

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОЛОГИИ КОСТЕЙ У БЕЛОРУССКИХ ПАЦИЕНТОВ С ОСТЕОПОРОЗОМ

MOLECULAR AND GENETIC CHARACTERISTICS OF BONE PATHOLOGY IN BELARUSIAN PATIENTS WITH OSTEOPOROSIS

П. М. Морозик^{1,2}, Э. В. Руденко³, Е. В. Кобец², Е. В. Руденко³, О. В. Шубеко²
P. Marozik^{1,2}, E. Rudenko³, K. Kobets², A. Rudenka³, A. Shybeka²

¹Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь;

²Белорусский государственный медицинский университет, БГМУ, г. Минск, Республика Беларусь;

³Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь
P.Marozik@igc.by

¹International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Belarus;

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

³Institute of Genetics and Cytology of the NAS Belarus, Minsk, Republic of Belarus

По результатам генетического тестирования белорусских пациентов с постменопаузальным остеопорозом разработан алгоритм выявления вероятности развития низкотравматических костных переломов, имеющий очень хорошую диагностическую и прогностическую ценность, высокую чувствительность и хорошую точность. Проведение генетического тестирования по комплексу из семи информативных маркеров совместно с клиническими и лабораторно-инструментальными исследованиями позволит получать индивидуальные, максимально реалистичные данные для выявления высокой вероятности костных переломов и провести своевременные профилактические мероприятия.

Based on genetic testing of Belarusian patients with postmenopausal osteoporosis, an algorithm evaluation of genetic risk of low-traumatic bone fractures is developed, which has a very good diagnostic and prognostic value, high sensitivity and good accuracy. The genetic analysis of revealed complex of seven informative markers together with clinical analysis with a high probability will help to evaluate individual risk of bone fractures and perform preventive measures.

Ключевые слова: гены предрасположенности, полиморфизм, переломы, остеопороз, оценка риска.

Keywords: predisposition genes, polymorphism, fractures, osteoporosis, risk evaluation.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2023-1-363-367>

Остеопороз (ОП) является заболеванием костной системы, характеризующимся низкой минеральной плотностью костей (МПК), микроархитектурными нарушениями структуры костной ткани с последующим повышением хрупкости костей и подверженности патологическим переломам [1]. ОП не только является основной причиной переломов, но и относится к числу заболеваний, приводящих к снижению качества жизни пациентов, формированию инвалидности и увеличению смертности, особенно среди пожилых людей. Социальная значимость и высокие экономические затраты на лечение ОП образуют широкое поле для разработки новых подходов профилактики данной патологии на доклиническом этапе, что является одной из приоритетных задач здравоохранения в поддержании качества жизни населения во многих странах.

Выявление людей со сниженной минеральной плотностью костной ткани представляет определенную сложность, поскольку процессы снижения костной массы в организме долгое время протекают медленно и бессимптомно [2]. Данные изменения можно наблюдать лишь при лабораторно-инструментальном обследовании в специализированных центрах с проведением денситометрии. Информация о генетической предрасположенности к костным переломам в этом аспекте поможет сформировать группы повышенного риска и целенаправленно проводить комплексные мероприятия по профилактике ОП и низкоэнергетических переломов.

Костные переломы имеют комплексный патогенез, включающий генетические и негенетические факторы [3]. В данное время набирает обороты поиск генетических маркеров, который может определить предрасположенность к костно-мышечной патологии [4]. Проводятся широкомасштабные исследования на различных популяциях с внедрением новых методик геномики и протеомики для того, чтобы получить новые знания о генетических составляющих костно-мышечных травм. Этот подход даст возможность исследователям выявить новые маркеры, ассоциированные с этой патологией. При этом разработанные алгоритмы оценки подверженности к костным переломам можно будет в будущем использовать не только на пациентах с остеопорозом, но и для всей популяции в целом [5].

Цель работы – разработка методики оценки риска костных переломов у женщин с остеопорозом с учетом клинических, лабораторно-инструментальных и молекулярно-генетических маркеров

Материалы и методы. Был проведен анализ 1237 амбулаторных карт пациентов с первичным остеопорозом. После отбора согласно критериям включения, в исследование было отобрано 606 взрослых пациентов с костными переломами в анамнезе, 270 лиц без переломов. Забор образцов биологического материала (периферическая кровь) у 876 пациентов осуществлялся на базе Минского городского центра профилактики остеопороза и болезней костно-мышечной системы (1 ГКБ г.Минска). Все включенные в исследование женщины подписали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

На базе 1 ГКБ г.Минска осуществлялось анамнестическое, клиническое и лабораторное обследование включенных в исследование пациентов с заболеваниями костно-мышечной системы. Критерии включения: согласие на участие в исследовании; возраст 50-75 лет; продолжительность менопаузы не менее 3-х лет. Критерии исключения: наличие сопутствующих заболеваний, оказывающих влияние на метаболизм костной ткани (патология желудочно-кишечного тракта, нарушения функции щитовидной железы, сахарный диабет), прием препаратов, влияющих на метаболизм костной ткани, наличие острых и хронических заболеваний сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, онкологических, инфекционных заболеваний. Состояние МПК исследовали методом двуэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (LUNAR Prodigy, GE, США). Измеряли показатели МПК поясничных позвонков (L1–L4) и шейк бедренных костей. Результаты измерений МПК представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка (в г/см²). Забор крови натощак для биохимического и электрохимилуминесцентного анализов крови осуществлялся из локтевой вены утром, не ранее чем через 10-12 часов после последнего приема пищи, в стерильную вакуумную пробирку Vacutainer.

Геномную ДНК выделяли из цельной крови с помощью стандартной фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование осуществляли с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с зондами TaqMap (Thermo Scientific, США) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Полный объем реакции в пробирках для ПЦР составлял 10 мкл, включая 5 мкл iTaq Universal Probes Supermix (BioRad), 3,75 мкл воды milliQ, 0,25 мкл $\times$ 40 TaqMap SNP Genotyping Assay, 1 мкл геномной ДНК (15 нг). Реакцию проводили с начальной денатурацией при 95 °C в течение 10 мин, затем 40 циклов денатурации при 95 °C в течение 15 с, отжига и синтеза при 60 °C в течение 30 с. Во время каждой постановки ПЦР применяли положительный и отрицательный контроли, в целях контроля качества некоторые образцы, отобранные в случайном порядке, генотипировали повторно. Генотипирование осуществлялось по 37 вариантам 24 генов у пациентов с остеопорозом и контрольной группы: *COL1A1* rs1800012, *COL1A2* rs42517, *COL5A1* rs12722, *VDR* rs7975232, rs731236, rs1544410, rs11568820, rs2228570, *ESR1* rs9340799, rs2234693, rs1801132, *ESR2* rs3020444, *SOST* rs1234612, *PTH* rs7125774, *CALCR* rs1801197, *MTHFR* rs1801133, rs1801131, *MTRR* rs1801394, *MTR* rs1805087, *FGF2* rs6854081, *FDPS* rs2297480, *GGPS1* rs10925503, *OPG* rs3134069, rs3102734, rs3102735, rs4355801, *RANKL (TNFSF11)* rs9594738, rs9594759, rs1021188, *WNT4* rs7521902, *BMP2* rs15705, rs996544, *BGP* rs1800247, *PRL* rs7739889, *GHI* rs2665802, *IL6* rs1800795, *P2RX7* rs3751143.

Вся статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием языка программирования R (в свободном доступе на <http://r-project.org>). Количественные показатели представлены в виде медианы (25 %, 75% межквартильный размах) и сравнивались с помощью U-критерия Манна-Уитни. Генетический риск костных переломов оценивали методом расчёта отношения шансов с 95% доверительным интервалом (ДИ) в сравнении с референсным (наиболее распространённым гомозиготным) генотипом с использованием кодоминантной (общей) модели наследования; в случае, когда частота минорного аллеля (MAF) была ниже 0,1 %, использовали доминантную модель наследования. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В исследовании были проанализированы образцы ДНК 876 женщин (группа с низкотравматическими костными переломами в анамнезе, 606 женщин, средний возраст $62,8 \pm 7,4$, и группа без переломов, 270 женщин, средний возраст $60,3 \pm 6,2$ лет, отличие от основной группы недостоверно). Клинические данные проанализированных групп представлены в таблице 1.

Таблица 1

Клинические характеристики проанализированных групп женщин с низкотравматическими костными переломами (ПЕР) и без переломов (КОН) в анамнезе

Характеристика	ПЕР (n=606)	КОН (n=270)	<i>p</i>
Возраст, лет	62,8 (57,0; 68,7)	60,3 (56,0; 66,0)	>0,1
Рост, см	160,0 (155,0; 165,0)	162,0 (158,0; 166,0)	>0,1
Масса тела, кг	66,0 (59,0; 74,5)	78,0 (69,0; 85,8)	<0,01
Индекс массы тела, кг/м ²	25,7 (22,9; 29,0)	29,0 (25,7; 33,0)	<0,01
МПК позвоночника, г/см ²	0,86 (0,79; 0,92)	1,19 (1,10; 1,31)	<0,01
МПК шейки бедра, г/см ²	0,80 (0,73; 0,88)	1,01 (0,93; 1,10)	<0,01

У женщин с костными переломами МПК была статистически достоверно ниже по сравнению с контролем. Дальнейший анализ осуществляли между группами с помощью метода логистической регрессии. Равновесие

Харди-Вайнберга соблюдалось для всех изученных локусов ($\chi^2 > 0,05$). Генетический риск костных переломов оценивали методом расчёта отношения шансов с 95% доверительным интервалом (ДИ) в сравнении с референсным генотипом.

В таблице 2 представлены результаты исследований генетических маркеров, для которых выявлена статистически значимая ассоциация с костными переломами в исследуемых группах. Так как полученные результаты генотипирования образцов ДНК исследуемых групп по всем проанализированным маркерам не отличались от ожидаемого распределения Харди-Вайнберга ($p > 0,05$ для всех локусов), для сравнения применяли мультипликативный подход с использованием кодоминантной (общей) модели наследования; в случае, когда частота минорного аллеля (MAF) была ниже 0,1%, использовали доминантную модель наследования.

Таблица 2

Распределение частот генотипов вариантов генов среди лиц с костными переломами и без переломов в анамнезе

Ген, вариант	Генотип	Частота генотипа, %		OR (95% ДИ)	<i>p</i>
		ПЕР	КОН		
<i>COL1A1</i> rs1800012	C/C	58,4	71,5	—	0,016
	C/A	36,0	26,8	1,7 (1,0-2,6)	
	A/A	5,6	1,7	4,1 (1,2-14,4)	
<i>COL1A2</i> rs42517	A/A	52,9	59,3	-	0,0032
	A/G	33,7	36,1	1,1 (0,7-1,6)	
	G/G	13,4	4,6	3,2 (1,6-6,5)	
<i>VDR</i> rs7975232	C/C	20,8	29,0	-	0,0001
	C/A	40,0	51,6	1,1 (0,6-1,9)	
	A/A	39,2	19,4	2,8 (1,6-5,1)	
<i>VDR</i> rs1544410	C/C	29,5	45,8	-	0,0001
	C/T	42,6	43,4	1,5 (0,9-2,5)	
	T/T	27,9	10,8	4,0 (2,2-7,5)	
<i>VDR</i> rs731236	A/A	32,0	42,8	-	0,0007
	A/G	43,6	45,6	1,3 (0,8-1,9)	
	G/G	24,4	11,6	2,8 (1,6-4,8)	
<i>ESR1</i> rs9340799	A/A	52,6	36,0	-	0,0018
	A/G	36,3	49,7	0,5 (0,3-0,8)	
	G/G	11,1	14,3	0,5 (0,3-0,9)	
<i>ESR1</i> rs2234693	C/C	25,1	25,4	-	0,0006
	C/T	40,4	55,0	0,7 (0,5-1,2)	
	T/T	34,5	19,6	1,8 (1,1-3,0)	
<i>MTHFR</i> rs1801133	G/G	42,4	44,6	-	0,0001
	G/A	32,6	47,1	0,7 (0,5-1,1)	
	A/A	25,0	8,3	3,2 (1,8-5,6)	

По результатам анализа полученных данных, статистически значимая ассоциация выявлена для семи локусов пяти генов: *COL1A1* rs1800012, *COL1A2* rs42517, *VDR* rs7975232, rs1544410, rs731236, *ESR1* rs9340799, rs2234693 и *MTHFR* rs1801133. Для носителей варианта rs9340799 G/G гена *ESR1* риск костных переломов снижался по сравнению с носителями референсного генотипа A/A (OR=0,5, 95% ДИ 0,3-0,9, $p = 0,0018$). При этом стоит отметить, что для носителей гетерозиготных генотипов rs9340799 A/G наблюдался аналогичный протекторный эффект (таблица 2).

На основании результатов анализа ассоциации генетических локусов с риском патологических костных переломов оценивался индивидуальный риск костных переломов. Для анализа индивидуального вклада каждого генетического маркера общий генетический риск (GRS) оценивался с помощью коэффициента множественной логистической регрессии (результаты анализа представлены в таблице 3). Полученные в результате анализа коэффициенты логистической регрессии для каждого генотипа позволяют оценить индивидуальный вклад конкретного маркера в вероятность костных переломов. В качестве информативных рассматривали только генотипы, для которых была выявлена статистически значимая ассоциация с риском костных переломов как при анализе отношения шансов, так и при анализе методом множественной линейной регрессии.

Таблица 3

Результаты анализа ассоциации генетических маркеров с риском костных переломов (множественная логистическая регрессия), индивидуальные значения баллов для оценки взвешенного генетического риска патологических костных переломов

Ген	Вариант	Генотип	Коэффициент логистической регрессии	<i>p</i>	Взвешенный риск (баллы)
<i>COL1A1</i>	rs1800012	A/A	3,37	0,02	3
<i>COL1A2</i>	rs42517	G/G	2,84	0,0005	2
<i>VDR</i>	rs7975232	A/A	2,36	0,00019	2
	rs1544410	T/T	3,19	0,000006	3
	rs731236	G/G	2,43	0,0001	2
<i>ESR1A</i>	rs9340799	A/G	-1,57	0,0006	-1
	rs9340799	G/G	-1,45	0,03	-1
	rs2234693	T/T	1,24	0,02	1
<i>MTHFR</i>	rs1801133	A/A	2,81	0,00001	2

Для оценки взвешенного риска патологических костных переломов вклад каждого варианта гена в вероятность костных переломов оценивался по бальной системе (таблица 3). Индивидуальный вклад каждого маркера оценивался исходя из коэффициента множественной логистической регрессии. Минимальный коэффициент, для которого была выявлена статистически значимая ассоциация с риском патологических костных переломов (для rs2234693 T/T он составил 1,24) был принят за 1 балл, остальные коэффициенты пропорционально пересчитаны и округлены до целого значения. Проведенная апробация разработанной модели показала, что при значении риска костных переломов 5 баллов и выше, число лиц с костными переломами превышает таковых без переломов, а при 8 баллах и выше, лиц без переломов практически не встречается. На основании этого, показатель взвешенного риска до 4 баллов включительно принят за общепопуляционный (такой риск включает 95 % лиц без переломов), от 5 до 7 баллов – повышенный, 8 и более баллов – высокий.

Для определения диагностической и прогностической ценности разработанной модели оценки взвешенного индивидуального риска костных переломов был проведен анализ ROC-кривой с расчетом площади под кривой (AUC, рисунок 1).

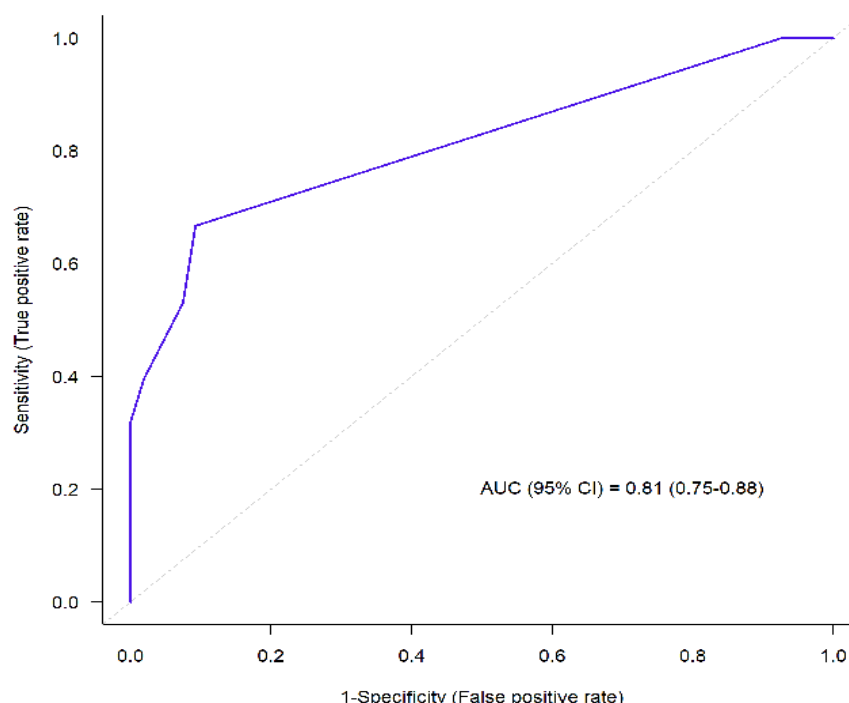


Рисунок 1 – ROC-кривая для модели оценки взвешенного риска патологических костных переломов по генетическим маркерам

Разработанная в рамках настоящего исследования модель прогнозирования взвешенного риска патологических костных переломов имеет очень хорошую диагностическую и прогностическую ценность, AUC = 0,81 (95 % ДИ 0,75–0,88). Модель также характеризуется высокой чувствительностью (90,7 %), средней специфичностью

(66,7 %) и хорошей точностью (77,5%). Средняя специфичность свидетельствует о том, что модель может быть доработана с помощью других генетических или клинических показателей, включая алгоритма FRAX.

Таким образом, по результатам исследований показано, что повышенный риск костных переломов установлен для носителей генотипов C/A+A/A варианта *COL1A1* rs1800012, генотипа G/G варианта *COL1A2* rs42517, генотипа A/A варианта *VDR* rs7975232, генотипа T/T варианта *VDR* rs1544410, генотипа G/G варианта *VDR* rs731236, генотипов A/G+G/G варианта *ESR1* rs9340799, генотипа T/T варианта *ESR1* rs2234693, генотипа A/A варианта *MTHFR* rs1801133.

ЛИТЕРАТУРА

1. Harvey N., Dennison E., Cooper C. Osteoporosis: impact on health and economics // Nat Rev Rheumatol. – 2010. – Vol.6. – P.99–105.
2. Richards J.B., Kavvoura F.K., Rivadeneira F. et al. Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture // Ann Intern Med. – 2009. – Vol.151(8). – P.528–537.
3. Chandra A., Rajawat J. Skeletal Aging and Osteoporosis: Mechanisms and Therapeutics // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol.22(7). – P.3553.
4. García-Ibarbia C., Pérez-Núñez M.I., Olmos J.M. Missense polymorphisms of the *WNT16* gene are associated with bone mass, hip geometry, and fractures // Osteoporos Int. – 2013. – Vol.24(9). – P.2449–2454.
5. Zheng H.F., Tobias J.H., Duncan E. et al. WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk // PLoS Genet. – 2012. – Vol.8(7). – P.e1002745.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ СВИНЦА НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ ДОМИНАНТНЫХ ЛЕТАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ У ЛИНИИ BERLIN DROSOPHILA MELANOGASTER INFLUENCE OF LEAD IONS ON THE APPEARANCE OF DOMINANT OF LETHAL MUTATIONS IN THE BERLIN DROSOPHILA MELANOGASTER LINE

Н. Ф. Ковалевич, К. С. Жук

N. F. Kovalevich, K. S. Zhuk

Учреждение образования «Брестский государственный университет имени А. С. Пушкина»,
БрГУ имени А.С. Пушкина
г. Брест, Республика Беларусь
galkovnat@gmail.com

Brest State University named after A.S. Pushkin, BrSU named after A.S. Pushkin
Brest, Republic of Belarus

В работе проведен анализ влияния ионов свинца на возникновение ДЛМ у линии Berlin *Drosophila melanogaster*. Установлено увеличение частоты ДЛМ при всех вариантах воздействия нитрата свинца в течение первого поколения, наиболее значительное при концентрации 10 ПДК. Основную долю в составе ДЛМ составляют ранние эмбриональные летали. Во втором поколении наблюдается снижение частоты ДЛМ под воздействием концентраций 10 ПДК и 100 ПДК.

The paper analyzes the effect of lead ions on the occurrence of DLM in the line Berlin *Drosophila melanogaster*. An increase in the frequency of DLM was established for all variants of exposure to lead nitrate during the first generation, the most significant at a concentration of 10 MPC. The main share in the DLM composition is made up of early embryonic lethals. In the second generation, there is a decrease in the frequency of DLM under the influence of concentrations of 10 MPC and 100 MPC.

Ключевые слова: доминантные летальные мутации, нитрат свинца, *Drosophila melanogaster*.

Keywords: dominant lethal mutations, lead nitrate, *Drosophila melanogaster*.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2023-1-367-370>

Тяжелые металлы в настоящее время широко распространены в природе, аккумулируются в земной коре, откуда вместе с водой и пищей поступают внутрь живых организмов. Свинец относится к группе опасных тяжелых металлов, поскольку, вследствие связывания с ферментами, может вызывать тяжелые отравления и патологии, особенно воздействуя на сердечно-сосудистую, кроветворную и нервную системы. Генотоксическое действие свинца состоит в том, что его соединения влияют на веретено деления и способны индуцировать такие хромосомные aberrации, как транслокации, разрывы хромосом, образование дицентриков и кольцевых хромосом, появление микроядер [1]. Содержание свинца в почвах фермерских хозяйств Брестского района варьирует в широких