

## МУЛЬТИОМИКСНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОИСКУ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ ОСТЕОПОРОЗА

Б.И. Ялаев<sup>1</sup>, А.В. Тюрин<sup>2</sup>, Р.И. Хусаинова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Республика Башкортостан, Россия

<sup>2</sup> Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Поступила: 01.01.2022  
Принята к печати: 29.05.2022  
Опубликована on-line: 30.05.2022

### MULTIOMICS APPROACHES TO SEARCH FOR MOLECULAR-GENETIC PREDICTORS OF OSTEOPOROSIS

B.I. Yalaev<sup>1</sup>, A.V. Tyurin<sup>2</sup>, R.I. Khusainova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of the Sciences, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia

<sup>2</sup> Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia

e-mail: yalaev.bulat@yandex.ru

Идентификация генетических локусов и биохимических маркеров, ассоциированных с количественными и качественными признаками костной ткани, риском переломов и уровнем минеральной плотности костной ткани, до сих пор не дала однозначного ответа на вопрос о молекулярном патогенезе остеопороза. Всё еще остаются нерешенные и вопросы, касающиеся разработки методов ранней диагностики и прогнозирования течения данного заболевания. Молекулярные эффекты генетических вариантов, расположенных в кодирующих областях генома человека, легко поддаются изучению, однако, большинство однонуклеотидных полиморфных локусов, ассоциированных с восприимчивостью к остеопорозу, локализованы в некодирующих или межгенных областях и их роль в патогенезе данного заболевания не изучена в полной мере. Использование биохимических маркеров в диагностике и мониторинге терапии остеопороза не позволяют разработать подходы к ранней диагностике заболевания до возникновения перелома. Возникают значительные проблемы интерпретации результатов исследований для применения в клинической медицине. Однако объединение многопрофильных данных, таких как полногеномный поиск ассоциаций (GWAS), изменение паттернов биогенных элементов костного ремоделирования, каталитической активности ряда ферментов и экспрессии генов, являющихся маркерами костной резорбции, позволило значительно расширить понимание ключевых звеньев патогенеза заболевания. В статье приведены обзор и обобщение результатов мультиомиксных исследований остеопороза, в том числе биформатического анализа по поиску ключевых факторов риска развития остеопороза, а также фармакогенетических аспектов современной терапии заболевания.

**Ключевые слова:** остеопороз, переломы, уровень минеральной плотности костной ткани, маркеры.

### Введение

Многофакторная природа остеопороза обусловлена различными патогенетическими механизмами, в значительной степени ассоциированными с генетическими и эпигенетическими факторами. Уникальные механические свойства костей, в том числе прочность, жесткость и эластичность, зависят от уровня минерализации костной ткани, качества трабекулярных и кортикальных костей, количество и размер пор которых определяют биомеханические свойства и влияют на способность выдерживать внешние механические нагрузки. Как показывают исследования, эти признаки ассоциированы с индивидуальным генетическим профилем [1]. Период с 1990 по 2007 гг. считается первым этапом глобального изучения молекулярно-генетической архитектуры остеопороза, когда были проведены первые работы, направленные на поиск генов, обуславливающих риск развития данного заболевания [2]. Рисковые аллели полиморфных вариантов, локализованных в генах, выполняющих структурную и регуляторную роль

The identification of genetic loci and biochemical markers associated with the risk of fractures and the level of bone mineral density (BMD) did not give an unambiguous answer about the molecular pathogenesis of osteoporosis (OP). There are still unresolved questions about the possibility of early diagnosis and prognosis of the course of the disease. The molecular effects of genetic variants located in the coding regions of the human genome are easy to study. However, most of the single nucleotide polymorphic loci that are associated with osteoporosis susceptibility are located in non-coding or intergenic regions. Their role in the pathogenesis of this disease is not fully understood. The use of biochemical markers in the diagnosis and monitoring of osteoporosis therapy does not allow developing approaches to early diagnosis of the disease before a fracture occurs. Significant problems arise in the interpretation of research results for use in clinical medicine. But the combination of multidisciplinary data, such as genome-wide association study (GWAS), changes in the patterns of biogenic elements of bone remodeling, catalytic activity of a number of enzymes, and protein expression has significantly expanded the understanding of the key links in the pathogenesis of the disease. The article reviews and summarizes the latest advances in multiomics studies of osteoporosis, including bioinformatic analysis to find key risk factors for the development of OP, as well as pharmacogenetic aspects of modern therapy of the disease.

**Keywords:** osteoporosis, fractures, bone mineral density, markers.

в костной ткани, редко реплицировались в различных научных работах либо были ассоциированы с низким показателем отношений шансов (Odds Ratio (OR)) [2]. Однако, начиная с 2007 г. ситуация получила новое развитие, когда инструментарии исследователей пополнил метод полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) [3]. В течение последующих лет опубликовано свыше 25 работ, которые позволили обнаружить, что с фенотипами остеопороза ассоциированы сотни полиморфных локусов [4–7].

Многообещающие результаты изучения биохимических процессов костного ремоделирования в течение последних 5 десятилетий позволили открыть ряд маркеров костной резорбции (маркер костной резорбции  $\beta$ -CrossLaps, костная кислая фосфатаза и др.), используемых при оценке динамики изменения уровня минеральной плотности костной ткани (МПКТ) на фоне антирезорбтивной терапии [8]. Данные маркеры в сочетании с другими факторами риска, например, низким пиком костной массы, могут использоваться для определения

риска остеопоретического перелома [9]. У женщин постменопаузального возраста с низким уровнем костной массы маркеры обновления костной ткани являются независимыми предикторами риска переломов: перелом позвоночника прямо коррелирует с концентрацией маркеров метаболизма костной ткани (например, пониженным уровнем эстрогена) и отрицательно с уровнем МПКТ позвоночника [10]. Однако аналитические подходы к изучению костных биомаркеров все еще остаются проблемой для дальнейших клинических исследований. В настоящее время маркеры метаболизма костной ткани не рекомендованы для рутинной клинической диагностики, вместо этого их применяют в специализированной практике и измерение уровня МПКТ совместно с калькуляторами для подсчета 10-летней вероятности перелома FRAX, Garvan и QFracture остаются единственными значимыми методами диагностики остеопороза во всем мире [11].

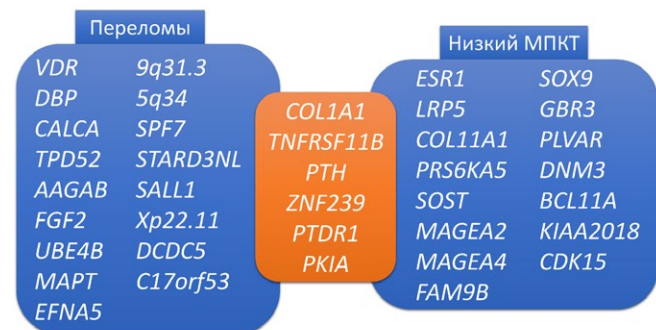
Актуальным является консолидация и обобщение результатов молекулярно-генетических исследований остеопороза, в которых применяется многоуровневый и интегративный мультиомиксный подход. Эта информация важна для разработки проектов персонализированной медицины и обобщает последние достижения фундаментальной науки, что полезно как для практикующих врачей, так и для медицинских генетиков, а также необходима для улучшения существующих инструментов и методов ранней диагностики остеопороза.

### Генетика остеопороза

Полиморфные варианты, ассоциированные с риском переломов и формированием низкого уровня МПКТ, были идентифицированы как в генах, непосредственно вовлеченных в метаболизм костной ткани, так и в генах, участвующих в ключевых звеньях сигнальных путей — Wnt-сигналинга, дифференциации стволовых клеток, пролиферации остеобластов и остеокластов, регуляции активности гормонов и др. [12, 13]. Известно, что эти гены контролируют возрастную вариабельность уровня МПКТ [13] и 40–65% дисперсии других количественных параметров кости [14]. Было обнаружено, что переломы и снижение уровня МПКТ (как два основных клинических признака остеопороза) могут быть обусловлены разными генетическими маркерами и представлять собой независимые эндотипы остеопороза (рис. 1) [1]. Существенные результаты были достигнуты благодаря методу GWAS, свободному от нулевой гипотезы, что позволило открыть ряд статистически значимых ассоциаций с остеопорозом в ранее неизученных участках генома. Таким образом, с помощью GWAS поиск ассоциаций осуществляется, не ориентируясь на гены, потенциально вовлеченные в костную биологию [15]. Это дает возможность преодолеть трудности, связанные с неполным пониманием патофизиологии заболевания. Основные топ-выводы GWAS-исследований говорят о том, что полиморфные варианты, статистически значимо ассоциированные с остеопорозом, как правило, локализованы в генах регуляции активности разных биогенных компонентов костной ткани (*LRP4*, *GALNT3*, *DKK1*), минерализации (*MEPE* и *Wnt4*), пролиферации и дифференцировки остеобластов (*CTNNB1*, *DKK1*, *SOST*, *Wnt4*, *LRP5*) и остеокластов (*CTNNB1*, *Jag1*). Кроме того, гены *WNT6*, *Wnt4*, *SOST*, *LRP5*, *DKK1* и *CTNNB1* вовлечены в Wnt/ $\beta$ -катениновый сигнальный путь. Гены *CTNNB1*, *SLC25A13*, *WNT16*, *Wnt4*, *LRP5* и *DKK1* связаны с диабетическими

нефропатиями. Роль других генов, идентифицированных с применением GWAS, остается малоизученной и требует дальнейших исследований [16].

В многоцентровом исследовании с участием 19 000 человек J. Richards с соавт. (2008) изучили 36 000 однонуклеотидных полиморфных вариантов в 150 генах-кандидатах, отобранных на основе предыдущих работ [5]. Только для 9 генов (*ESR1*, *LRP4*, *ITGA1*, *LRP5*, *SOST*, *SPP1*, *TNFRSF11A*, *TNFRSF11B* и *TNFSF11*) была продемонстрирована надежная статистически значимая ассоциация с уровнем МПКТ шейки бедра или поясничного отдела позвоночника, а еще 4 гена (*SPP1*, *SOST*, *LRP5* и *TNFRSF11A*) были связаны с риском перелома, не зависящим от уровня МПКТ (по крайней мере, частично) для генов *SPP1* и *SOST* [3, 17]. Было неоднократно показано, что патогенез остеопороза ассоциирован с генами, регулирующими костное ремоделирование (*RANK*, *RANKL*, *OPG* и др.), генами рецепторов эстрогена (*ESR1*), витамина D (*VDR*), кальция (*CALCR*) и структурными генами коллагена (*COL1A1*, *COL11A1*), а GWAS позволил открыть более 60 полиморфных вариантов в генах с неизвестной ролью в биологии костной ткани [12, 18, 19–21].



**Рис. 1.** Гены, вовлеченные в риск развития переломов и низкого уровня МПКТ у женщин постменопаузального возраста из Волго-Уральского региона России

Традиционные исследования показали, что такие факторы риска как дефицит половых стероидов, низкий индекс массы тела, отсутствие физической активности, курение, чрезмерное употребление алкоголя, низкий уровень кальция и витамина Д, ассоциированы с уровнем МПКТ и переломами. Однако недостатком такого анализа является отсутствие обратной причинно-следственной связи [22]. Рандомизированные контролируемые испытания (РКИ) считаются золотым стандартом при изучении причинно-следственных связей, поскольку правильно определяют направление действия этиологического фактора при анализе полигенного заболевания. К сожалению, РКИ дороги, ресурсоемки, занимают много времени и могут иметь этические ограничения [23], поэтому для изучения патогенеза остеопороза стали использовать менделевскую рандомизацию — метод биоинформатического анализа, позволяющий оценить влияние генетической вариации на этиологические факторы, которые являются причиной развития заболевания. К этим факторам относят индекс массы тела, употребление алкоголя и др. Особое внимание уделяется применению менделевской рандомизации с использованием так называемых модифицируемых факторов, полученных на основании физиологических, клинических и биохимических данных (рост, вес, переломы, низкий уровень МПКТ в зависимости от локализации, уровень кальция, витамина D и  $\beta$ -CrossLaps) [24].

Считается, что уровень МПКТ — это промежуточный фенотип, так как его снижение имеет значение только в результате перелома [1]. Однако, поскольку многие факторы риска остеопороза действуют именно через снижение уровня МПКТ, их ассоциация с МПКТ несколько сильнее, чем с самим переломом, что приводит к усложнению понимания обратной причинно-следственной связи данных процессов. Тем не менее, в большом исследовании с использованием менделевской рандомизации, основанном на выборке в количестве 264 973 человек и репликацией в выборке с участием 297 285 людей, К. Трајаноска с соавт. (2018) обнаружили, что более высокий уровень МПКТ значительно снижал риск переломов [24]. Группа ученых под руководством D. Cousminer с соавт. (2018) доказала причинно-следственную связь между более поздним возрастом менархе и снижением уровня МПКТ шейки бедра и поясничного отдела позвоночника у взрослых, а также поясничного отдела позвоночника у подростков [25]. Таким образом, время полового созревания оказалось причиной снижения уровня МПКТ в зависимости от отдела скелета и пола. Исследование с участием детей показало причинно-следственную связь между индексом массы тела, ожирением и уровнем МПКТ [26]. Предыдущее исследование взрослых европейцев с использованием сводных данных из GWAS не обнаружило доказательств влияния индекса массы тела (на основе 77 однонуклеотидных вариантов) на уровень МПКТ шейки бедра или поясничного отдела позвоночника [27]. Результаты многолетних исследований выявили причастность нескольких заболеваний к развитию остеопороза, однако с помощью метода менделевской рандомизации впоследствии не обнаружили прямого влияния диабета 2 типа и ишемической болезни сердца на уровень МПКТ [28]. Благодаря менделевской рандомизации было установлено, что избыток фактора роста фибробластов 23 типа вызывает минеральные и костные нарушения. Ген этого фактора вовлечен в метаболизм фосфатов и кальция [29]. Таким образом, метод менделевской рандомизации является перспективным инструментом, позволяющим идентифицировать причинно-следственные взаимосвязи генетической вариации и других факторов риска переломов и низкого уровня МПКТ.

### Биохимические маркеры остеопороза

Неинвазивная оценка метаболизма костной ткани заметно улучшилась за последние несколько лет с появлением чувствительных и специфических маркеров костеобразования и резорбции костной ткани. Маркеры костеобразования в сыворотке крови включают общую и специфичную для костей щелочную фосфатазу, остеокальцин и пептид карбокси-концевого удлинения коллагена I типа. Для оценки резорбции костной ткани измеряют резистентную к тартрату плазматическую кислоту фосфатазу и продукты деградации костного коллагена I типа: гидроксипролин, гидроксизингликозид, а также соединения пиридиния (пиридинолин и дезоксипиридинолин и другие ассоциированные с пиридином пептиды) [30].

D. Fei-Yan с соавт. (2008) предприняли попытку каталогизации белков, участвующих в патогенезе остеопороза — белковых маркеров, применяемых для диагностики переломов [31]. Материалом исследования был выбран протеом циркулирующих моноцитов у китайских женщин в пременопаузе, в котором было выявлено более 40 дифференциально транскрибируемых белков,

значимо ассоциированных с уровнем МПКТ [31]. Из них 23 белка выполняют функцию аффинного связывания, а 20 — катализа. Например, 2 белка (альфа-энолаза ENO1 и вспомогательный фактор малой ядерной РНК U2AF1) способны связываться с нуклеиновыми кислотами и могут потенциально участвовать в регуляции экспрессии генов [18, 32]. Кроме того, 6 белков оказались высокоафинны к нуклеотидам, среди них U2AF1; гидролазфермент RAB7B, играющий роль в биосинтезе и расщеплении белков;  $\alpha$ -1В тубулин TUBA1B и  $\alpha$ -6 тубулин TUBA6 (основные компоненты микротрубочек); субъединица  $\alpha$ -гуанин-нуклеотид-связывающего белка CTG1. Еще для 9 белков определена ионно-связывающая активность: PLEK (плейкстрин), GSN (актин-деполимеризующий фактор), GPD2 (глицерин-3-фосфатдегидрогеназа 2) и аннексин A2 ANXA2 связываются с  $Ca^{2+}$ ; супероксиддисмутаза 2 SOD2 — с  $Mn^{2+}$ ; U2AF1 — с  $Zn^{2+}$ ; пируваткиназа M2 PKM2 и ENO1 — с  $Mg^{2+}$ . Несколько белков обладают активностью связывания с другими биологически активными белками (WD повтор белок, содержащий 1 WDR1, винкулин VCL, талин-1-белок TLN1, гельсолин (актин-деполимеризующий фактор, GSN), аннексин 2 (ANXA2), тропомозин  $\alpha$ -4 TPM4, циклаза-ассоциированный протеин CAP1, дегликаза DJ-1 PARK7, тиоредоксин-зависимая пероксидредуктаза PRDX3, гамма-актин ACTG1, альфа-цепь фибриногена FGA, U2AF1 и PKM2); 7 белков — оксидоредуктазной активностью (GPD2, изоцитратдегидрогеназа IDH2, тиоредоксин-зависимая пероксидредуктаза PRDX3, белковая дисульфид-изомераза P4HB, SOD2, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа GAPDH и VCL) и 1 белок — активностью ингибитора ферментов (ANXA2). В независимых протеомных исследованиях для белков ANXA2 и GSN была подтверждена их роль в патогенезе остеопороза [18, 32]. Установлено, что повышенный уровень белка ANXA2 служит биомаркером риска остеопороза и предсказывает риск остеопоретических переломов у китайцев старше 65 лет. С использованием вестерн-блоттинга было идентифицировано 5 белков: супрессорный белок 1 Ras (RSU1), гельсолин, марганец-содержащая супероксиддисмутаза (SOD2), глутатионпероксидаза 1 (GPX1) и  $\beta$ -субъединица пролил-4-гидроксилаза (P4HB), которые, как оказалось, могут влиять на трансэндотелиальную миграцию моноцитов, а также на дифференцировку и функции остеокластов, тем самым внося вклад в дифференциальный остеокластогенез и, в итоге, приводя к изменению уровня МПКТ [33]. Одно из омиксных исследований на основе объединенных данных анализа транскриптомов и протеомов подтвердило роль гена SOD2 в восприимчивости к остеопорозу в китайских популяциях [32]. Некоторые плазменные или сывороточные белки были идентифицированы в проспективных исследованиях. Так, повышенный уровень склеростина (кодируемый геном SOST) в сыворотке крови связан с повышенным риском перелома бедра. Моноклональным антителом к склеростину является препарат ромосозумаб (Evenity), одобренный FDA США в качестве нового препарата для лечения остеопороза у женщин в постменопаузе [33].

Перспективным направлением в исследовании остеопороза является изучение метаболома человека. Оно позволяет проводить эффективный скрининг биомаркеров или терапевтических мишеней, тесно связанных с развитием данного заболевания [34]. Так, одно из первых метаболомных исследований пациентов с остеопорозом позволило идентифицировать четыре ассоциированных с этим заболеванием метаболита:

глутамин, ацетат, ацетон и лактат [34]. Впоследствии были опубликованы 8 работ, в которых описаны сотни метаболитов, ассоциированных с уровнем МПКТ [35]. Глутамат может привести к резорбции кости через экспрессию генов рецепторов глутамата на костных клетках, особенно остеокластах [35]. Сообщалось также о метаболических путях, включая биосинтез желчных кислот, который может влиять на всасывание кальция в кишечнике, и цикл трикарбоновых кислот, что может быть связано с повышенным окислительным стрессом у пациентов с низким уровнем МПКТ [33]. Большого прогресса смогли достигнуть А. Моаууегі с соавт. (2018), которые изучали причинно-следственные связи между метаболитами и фенотипами костной ткани с использованием менделевской рандомизации с генетическими маркерами в качестве инструментальных переменных [36]. Консорциум «Гонконгское исследование остеопороза» (HKOS) при исследовании 624 участников обнаружил значимые ассоциации: 15 метаболитов показали прямую связь с костной патологией после поправки на ковариаты и множественное тестирование. Из них у 4 метаболитов была выявлена прямая корреляция с уровнем МПКТ бедра или позвоночника. К ним относятся сульфат андростерона, сульфат эпиандростерона, дисульфат 5альфа-андростан-3бета-17бета-диол (кодируемый CYP3A5) и дисульфат 4-андростен-3бета-17бета-диол (кодируемый SULT2A1) [36].

Систематический анализ эпигенетических регуляторных элементов известных локусов риска остеопороза, идентифицированных с использованием GWAS, позволяет найти общие регуляторные элементы и предсказывать новые гены, связанные с остеопорозом [37]. Изучение трехмерных взаимодействий хроматина выявило новый регуляторный механизм, с помощью которого функциональные варианты одних генов могут регулировать экспрессию других отдаленных генов [38]. Так, анализ активности генов, в которых были идентифицированы рискованные полиморфные варианты в человеческих остеобластах и остеоцитах, показал измененный уровень синтеза сигнальных молекул остеоцитов. Предполагается, что ассоциированные с остеопорозом полиморфные варианты влияют на гены костного метаболизма посредством регуляции на больших расстояниях [38]. Анализируя данные GWAS, А. Chesi с соавт. (2019) установили, что 57% идентифицированных пар взаимодействующих участков хроматина, в которых локализованы маркеры риска развития остеопороза, приходятся только на отдаленные гены [39]. Также, было доказано, что несколько полиморфных вариантов локализованы в межгенном суперэнхансере, который может регулировать экспрессию гена *RANKL* посредством дальнедействующих хромосомных взаимодействий [40]. Кроме того, было обнаружено, что межгенный некодирующий вариант, выявленный с применением GWAS и связанный с остеопорозом, rs6426749 на хромосоме 1p36.12, может регулировать экспрессию гена *LINC00339* (некодирующая РНК) посредством образования петли дальнего действия (~360 т.п.н.) [24]. Подавление экспрессии гена *LINC00339* значительно увеличивает экспрессию гена *CDC42* в остеобластах, который является основным регулятором, участвующим в метаболизме костей [24].

Благодаря многопрофильному интегративному анализу группа исследователей из США в 2020 г. определила оптимальную панель мультиомиксных биомаркеров с 74 дифференциально экспрессирующимися генами, 75 дифференциально метилированными сайтами CpG и 23 продуктами дифференциального метаболизма. Связав клинические и генетические данные, они

идентифицировали 199 целевых локусов, ассоциированных с уровнем МПКТ и обнаружили, что значительная часть патогенетических механизмов обогащена сигнальными путями *RANK/RANKL*, *MAPK/TGF-β*, *WNT/β-катенина* и рецептором, связанным с G-белком, ГТФазными теломерными или митохондриальными переключателями, необходимыми для метаболизма костей. Новая информация была получена путем реконструкции метаболических и сигнальных путей, в которые вовлечены продукты генов изучаемых биомаркеров. Пять из них (десатураза жирных кислот 2 *FADS2*, альфа-2А адренергический рецептор *ADRA2A*, формин 1 *FMN1*, член семейства онкогенов *RAS RABL2A*, прорастающий антагонист 1 передачи сигналов *SPRY1*) оказались этиологическими факторами вариабельности уровня МПКТ.

Кроме генетических и биохимических исследований, в настоящее время большое внимание придано изучению эпигенетических механизмов, которые играют существенную роль в патогенезе остеопороза.

### Эпигенетика остеопороза

Изучению эпигенетики исполняется 50 лет, тем не менее, исследование эпигенетических предикторов остеопороза все еще находится в начале своего развития. Наиболее активно анализируются изменения паттернов профиля микроРНК и профиля метилирования ДНК в клетках костной ткани или периферической крови. Установлено, что профиль метилирования в регуляторных регионах некоторых генов костного метаболизма (*SOST*, *RANKL*, *SOX9*, *ROR2*, *OSX*, *ALPL*, *ZNF267*, *MEPE* и *OPG*) оказался ассоциирован со снижением уровня МПКТ [41]. Однако результаты не были воспроизведены в ряде работ по полноэпигеномным исследованиям. Авторы объясняют несопоставимость результатов из-за вероятных популяционных различий на уровне эпигенетической регуляции костного метаболизма, и соответственно, актуальным является анализ уровня метилирования генов и подтверждения их роли в патогенезе остеопороза для популяции определенных географических регионов с максимально близкими условиями жизни, солнечной инсоляции, этноспецифического генофонда и спецификой рациона питания [42].

Установлено, что ингибиторами дифференцировки остеокластов являются микроРНК: miR-126-p, -34a, -7b, -26a, -17/20a, остеобластов — miR-23a, -375, -153, -124, а эффекторами дифференцировки остеокластов — miR-214, -183, -9718, остеобластов — miR-21, -216a, -96, -194 [43]. miR-29a, -218, -355-5p действуют как индукторы остеогенеза, ингибируя внеклеточные отрицательные регуляторы сигнального пути *Wnt/βкатенин* [44]. Особенностью микроРНК является наличие большого количества мишеней в таргетных генах матричной РНК (мРНК). Это приводит к плейотропному эффекту одной микроРНК на несколько генов одновременно. Кроме того, обнаружено, что распределение сайтов-мишеней микроРНК в геноме крайне неравномерно [45]. Для изучения биологической роли микроРНК в дифференциации и пролиферации костных клеток, а также для поиска микроРНК, вовлеченных в патогенез остеопороза, как правило, применяют два подхода: изучение профиля паттернов микроРНК в костной ткани и исследование микроРНК, которые контролируют экспрессию факторов транскрипции [46].

Свойство микроРНК регулировать экспрессию генов определяется связыванием с 3'-нетранслируемыми областями (3'-UTR) целевых мРНК. Следовательно, генетический полиморфизм на 3'-UTR-последовательности

мРНК изменяет аффинность микроРНК к сайту связывания и ведет к изменению регуляции связывания мРНК с рибосомами либо к ее деградации, что приводит к дифференциальной экспрессии целевых генов. Благодаря работе S.F. Lei с соавт. (2011) были обнаружены статистически значимые ассоциации 6 полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК в целевых генах мРНК: полиморфного варианта rs6854081 в гене *FGF2* (фактор роста фибробластов 2 типа), rs1712 в гене *FBOX5* (ген белка ингибитора митоза), rs17054320 в гене *PLEKHG1* (представитель 3 содержащий домен гомологии плекстрина), rs10793442 в гене *ZNF239* (ген белка 239 «цинковых пальцев»), rs10098470 в гене *TPD52* (ген опухолевого белка D52) и rs2745426 в гене *VNN1* (пантетеин гидролаза) с низким уровнем МПКТ. Самые сильные сигналы ассоциации с уровнем МПКТ шейки бедра были обнаружены у полиморфных вариантов rs1712 в гене *FBOX5* белка 5 и rs6854081 в гене *FGF2* [47].

Широко признано, что микроРНК играют важную регуляторную роль во многих клеточных процессах и их aberrантность вносит значительный вклад в возникновение заболеваний. Понимание функций микроРНК в настоящее время затруднено из-за отсутствия надежных подходов к изучению взаимодействий микроРНК с целевыми мРНК. Это объясняется большим количеством потенциальных мишеней микроРНК в 3'-UTR последовательностях. Поэтому систематизация микроРНК, для которых характерна различная аффинность к сайтам связывания целевых мРНК ключевых генов костного метаболизма, является актуальной задачей в области изучения молекулярного патогенеза остеопороза [48].

Исследования, посвященные посттрансляционным модификациям гистонов, позволили обнаружить некоторые статистически значимые предикторы остеопороза. Было обнаружено, что подавление ферментов с трансферазной активностью, вовлеченных в деацетилирование гистонов, усиливает экспрессию генов остеобластогенеза (*RUNX2*, *BGP* и др.), а уровень фактора остеокластогенеза *RANKL* повышается при ацетилировании гистонов H3 и H4 [48]. Известно, что сиртуин 1 (*SIRT1*) индуцирует деацетилирование гистонов, взаимодействуя с промотором гена склеростина — ингибитора дифференцировки остеобластов [49, 50].

Гистоновые метки H3K27ac и H3K4me3 специфически регулируют активность гена остеокальцина *BGP* и транскрипционного фактора *RUNX2*. Примечательно, что при индукции остеогенной дифференцировки мышечных миобластов *C2C12* промотора гена *RUNX2* повышается уровень H3K4me3 и снижается уровень H3K27me3, что может говорить о высокой функциональной значимости этих модификаций в созревании остеобластов [51]. Известно, что малые интерферирующие РНК могут блокировать деацетилазы гистонов и стимулировать

дифференцировку клеток костной ткани [52]. Таким образом, ацетилирование является одним из ключевых звеньев эпигенетической регуляции формирования костей.

В области фундаментальных исследований остеопороза достигнуты существенные успехи в понимании молекулярного патогенеза и большую роль в этом сыграл мультиомиксный подход с использованием передовых методов биоинформатического анализа. Таким образом, в патогенез остеопороза вовлечены как изменения в ДНК, так и сложные взаимодействия биогенных соединений и эпигенетических механизмов, поэтому объяснение и раскрытие архитектуры патогенеза остеопороза требует интеграции результатов GWAS с данными профилирования эпигенетических факторов.

## Заключение

Высокотехнологичные омиксные исследования, основанные на GWAS, изучении метаболитов, экспрессии генов и метилирования ДНК, открывают большие возможности для разработки способов диагностики и терапии остеопороза, в частности, благодаря появлению передовых биоинформатических инструментов, таких как менделевская рандомизация. Тем не менее, применение менделевской рандомизации может быть осложнено рядом проблем, включая горизонтальную плеiotропию, обратную причинно-следственную связь и недостаток статистической мощности. Целевой анализ маркеров с последующим анализом сети их взаимодействий, а также статистическая обработка функциональных аннотаций позволил выявить наиболее обогащенные сигнальные пути с рядом биогенных соединений, регуляторных микроРНК, однонуклеотидных полиморфных вариантов и транскрипционных факторов, которые значимо ассоциированы с остеопорозом. Основной проблемой все еще остается низкая воспроизводимость результатов, особенно в разных странах, что отчасти объясняется отсутствием стандартизованных подходов обработки данных, разным уровнем статистической мощности исследований, а также особенностями генофонда различных популяций мира.

## Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 19-315-90083, мегагранта правительства РФ № 075-15-2021-595, а также в рамках государственного задания Минобрнауки РФ (№ 122041400169-2) и программы деятельности Евразийского научно-образовательного центра мирового уровня за счет средств субсидии в области науки из бюджета Республики Башкортостан для государственной поддержки молодых ученых — аспирантов и кандидатов наук (шифр конкурса — НОЦ-ГМУ-2021).

## ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]:

1. Хусаинова, Р.И., Хуснутдинова Э.К. Генетика остеопороза. Уфа: Гилем; 2015. [Khusainova R.I., Khusnutdinova E.K. Genetics of osteoporosis. Ufa: Gilem; 2015].
2. Ralston S.H., Uitterlinden A.G. Genetics of osteoporosis. *Endocrine Reviews* 2010; 31(5): 629–62.
3. Kiel D.P., Demissie S.J., Dupuis K.L. et al. Genome-wide association with bone mass and geometry in the framingham heart study. *BMC Medical Genetics* 2007; 8(1): 14.
4. Styrkarsdottir U., Halldorsson B.V., Gretarsdottir S. et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *The New England Journal of Medicine* 2008; 358(22): 2355–65.
5. Richards J.B., Rivadeneira F., Inouye M. et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 2008; 371(9623): 1505–12.
6. Rivadeneira F., Styrkarsdottir U., Estrada K. et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nature Genetics* 2009; 41(11): 1199–206.
7. Zheng H.F., Spector T.D., Richards J.B. Insights into the genetics of osteoporosis from recent genome-wide association studies. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2011; 13: 28.
8. Vasikaran S.D., Glendenning P., Morris H.A. The Role of Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis Management in Clinical Practice. *Clinical Biochemist Reviews* 2006; 27(3): 119–21.
9. Seibel M.J. Biochemical Markers of Bone Turnover Part II: Clinical Applications in the Management of Osteoporosis. *Clinical Biochemist Reviews* 2006; 27(3): 123–38.
10. Riggs B.L., Melton L.J., O'Fallon W.M. Drug therapy for vertebral fractures in osteoporosis: Evidence that decreases in bone turnover and

increases in bone mass both determine antifracture efficacy. *Bone* 1996; 18(3): S197–201.

11. Kuo T.R., Chen C.H. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: Recent developments and future perspectives. *Biomarker Research* 2017; 5(1): 1–9.

12. Karasik D., Rivadeneira F., Johnson M.L. The genetics of bone mass and susceptibility to bone diseases. *Nature Reviews Rheumatology* 2016; 12(6): 323–34.

13. Makovey J., Nguyen T., Naganathan V. et al. Genetic effects on bone loss in peri- and postmenopausal women: A longitudinal twin study. *Journal of Bone and Mineral Research* 2007; 22(11): 1773–80.

14. Howard G.M., Nguyen T.V., Harris M. et al. Genetic and environmental contributions to the association between quantitative ultrasound and bone mineral density measurements: A twin study. *Journal of Bone and Mineral Research* 1998; 13(8): 1318–27.

15. Kitsios G.D., Zintzaras E. Genome-Wide Association Studies: hypothesis-‘free’ or ‘engaged’? *Translational Research* 2009; 154(4): 161–4.

16. Estrada K., Stykarsdotter U., Evangelou E. et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nature Genetics* 2012; 44(5): 491–501.

17. Clark G.R., Duncan E.L. The genetics of osteoporosis. *British Medical Bulletin* 2015; 113(1): 73–81.

18. Deng F.Y. Is GSN significant for hip BMD in female Caucasians? *Bone* 2014; 63: 69–75.

19. Xie P., Zhang L., Chen R. et al. Association of COL1A1 polymorphisms with osteoporosis: a meta-analysis of clinical studies. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2015; 8(9): 4764–81.

20. Dytfeld J., Marcinkowska M., Drweska-Matelska N. et al. Association analysis of the COL1A1 polymorphism with bone mineral density and prevalent fractures in Polish postmenopausal women with osteoporosis. *Archives of Medical Science* 2016; 12(2): 288–94.

21. Luo L., Xia W., Nie M. et al. Association of ESR1 and C6orf97 gene polymorphism with osteoporosis in postmenopausal women. *Molecular Biology Reports* 2014; 411(5): 3235–43.

22. Zheng J., Fryszyz M., Kemp J.P. et al. Use of Mendelian Randomization to Examine Causal Inference in Osteoporosis. *Frontiers in Endocrinology* 2019; 10: 807.

23. Trajanoska K., Rivadeneira F. Using Mendelian Randomization to Decipher Mechanisms of Bone Disease. *Current Osteoporosis Reports* 2018; 16(5): 531–40.

24. Trajanoska K., Morris J.A., Oei L. et al. Assessment of the genetic and clinical determinants of fracture risk: genome wide association and mendelian randomisation study. *British Medical Journal* 2018; 366: k3225.

25. Cousminer D.L., Mitchell J.A., Chesni A. et al. Genetically determined later puberty impacts lowered bone mineral density in childhood and adulthood. *Journal of Bone and Mineral Research* 2018; 33(3): 430–6.

26. Kemp J.P., Sayers A., Smith G.D. et al. Using Mendelian randomization to investigate a possible causal relationship between adiposity and increased bone mineral density at different skeletal sites in children. *International Journal of Epidemiology* 2016; 45(5): 1560–72.

27. Ahmad O.S., Leong A., Miller J.A. et al. A Mendelian Randomization Study of the Effect of Type-2 Diabetes and Glycemic Traits on Bone Mineral Density. *Journal of Bone and Mineral Research* 2017; 32(5): 1072–81.

28. Gan W., Clarke R.J., Mahajan A. et al. Bone mineral density and risk of type 2 diabetes and coronary heart disease: A Mendelian randomization study. *Wellcome Open Research* 2017; 2: 68.

29. Yokomoto-Umakoshi M., Umakoshi H., Miyazawa T. et al. Investigating the causal effect of fibroblast growth factor 23 on osteoporosis and cardiometabolic disorders: A Mendelian randomization study. *Bone* 2021; 143: 115777.

30. Garnero P., Delmas P.D. New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcified Tissue International* 1996; 59(1): S2–9.

31. Deng F.Y., Liu Y.Z., Li M.L. et al. Proteomic analysis of circulating monocytes in Chinese premenopausal females with extremely discordant bone mineral density. *Proteomics* 2008; 8(20): 4259–72.

32. Deng F.Y., Lei S.F., Chen X.D. et al. An integrative study ascertained SOD2 as a susceptibility gene for osteoporosis in Chinese. *Journal of Bone and Mineral Research* 2011; 26(11): 2695–701.

33. Qi T., Qu Q., Li G. et al. Function and regulation of the PEA3 subfamily of ETS transcription factors in cancer. *American Journal of Cancer Research* 2020; 10(10): 3083–105.

34. You Y.S., Lin Y.C., Liang H.J. et al. Association between the metabolome and low bone mineral density in taiwanese women determined by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Journal of Bone and Mineral Research* 2014; 29(1): 212–22.

35. Lello L., Raben T.G., Yong S.Y. et al. Genomic Prediction of 16 Complex Disease Risks Including Heart Attack, Diabetes, Breast and Prostate Cancer. *Scientific Reports* 2019; 9(1): 15286.

36. Moayyeri A., Cheung C.L., Tan K.C. et al. Metabolomic Pathways to Osteoporosis in Middle-Aged Women: A Genome-Metabolome-Wide Mendelian Randomization Study. *Journal of Bone and Mineral Research* 2018; 33(4): 643–50.

37. Guo Y., Dong S.S., Chen X.F. et al. Integrating Epigenomic Elements and GWASs Identifies BDNF Gene Affecting Bone Mineral Density and Osteoporotic Fracture Risk. *Scientific Reports* 2016; 6: 1–12.

38. Morris J.A., Kemp J.P., Youtten S.E. et al. An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice. *Nature Genetics* 2019; 51(2): 258–66.

39. Chesni A., Wagley Y., Johnson M.E. et al. Genome-scale Capture C promoter interactions implicate effector genes at GWAS loci for bone mineral density. *Nature Communications* 2019; 10(1): 1260.

40. Chen X.F., Zhu D.L., Yang M. et al. An Osteoporosis Risk SNP at 1p36.12 Acts as an Allele-Specific Enhancer to Modulate LINC00339 Expression via Long-Range Loop Formation. *American Journal of Human Genetics* 2018; 102(5): 776–93.

41. Reppe S., Datta H., Gautvik K. The Influence of DNA Methylation on Bone Cells. *Current Genomics* 2015; 16(6): 384–92.

42. Yalaev B.I., Tyurin A.V., Mirgalieva R.Y. et al. The role of DNA methylation in the disorders of bone metabolism. *Vavilov journal of genetics and breeding* 2019; 23(1): 67–74.

43. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Эпигенетика остеопороза. *Медицинская генетика* 2018; 12(6): 3–10. [Yalaev B.I., Khusainova R.I. Epigenetics of osteoporosis. *Medicinal genetics* 2018; 12(6): 3–10].

44. Галицына Е.В., Бухарова Т.Б., Васильев А.В. и соавт. МикроРНК в регуляции остеогенеза in vitro и in vivo: от фундаментальных механизмов к патогенезу заболеваний костной ткани. *Гены и клетки* 2019; 14(1): 41–8. [Galicyna E.V., Buharova T.B., Vasilev A.V. et al. MicroRNAs in the regulation of osteogenesis in vitro and in vivo: from fundamental mechanisms to bone diseases pathogenesis. *Genes and Cells* 2019; 14(1): 41–8].

45. Zhang F., Wang D. The pattern of microRNA binding site distribution. *Genes* 2017; 8(11): 296.

46. Chen J., Qiu M., Dou C. et al. MicroRNAs in Bone Balance and Osteoporosis. *Drug Development Research* 2015; 76(5): 235–45.

47. Lei S.F., Papiasian C.J., Deng H.W. Polymorphisms in predicted miRNA binding sites and osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 2011; 26(1): 72–8.

48. Гребенникова Т.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я. и соавт. Эпигенетические аспекты остеопороза. *Вестник российской академии медицинских наук* 2015; 70(5): 541–8. [Grebennikova T.A., Belaya Z.E., Rozhinskaya L.Y. et al. Epigenetic aspects of osteoporosis. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences* 2015; 70(5): 541–8].

49. Cohen-Kfir E., Artsi H., Levin A. et al. Sirt1 is a regulator of bone mass and a repressor of Sost encoding for sclerostin, a bone formation inhibitor. *Endocrinology* 2011; 152(12): 4514–24.

50. Dydikina I.S., Vetkova E.S. Sclerostin and its role in the regulation of bone metabolism. *Rheumatology Science and Practice* 2013; 51(3): 296–301.

51. Kim H.N., Lee J.H., Jin W.J. et al. MS-275, a benzamide histone deacetylase inhibitor, prevents osteoclastogenesis by down-regulating c-Fos expression and suppresses bone loss in mice. *European Journal of Pharmacology* 2012; 691(1–3): 69–76.

52. Cosman F., Beur S.J., LeBoff M.S. et al. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporosis International* 2014; 25(10): 2359–81.