в области позвоночника (Ahn et al., 2018). При этом в работе Tae-Keun Ahn et al. (2017) аллель *G был описан как рискованный, однако, только в сочетании с определенными аллельными вариантами других локусов (*miR-146-a G/-149T/ -196-a-2 C/-449G*) (Ahn et al., 2018). Такие противоречивые результаты, вероятно, обусловлены тем, что частота аллеля *G в среднем в популяциях мира составляет 71%, однако в популяциях Восточной Азии – 37%, что демонстрирует существование популяционных различий по данному локусу (<http://www.ensembl.org/index.html>). В нашем исследовании популяциях частота аллеля *G у русских составила 74,9%, у татар – 68,7%, что сопоставимо с таковой в европейских популяциях и тенденции к уменьшению его частоты у татар.

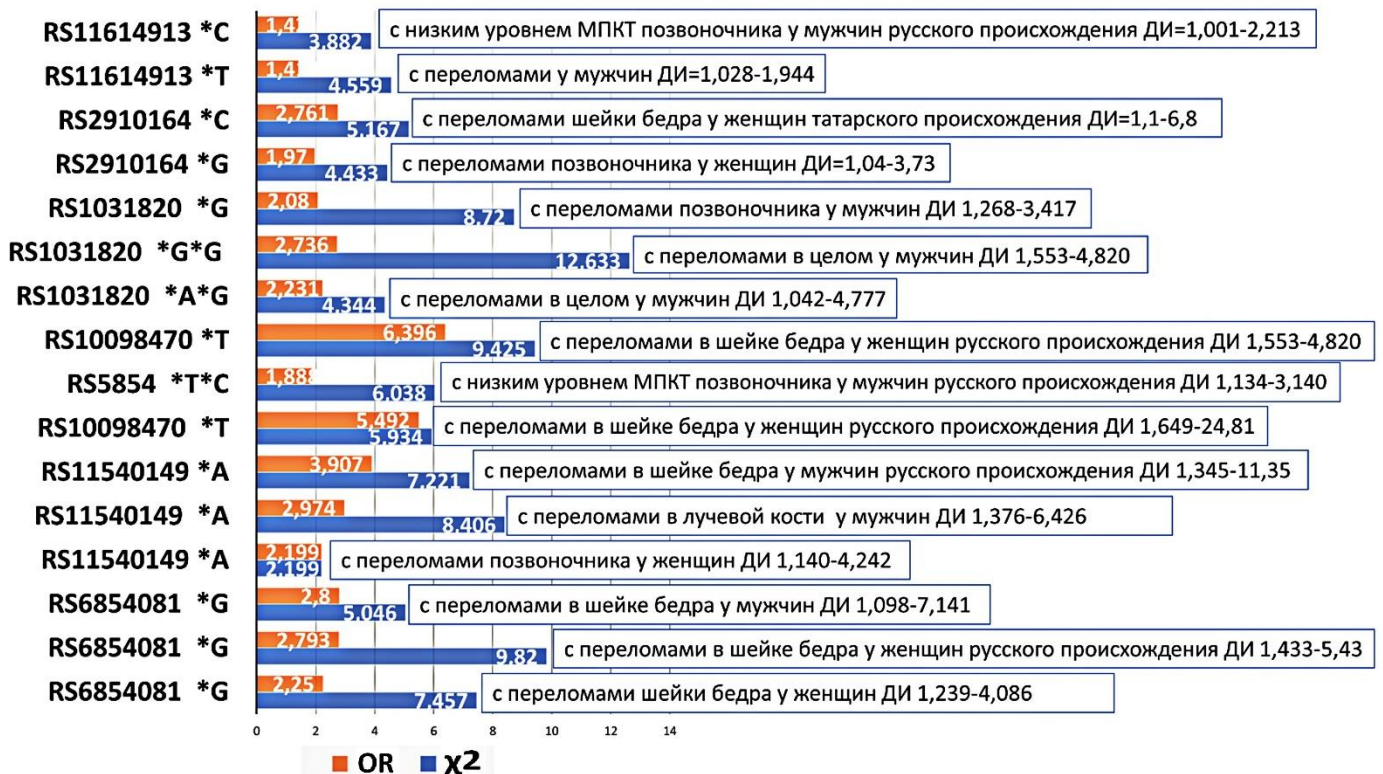


Рисунок 3 – Выявленные ассоциации полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК и генов микроРНК с переломами и низким уровнем МПКТ ($p<0,05$).

Разработка прогностических моделей переломов у женщин и мужчин

Для выявления вклада клинических предикторов и взаимосвязи клинических и генетических факторов проведен анализ с использованием логистической регрессии и ROC-анализа с построением ROC-кривых. В качестве клинических предикторов для женщин использованы: индекс массы тела (ИМТ), возраст наступления менопаузы, длительность менопаузы, уровень МПКТ шейки бедра и поясничного отдела позвоночника. В качестве клинических предикторов для мужчин – ИМТ, МПКТ шейки бедра и позвоночника.

Получены модели прогнозирования риска развития переломов шейки бедра у женщин, в которую вошли полиморфные варианты rs1054204 (*SPARC*), rs2073617 (*OPG*) и продолжительность менопаузы. Модель отличалась достаточной чувствительностью, специфичностью и предсказательной ценностью (AUC=0,909) (рис. 4А). Получена модель прогнозирования риска развития переломов шейки бедра у мужчин, в которую вошли варианты генов *OPG*, *SOX9*, *ZNF239* и уровень МПКТ шейки бедра (AUC=0,859) (рис. 4Б).

Также получена статистически значимая модель прогнозирования риска развития переломов поясничного отдела позвоночника у мужчин. Известно, что перелом данной локализации является одним из типичных клинических манифестаций остеопороза у мужчин и может длительно протекать без выраженной симптоматики, поэтому важно выявить его генетические маркеры. В модель вошли полиморфные варианты rs3102734 ($k=5,3$, $p=0,014$) и rs2073617 ($k=4,17$, $p=0,047$) гена *OPG*, rs1712 гена *FBXO5* ($k=-2,9$, $p=0,023$), а также уровень МПКТ поясничного отдела позвоночника ($k=6,81$, $p=0,0005$). Данная модель отличается наибольшей предсказательной ценностью (AUC=0,932) (рис. 4С).

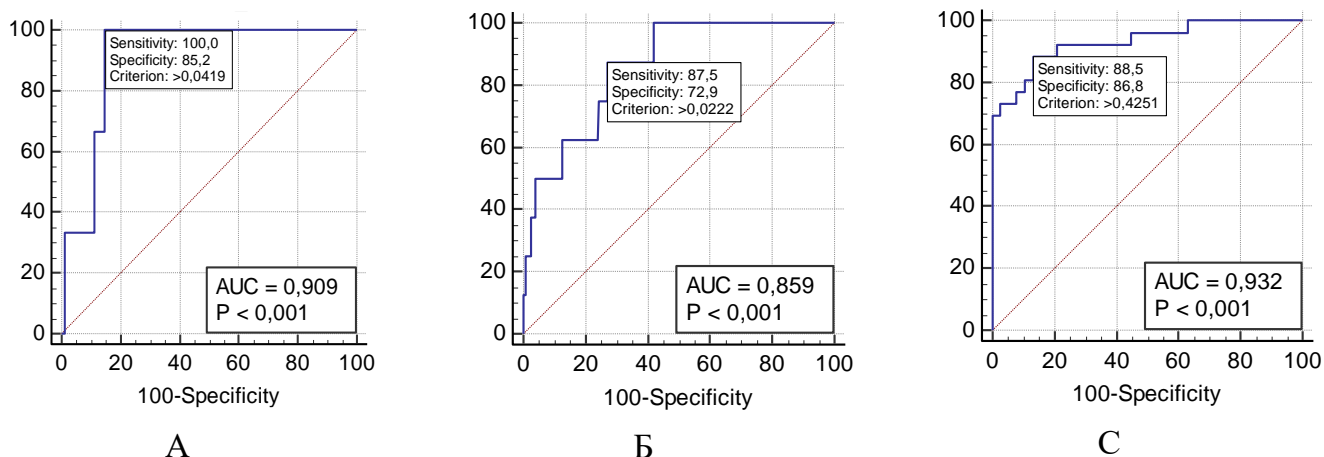


Рисунок 4 – А – ROC-кривая анализа клиничко-генетических предикторов переломов шейки бедра у женщин, Б – у мужчин, С – предикторов переломов позвоночника у мужчин.

Анализ профиля метилирования ДНК у женщин

Проведен анализ профиля метилирования ДНК в промоторных регионах генов регуляции ремоделирования, развития и метаболизма соединительной ткани *RANKL*, *COP22*, *RUNX2* и *SOST*. Подобраны CpG-богатые участки в проксимальном промоторе данных генов с использованием открытой системы GeneGlobe (QIAGEN) для проведения пиросеквенирования конвертированной ДНК на платформе Pyromark Q24. Анализ включал сравнение полученных

данных о проценте метилирования в CpG-островках. Для выявления различий в опытной и контрольной группе в зависимости от уровня метилирования осуществлялось попарное сравнение количественных значений в процентах с использованием логистического регрессионного анализа для каждого CpG-сайта, а затем средних арифметических значений. Установлено, что гипометилирование гена *RUNX2* является статистически значимым предиктором остеопороза у женщин постменопаузального возраста ($p=0,0435$) (рис. 5).

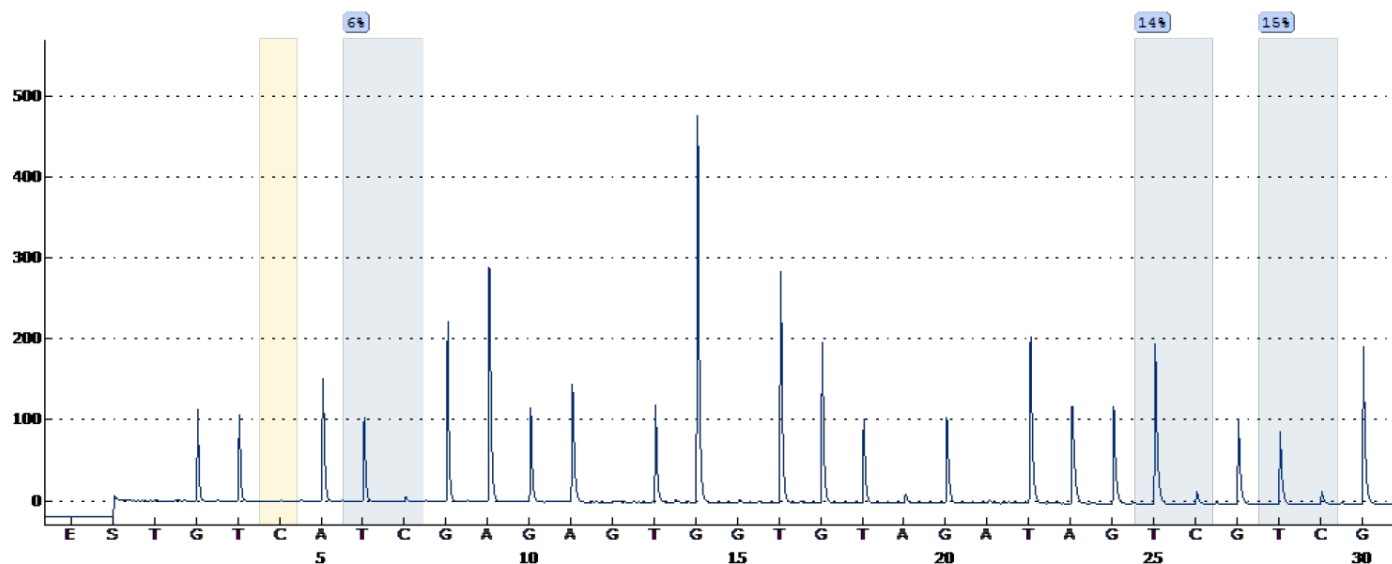


Рисунок 5 – Пирограмма профиля метилирования гена *RUNX2* у исследуемого образца ДНК пациента с ОП (степень метилирования указана в процентах).

В настоящее время не существует исследований, в которых бы описывалось снижение уровня метилирования промоторного региона гена *RUNX2* у пациентов с остеопорозом, поэтому, результат получен впервые. Известно, что изменение профиля метилирования гена *SOST* нарушает трансактивацию *RUNX2* у пациентов с постменопаузальным ОП, влияя на метаболизм костной ткани (Shan et al., 2019). *RUNX2* регулируется гистондеацетилазами, в частности, HDAC4 способствует его деградации в зрелых остеобластах (Marini et al., 2016). Таким образом, можно предположить, что гипометилирование промоторного участка гена *RUNX2* и изменение уровня его экспрессии может быть связано с реконструкцией хромосом через эпигенетические механизмы ацетилирования гистонов. Результаты требуют дальнейших репликативных исследований на независимой выборке.

Анализ генов чувствительности к антирезорбтивной терапии

За период 2019-2021 гг. была сформирована независимая выборка женщин постменопаузального возраста с остеопорозом, находящихся на лечении и наблюдении в Городском центре остеопороза в городе Уфа и проходящих комплексное обследование, включающее в себя осмотр врача-травматолога, исследование МПКТ методом рентгеновской денситометрии и определение уровня витамина Д в сыворотке крови. При наличии показаний назначается антирезорбтивная терапия препаратами группы бисфосфонатов – алендроновая кислота в дозировке 70 мг 1 раз в неделю длительно и препаратом витамина Д –

колекальциферол в дозировке 4000 Ед в сутки в течение 1 месяца 2 раза в год. Кроме этого, мы учитывали клинический фактор – ИМТ при оценке динамики уровня МПКТ и витамина Д на фоне антирезорбтивной терапии. Проведен сравнительный анализ частот генотипов полиморфных вариантов генов чувствительности к БФ и витамину Д для оценки их роли в изменении уровня МПКТ при терапии данными препаратами в течение года наблюдения.

Выявлено значительное повышение максимального уровня МПКТ поясничного отдела позвоночника среди гетерозиготных носителей rs2297480, что, вероятно, обусловлено большим числом гетерозиготных носителей в выборке (рис. 6А). Кроме того, не обнаружено статистически значимых различий при исследовании изменения показателей сывороточной концентрации витамина Д у пациентов с различными генотипами исследованных генов с применением критерия Манна-Уитни. В то же время отмечается динамика увеличения концентрации витамина Д у носителей аллеля *А полиморфного варианта rs2297480 гена *FDPS*, различия носят характер тенденции ($U=5$, $p=0,052$) (рис. 6Б), но линейное изменение концентраций может свидетельствовать об участии данного локуса в регуляции изменения сывороточных концентраций при терапии препаратами витамина Д.

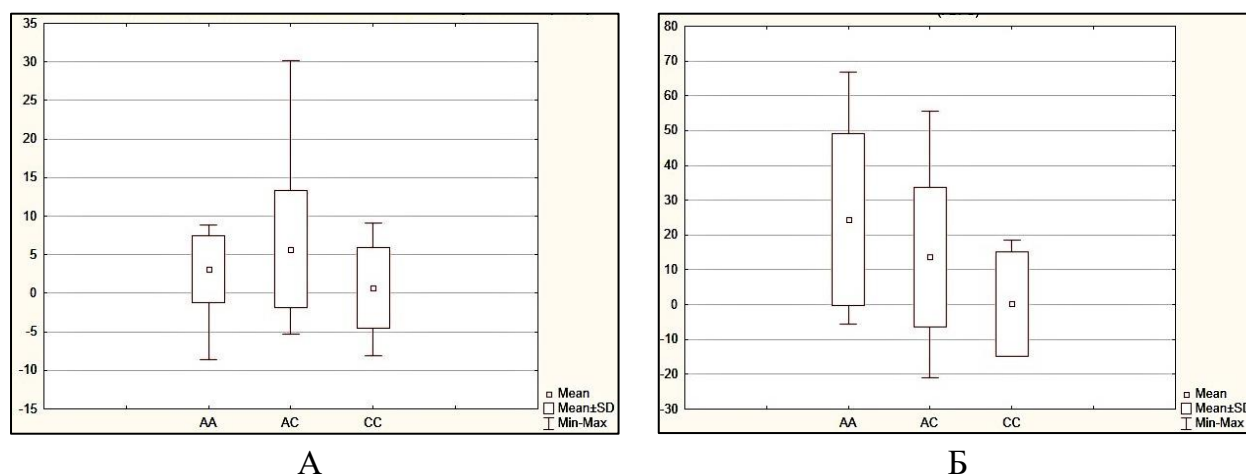


Рисунок 6 – Динамика уровня МПКТ поясничного отдела позвоночника (А) и витамина Д (Б) в сыворотке в крови при различных генотипах локуса rs2297480 (*FDPS*).

Полигенная оценка риска переломов, низкого уровня минеральной плотности костной ткани и их сочетанных состояний

Полигенная оценка риска (PRS) представляет собой биоинформатический анализ, позволяющий прогнозировать риск развития заболевания на основе одновременного анализа большого количества генетических локусов и оценки влияния рискованных аллелей полиморфных локусов на изучаемый признак. При исследовании бинарных фенотипов по типу «случай-контроль» используется логистическая регрессионная модель, которая позволяет получить значение эффекта полиморфных вариантов через OR – параметр, определяющий «вес» рискованного аллеля. Это является первым этапом PRS, если отсутствует обучающая выборка данных GWAS-исследования. Вторым этапом является расчет полигенного балла, который представляет собой взвешенную сумму эффектов аллелей риска. Третий этап

предполагает оценку способности модели правильно классифицировать женщин с переломами и низким уровнем минеральной плотности костной ткани.

В ходе многолетних исследований остеопороза накоплены данные изучения большого числа ДНК локусов, однако, эти результаты нуждаются в дальнейшем комплексном анализе, который позволит улучшить прогностическую силу выявленных маркеров ОП. Нами проведен PRS анализ 140 ДНК-локусов, изученных в данной работе совместно с результатами, полученными в рамках международного консорциума GEFOS с целью выявления моделей, прогнозирующих низкий уровень МПКТ и риск остеопоротических переломов в отдельности и в коморбидном состоянии у женщин из Волго-Уральского региона в целом и с учетом этнической принадлежности. Сначала проводился логистический регрессионный анализ, далее – полигенная оценка риска, ассоциативный анализ для оценки OR и ROC-анализ для определения прогностической силы моделей.

Выявлено, что полиморфные варианты rs17284960 (*Long n. c. RNA ENST*, OR=1,304, p=0,03), rs1801197 (*CALCR*, OR=1,306, p=0,029), rs3102734 (*OPG*, OR=1,511, p=0,046), rs2228570 (*VDR*, OR=1,303, p=0,037), rs227584 (*C17orf53*, OR=1,282, p=0,041), rs1107946 (*COL1A1*, OR=1,311, p=0,045), rs5926033 (*PTCHD1-AS*, OR=1,51, p=0,001) и rs5952638 (*DUSP21*, OR=1,904, p=0,003) являются предикторами переломов в целом в общей выборке женщин. Полигенный риск у женщин с переломами (медиана 0,494) превышает таковые у женщин без переломов (медиана -0,357) (рис. 7). ROC-анализ продемонстрировал высокий уровень AUC (0,748) (95% ДИ: 0,712-0,784), чувствительности (0,794) и специфичности (0,571) модели (рис. 8). Вероятность перелома в опытной группе в 2,9 раза выше (95% ДИ (2,353–3,536)) по сравнению с контрольной группой (p=2e⁻¹⁶). Результаты демонстрируют высокую значимость модели полигенного риска переломов, базирующаяся на 140 полиморфных локусах.

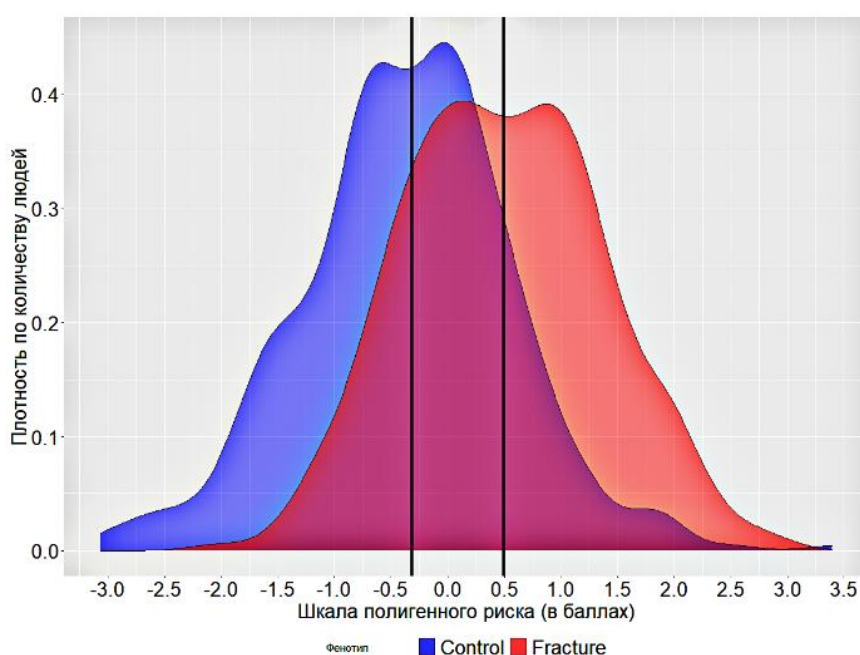


Рисунок 7 – График распределения плотности баллов полигенного риска у женщин с переломами (Fracture) и контрольной группе (Control).

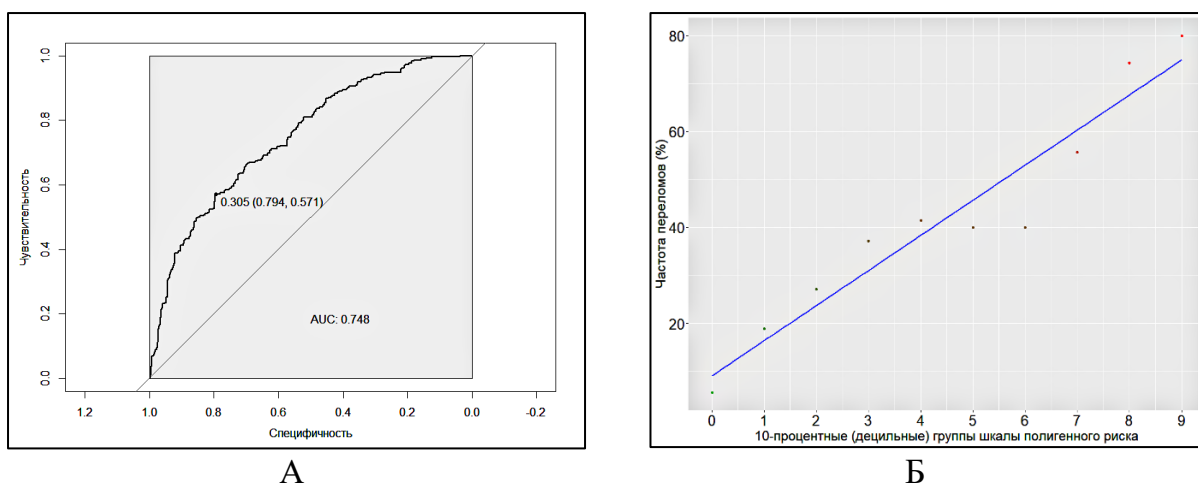


Рисунок 8 – А – ROC-кривая анализа модели полигенной оценки риска переломов; Б – шкала полигенного риска в зависимости от частоты переломов.

Согласно GWAS-исследованию Estrada et al. (2012), низкий уровень МПКТ может быть независимым фенотипом ОП, что согласуется с нашими результатами. Предикторами низкого уровня МПКТ оказались полиморфные локусы rs4233949 (*LOC102724072*, OR=1,338, p=0,04), rs7427438 (3p24.1, OR=1,395, p=0,04), rs2277268 (*LRP5*, OR=1,938, p=0,029) и rs4796995 (*FAM210A*, OR=1,34, p=0,037). У группы с низким уровнем МПКТ медиана составила 0,347, у контроля -0,654 (рис. 9А). У модели высокий уровень AUC (0,791) (95% ДИ: 0,750–0,832), чувствительности (0,605) и специфичности (0,836) (рис. 9Б). Вероятность формирования низкого уровня МПКТ в 3,94 раза выше (95% ДИ (2,993–5,337)) ($p=2e^{-16}$).

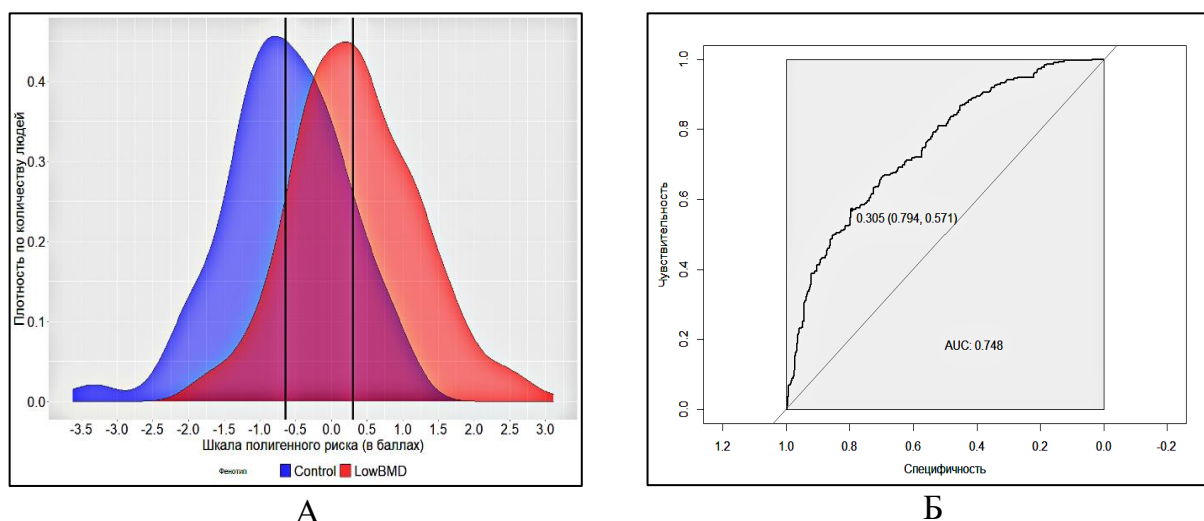


Рисунок 9 – А – Распределение плотности баллов полигенного риска у женщин с низким уровнем МПКТ и контрольной группе; Б – ROC-кривая модели.

Мы также разработали прогностическую модель полигенного риска сочетанного фенотипа – переломов и низкого уровня МПКТ в коморбидном состоянии. Предикторами сочетанного фенотипа являются варианты генов *COL11A1*, *LRP5*, *FAM210A* и *PTCHD1-AS*. Медиана PRS у группы с патологией составила 0,511, у контроля -0,686. У модели высокий уровень AUC (0,850) (95% ДИ: 0,809–0,892), чувствительности (0,826) и специфичности (0,695). Вероятность перелома в 6,6 раз выше (95% ДИ (4,411–10,608)) ($p=2e^{-16}$).

Полиморфные варианты rs11809524 (OR=1,56, p=0,031), rs17040773 (OR=1,558, p=0,013), rs6532023 (OR=1,367, p=0,046), rs17284960 (OR=1,381, p=0,026), rs13204965 (OR=1,518, p=0,017), rs198470 (OR=5,588, p=0,029), rs11540149 (OR=1,514, p=0,047), rs2228570 (OR=1,4, p=0,025) и rs5926033 (OR=1,654, p=0,001) оказались статистически значимыми предикторами переломов у женщин русской этнической принадлежности. Согласно распределению плотности значений PRS, подавляющая доля полигенных баллов у женщин с переломами (медианное значение 0,553) превышает таковую у женщин с нормальным уровнем МПКТ и без переломов (медиан. знач. -0,461). У модели высокий уровень AUC (0,800) (95% ДИ: 0,761–0,840), чувствительности (0,739) и специфичности (0,750)). Вероятность перелома в 4,03 раз выше по сравнению с контрольной группой (95% ДИ (3,077–5,414)) ($p=2e^{-16}$).

Полиморфные варианты rs4233949 (OR=1,548, p=0,015), rs1801725 (OR=1,749, p=0,026), rs13245690 (OR=1,48, p=0,037), rs10793442 (OR=1,9, p=0,03), rs2277268 (OR=2,23, p=0,046) и rs129333 (OR=1,863, p=0,034) статистически значимо ассоциированы с низким уровнем МПКТ у женщин русского происхождения. Выявлено значимое повышение PRS в группе с низким уровнем МПКТ (0,322 против -0,820 у контрольной группы). Анализ чувствительности и специфичности модели показывает высокий уровень AUC (0,825) (95% ДИ: 0,778–0,872), чувствительности (0,786) и специфичности (0,729). Вероятность формирования низкого уровня МПКТ в 4,98 раза выше (95% ДИ (3,484–7,419)) ($p=2e^{-16}$).

Полиморфные варианты rs11809524 (OR=2,363, p=0,011), rs1801725 (OR=2,126, p=0,019), rs13245690 (OR=1,656, p=0,031), rs2277268 (OR=3,139, p=0,04), rs129333 (OR=2,269, p=0,025) и rs5926033 (OR=2,231, p=0,001) являются предикторами коморбидного состояния у женщин русского происхождения, у которых наблюдается повышенный полигенный риск (медиана 0,493 против -0,925 у контроля). У модели высокий уровень AUC (0,909) (95% ДИ: 0,864–0,955), чувствительности (0,849) и специфичности (0,883). Вероятность риска развития данного состояния в 12,98 раза выше (95% ДИ (6,945–27,538)) ($p=2,13e^{-13}$).

Анализ выборки женщин татарской этнической принадлежности выявил предикторы переломов: rs1801197 (OR=1,845, p=0,010), rs13272568 (OR=1,903, p=0,008), rs2073618 (OR=1,645, p=0,032), rs884205 (OR=1,980, p=0,009), rs7257450 (OR=2,289, p=0,005), и rs5952638 (OR=3,169, p=0,021). Медианное значение PRS у лиц с переломами составил 0,553, тогда как у женщин с нормальным уровнем МПКТ и без переломов -0,461. У модели выявлен высокий уровень AUC (0,800) (95% ДИ: 0,761–0,839), чувствительности (0,739) и специфичности (0,750). Вероятность перелома повышена в 6,77 раз ($p=2e^{-16}$).

Было выявлено, что полиморфные варианты rs13413210 (OR=3,284, p=0,034), rs6830890 (OR=2,158, p=0,041), rs9466056 (OR=2,141, p=0,007) статистически значимо ассоциированы с низким уровнем МПКТ у женщин татарской этнической принадлежности. Сравнительный анализ распределения полигенных баллов показал, что у лиц с низким уровнем МПКТ значительно повышен риск. Медианное значение у лиц с низким уровнем МПКТ составило 0,718, а у женщин с нормальным уровнем МПКТ и без переломов -0,645. Модель

демонстрирует высокий уровень AUC (0,910), чувствительности (0,783) и специфичности (0,919). Ассоциативный анализ модели показал, что вероятность формирования низкого уровня МПКТ в 18,29 раза выше (95% ДИ: 1,995–4,083) ($p=2,89e^{-08}$). Полиморфные варианты rs6830890 (OR=2,661, $p=0,031$), rs2073618 (OR=2,337, $p=0,014$) и rs4240467 (OR=2,354, $p=0,03$) являются статистически значимыми предикторами коморбидного состояния у женщин татарской этнической принадлежности.

Частота случаев с коморбидным состоянием закономерно возрастает с увеличением показателя полигенного риска (медианы 0,788 и -0,534 соответственно). Также был проведен анализ чувствительности и специфичности модели, которая показала высокий уровень AUC (0,902) (95% ДИ: 0,837–0,967), чувствительности (0,763) и специфичности (0,900). Ассоциативный анализ модели показал, что вероятность формирования низкого уровня МПКТ в 20,96 раз выше по сравнению с контрольной группой (95% ДИ: 6,837–96,487) ($p=4,86e^{-06}$).

В ходе работы была проведена оценка и сравнительный анализ показателей отношений шансов и их доверительных интервалов, полученных в ходе полигенной оценки риска. Результаты представлены на графике «forest-plot» (рис. 10).

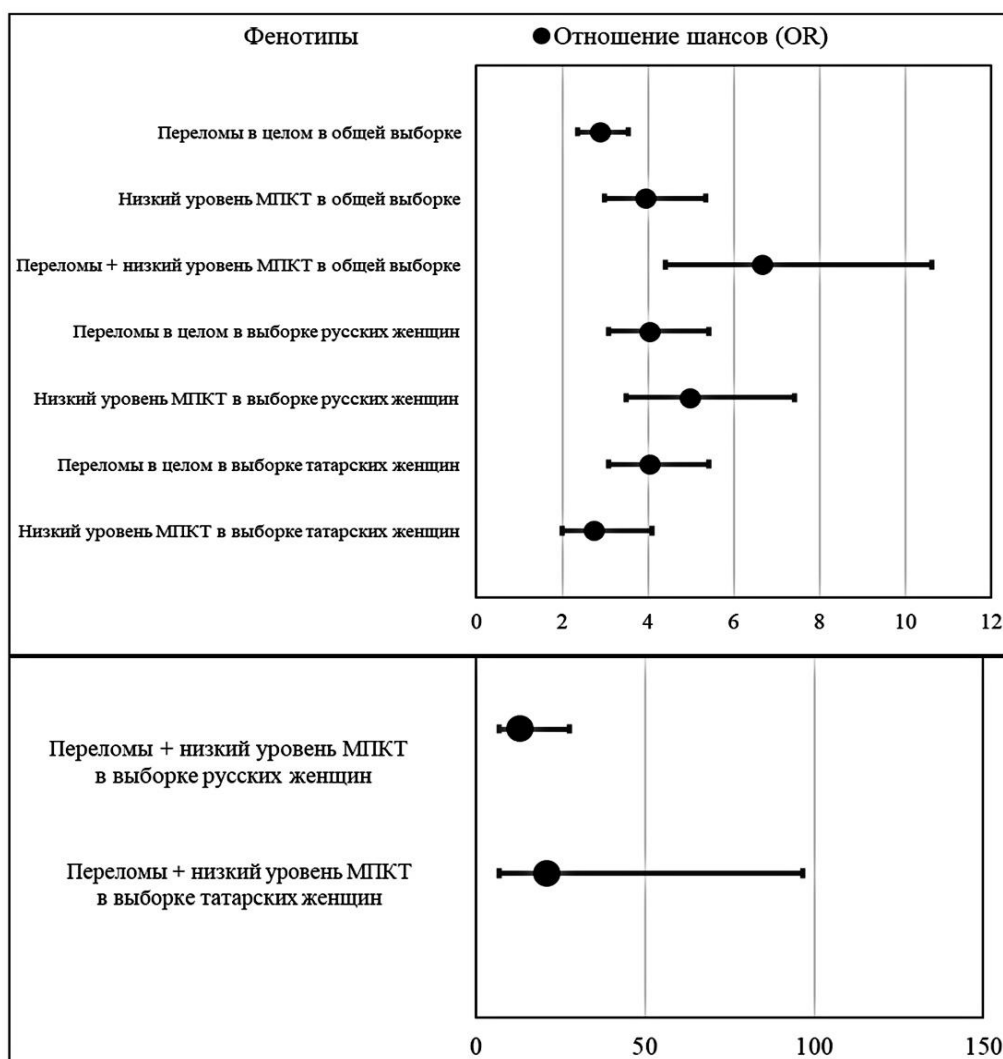


Рисунок 10 – Сводная оценка полученных отношений шансов и доверительных интервалов для моделей прогнозирования полигенного риска у изученных подгрупп в выборке женщин.

Как видно из графика «forest-plot», получены значения OR со значением не менее 2,5 и достигают 20,96, что свидетельствует о повышении эффекта маркеров в моделях при проведении полигенной оценки риска по сравнению с анализом ассоциаций отдельных локусов. Однако, для некоторых маркеров наблюдается значительный доверительный интервал, например при PRS-анализе фенотипа с переломами и низким уровнем МПКТ у женщин русского и татарского происхождения в коморбидном состоянии, что говорит о недостаточной мощности для этой ассоциации и о вероятности неточности данной модели, поэтому для некоторых полученных закономерностей требуется валидация и расширение выборки для уменьшения доверительных интервалов отношения шансов.

В данной работе был проведен анализ полигенной шкалы риска развития остеопороза у женщин постменопаузального возраста в целом, у женщин русской этнической принадлежности и у женщин татарской этнической принадлежности для 3 фенотипов: переломов, низкого уровня МПКТ и их коморбидных состояний. Удалось выяснить, что все построенные модели обладают высокой прогностической значимостью, позволяя с высокой долей вероятности верно классифицировать больных и контрольную группу, а также корректно, основываясь на численных показателях, дифференцировать различия по полигенной шкале риска. Наиболее высокие показатели чувствительности и специфичности показали модели риска переломов, низкого МПКТ и их коморбидных состояний у женщин татарской, а также риска коморбидных состояний у женщин русской этнической принадлежности ($AUC > 0,900$). Наименьшие показатели оказались у группы женщин с переломами без учета этнической принадлежности, что может объясняться высоким вкладом этнического компонента в генетический фактор развития ОП. Также на показатели может повлиять различная доля предковых этнических компонентов. Так как частоты аллелей и генотипов могут различаться между разными этносами, каждый аллель может быть на уровне одной частоты в одной этнической группе, но более редким в другой. Поэтому величина эффекта (например, отношение шансов) у рискованного аллеля может различаться у разных этнических групп, особенно учитывая разный факториальный фон окружающей среды. Отличаться могут и характеристики популяции и модели наследования. Таким образом, полигенная оценка риска, которая строится при исследовании одной этнической группы, может быть неприменима к другой. На сегодняшний день большая часть исследований PRS остеопороза была проведена у популяций европейского происхождения. Несмотря на это, каждая из изученных моделей в данной работе обладает высокой прогностической значимостью и может быть применена для разработки перспективных систем ранней диагностики на основе индивидуального генетического профиля.

Таким образом, получены новые данные о генетических и эпигенетических факторах, вовлеченных в патогенез остеопороза в целом, переломов и низкого уровня минеральной плотности костной ткани по отдельности у женщин и мужчин из Волго-Уральского региона России с учетом их этнической принадлежности.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружена ассоциация локусов rs3134069, rs3102734 гена *OPG* с переломами в целом и периферийных костей у женщин, rs7844539 – с низким уровнем МПКТ поясничного отдела позвоночника у женщин и rs2073618 – у мужчин.
2. Выявлены ассоциации полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК в генах *FGF2* с переломами шейки бедра у мужчин и женщин, лучевой кости у женщин, *VDR* – позвоночника у женщин, шейки бедра и лучевой кости у мужчин, *TPD52* – с переломами в целом и шейки бедра у женщин русского происхождения и позвоночника у мужчин, *COL11A1* – с переломами в целом и позвоночника у мужчин, *MMP1* – с низким уровнем МПКТ в позвоночнике у мужчин русской этнической принадлежности.
3. Выявлены ассоциации полиморфных вариантов rs2910164 гена *miR-146a* с переломами позвоночника у женщин в целом и шейки бедра у женщин татарской этнической принадлежности, rs11614913 гена *miR-196-a-2* – с переломами у мужчин в целом и низким уровнем МПКТ в позвоночнике у мужчин и в шейке бедра у женщин русского происхождения.
4. Получены клинико-генетические модели, прогнозирующие переломы шейки бедра у мужчин (*OPG*, *SOX9*, *ZNF239*, уровень МПКТ шейки бедра) и у женщин (*SPARC*, *OPG*, продолжительность менопаузы), а также переломы позвоночника у мужчин (*OPG*, *FBXO5*, уровень МПКТ позвоночника).
5. Обнаружена ассоциация пониженного уровня метилирования гена *RUNX2* с переломами и низким уровнем МПКТ в коморбидном состоянии у женщин.
6. Выявлена тенденция к линейному увеличению концентрации витамина Д в зависимости от наличия аллеля *А полиморфного варианта rs2282679 гена фанезил-дифосфат синтазы (*FDPS*).
7. Установлены модели на основе оценки полигенного риска для прогнозирования риска постменопаузального остеопороза в целом, переломов и низкого уровня МПКТ по отдельности у женщин из Волго-Уральского региона в целом, а также у женщин русского и татарского происхождения.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1. Ялаев Б.И., Тюрин А.В., Миргалиева Р.Я., Хусаинова Р.И. Роль метилирования ДНК в нарушении костного метаболизма // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – № 1. - С. 67-74 (WoS, Scopus).
2. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Изучение полиморфного варианта rs2910164 гена микроРНК *miR-146a* у пациентов с первичным остеопорозом // Гены и клетки. – 2020. – Т. 15. – № 4. - С. 40-45 (Scopus).

3. Yalaev B.I., Tyurin A.V., Mirgalieva R.I., Khusnutdinova E.Kh., Khusainova R.I. Investigating the role of osteoprotegerin gene polymorphic variants in osteoporosis // Russian Open Medical Journal. – 2021. – V. 10. – № 1. - P. 1-4 (WoS, Scopus).
4. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Эпигенетика остеопороза // Медицинская генетика. – 2018. – №6. - С. 10-17 (ВАК).
5. Ялаев Б.И., Тюрин А.В., Нурлыгаянов Р.З., Хусаинова Р.И. Фармакогенетические основы терапии бисфосфонатами // Молекулярная медицина. – 2020. – Т. 18. – № 3. - С. 3-10 (ВАК).
6. Ялаев Б.И., Тюрин А.В., Нурлыгаянов Р.З., Хусаинова Р.И. Роль микроРНК при многофакторных заболеваниях соединительной ткани // Терапия. – 2020. – Т. 6. – № 6. - С. 35-39 (ВАК).
7. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Исследование генетических и эпигенетических факторов развития остеопороза // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19. – № 8. - С. 65-66 (ВАК).
8. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Полиморфизм сайтов связывания микроРНК как фактор риска развития остеопороза // Остеопороз и остеопатии. – 2020. – Т. 23. – № 2. - С. 208-210 (ВАК).
9. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК с первичным остеопорозом у мужчин и женщин // Доклады Башкирского университета. – 2018. – Т. 3. – № 4. - С. 483-489 (РИНЦ).

Тезисы докладов в сборниках конференций:

1. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Изучение роли полиморфизма сайтов связывания микроРНК в формировании остеопороза // Ломоносов-2018: материалы конференции. Москва. – 2018. - С. 1.
2. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Поиск ассоциаций полиморфизма сайта связывания микроРНК гена VDR с остеопорозом // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: материалы конференции. Томск. – 2018. - С. 145-147.
3. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Поиск ассоциаций полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК с первичным остеопорозом у мужчин и женщин // Генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем: материалы конференции. Звенигород. – 2018. - С. 127.
4. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Поиск ассоциаций полиморфных вариантов гена остеопротегерина и сайтов связывания микроРНК с развитием остеопороза // Ломоносов-2020: материалы конференции. Москва. – 2020. - С. 1-2.
5. Tyurin A., Shapovalova D., Yalaev B., Khusainova R. Search for associations of microRNA target sites with osteoarthritis of various localization: a case-control study // World congress on osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases: тезис в журнале «Osteoporosis international». Барселона. – 2020. - С. S403.

6. Yalaev B., Tyurin A., Khusainova R. Polymorphism of miRNA target sites as a risk factor for fractures and osteoporosis // World congress on osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases: тезис в журнале «Osteoporosis international». Барселона. – 2020. - С. S133–S621.
7. Ялаев Б.И., Тюрин А.В., Нурлыгаянов Р.З., Хусаинова Р.И. Роль полиморфных вариантов гена остеопротегерина, рецептора витамина D и сайтов связывания микроРНК в развитии остеопороза // Фундаментальные и прикладные аспекты иммунологии, генетики и инфектологии: материалы конференции. Уфа. – 2020. - С. 164-171.
8. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Изучение полиморфных локусов сайтов связывания микроРНК у пациентов с первичным остеопорозом // Проблема остеопороза в травматологии и ортопедии: материалы конференции. Москва. – 2021. - С. 78-80.
9. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Поиск эпигенетических маркеров формирования остеопороза // Ломоносов-2021: материалы конференции. Москва. – 2021. - С. 1-2.
10. Yalaev B., Khusainova R. Search for epigenetic markers of osteoporosis formation // 48th European Calcified Tissue Society Congress: тезис в журнале «Bone Reports». Виртуальный конгресс. – 2021. - С. 5.
11. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Полигенная оценка риска развития остеопороза у женщин постменопаузального возраста // Международная научно-практическая конференция «Медицинская наука в эру цифровой трансформации»: материалы конференции. Курск. – 2021. - С. 307-309.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ОП	остеопороз
МПКТ	минеральная плотность костной ткани
95% ДИ	95% доверительный интервал
AUC	площадь под кривой
FDR	доля ложно-положительных результатов по методу Бенджамина-Хохберга
GWAS	полногеномный анализ ассоциаций
OR	odds ratio (отношение шансов)
p	уровень статистической значимости
p _{FDR}	уровень статистической значимости с учетом поправки на множественность сравнений Бенджамина-Хохберга
ROC	параметрическая кривая
ИМТ	индекс массы тела
PRS	полигенная оценка риска
UTR	3'/5'- нетранслируемый участок матричной РНК