

УДК 575.174.015.3

**Н.В. ЖУР**

младший научный сотрудник  
отраслевой лаборатории «Лонгитудинальные исследования»<sup>1</sup>

**С.В. ЕВДОЛЮК**

главный врач УЗ «Брестский областной диспансер спортивной медицины»

**Т.Л. ЛЕБЕДЬ**

заведующий отраслевой лабораторией «Лонгитудинальные исследования»<sup>1</sup>

**Т.В. МАРИНИЧ**, канд. мед. наук

доцент кафедры физической реабилитации и спортивной медицины<sup>1</sup>

**Н.Г. КРУЧИНСКИЙ**, д-р мед. наук,

заведующий кафедрой физической реабилитации и спортивной медицины<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Полесский государственный университет, г. Пинск, Республика Беларусь

*Статья поступила 15 апреля 2024 г.*

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ  
И ПРОГНОЗИРОВАНИИ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К  
НАРУШЕНИЮ МИНЕРАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ**

*Применение молекулярно-генетических подходов для анализа различных биомаркеров позволяет рано диагностировать и подбирать оптимальную терапию для многих заболеваний, однако открытым остается вопрос анализа и интерпретации получаемых данных.*

**Ключевые слова:** минеральная плотность костной ткани, молекулярно-генетические типирование, фенотип, генотип.

**ZHUR N.V.**, Junior Researcher of the Industry Laboratory «Longitudinal Studies»<sup>1</sup>

**EVDOLYUK S.V.**, Chief Physician of Brest Regional Dispensary for Sports Medicine

**LEBED T.L.**, Head of the Branch Laboratory «Longitudinal Studies»<sup>1</sup>

**MARINICH T.V.**, PhD in Med. Sc.<sup>1</sup>

**KRUCHYNSKY N.G.**, Doctor of Med. Sc., Professor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus

**MOLECULAR GENETIC METHODS IN DIAGNOSING AND PREDICTING  
INDIVIDUAL PREDISPOSITION TO BONE MINERAL DENSITY DISORDERS**

*The use of molecular genetic approaches to analyze various biomarkers allows early diagnosis and selection of optimal therapy for many diseases, but the question of analyzing and interpreting the obtained data remains open.*

**Keywords:** bone mineral density, molecular genetic typing, phenotype, genotype.

**Введение.** Ранняя молекулярно-генетическая диагностика представляет собой современный метод выявления и опреде-

ления характера генетических нарушений, связанных с возникновением различных за-

болеваній. Ёе важнасць заключаецца ў некалькіх аспектах.

Дыягностыка забоеваній на ранніх (да іх клінічных праяўленняў) стадыях осцешствляецца благодаря выяўленню генетычных маркераў. Гэта спосабствуе ўлучшэнню прагноза, павышэнню эфектыўнасці лечення і возможнасці правядзення прафілактычных мер і скрынінга ў груп рыска.

Определение индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам и выбор оптимальной терапии на основе генетического профиля пациента позволяет снизить риск побочных эффектов и улучшить качество жизни пациентов.

Дифференциация различных типов и подтипов забоеваній со схожими симптомами, но требующих различных подходов к лечению.

Существует множество положительных примеров использования генетических исследований для ранней диагностики забоеваній. Например, ранняя диагностика генетических забоеваній в период беременности и у новорожденных позволяет определить наличие у ребенка наследственных забоеваній, таких как фенилкетонурия, гипотиреоз, цистический фиброз и др. Для этого используется анализ крови из пятна на фильтровальной бумаге, взятой из пуповинной вены или из пятна на коже калканеуса. Ранняя диагностика генетических забоеваній у новорожденных позволяет начать своевременное лечение и профилактику, что способствует улучшению прогноза и качества жизни ребенка [1,2].

Ранняя диагностика онкопатологии позволяет определить наличие и характер опухолевых маркеров в крови или других биологических жидкостях, а также выявить генетические мутации, связанные с повышенным риском развития рака. Для этого используются различные методы молекулярно-генетического анализа (ПЦР, FISH, NGS и др.) Ранняя диагностика рака позволяет обнаружить опухоль на стадиях, когда лечение является наиболее эффективным и менее травматичным [7].

Ранняя диагностика болезни Альцгеймера, когда при подозрении на ее развитие определяют наличие и характер белковых отложений в мозге (амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков), которые являются

основными патоморфологическими признаками. Для этого используются различные методы нейромиджинга: ПЭТ, МРТ, СПЕСТ и др. Ранняя диагностика болезни Альцгеймера позволяет начать лечение до появления клинических симптомов, что замедляет прогрессирование болезни и улучшает качество жизни пациента [13].

Следовательно, молекулярно-генетическая диагностика является важным инструментом современной медицины и биологии, который способствует более точной, быстрой и персонализированной диагностике и лечению различных забоеваній.

В рамках исследования забоеваній, связанных с генетическими особенностями организма, как правило анализируют межгенные взаимодействия и стремятся найти причинно-следственные связи между ними и изучаемыми явлениями [7,8]. В этом контексте рассматривается множество генов или локусов, которые могут оказывать влияние. Один из часто используемых методов, который позволяет делать статистически обоснованные выводы о влиянии межгенных взаимодействий на фенотипы, это метод снижения мультифакторной размерности (MDR, Multifactor Dimensionality Reduction). MDR представляет собой непараметрический метод, не требующий строгой модели, и успешно применяемый для обнаружения эпистатических взаимодействий как в теоретических, так и в эмпирических исследованиях. Метод оперирует такими категориальными данными, как однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), и сокращает размерность данных с множеством локусов, объединяя генотипы в группы высокого или низкого риска или ответа, что позволяет более эффективно выявлять генетические комбинации, связанные с клиническими исходами [12].

В статье рассматриваются основные причины снижения минеральной плотности костной ткани (МПК) у спортсменов, связанные с генетической предрасположенностью, в результате накопления генетических факторов риска [8,11].

**Материалы и методы исследования.** Общее число обследованных профессиональных спортсменов составило 60 человек, 30 из которых представляли Брестское областное училище олимпийского резерва (БрУОР) и 30 спортсменов – специализиро-

ваннаго по спорту класса лица ПолесГУ. Спортсмены были распределены на 2 подгруппы: виды спорта с преимущественным тренировочным и соревновательным процессом в спортивном зале (22 человека) и виды спорта с преимущественным тренировочным и соревновательным процессом на открытом воздухе (38 человек).

Забор биоматериала (буккальный эпителий) проводили после получения информированного согласия. Молекулярно-генетическое типирование в рамках исследования костной ткани производили по следующим полиморфизмам: Arg577Ter ACTN3 (rs1815739), A/G EPAS1 (rs1867785), +294T/C PPARC (rs4253778), Gly482Ser PPARC1A (rs2016520), C/T VDR (rs731236), G/T COL1A (rs1800012) [4,6].

Лабораторные исследования проводились с использованием следующего оборудования: амплификатор, амплификатор R-time, ПЦР-бокс с УФ-лампой, система геледокументирования, камера для горизонтального электрофореза с блоком питания, заливочный столик с гребенками (объем лунки 10-20 мкл).

Обработка данных проводилась при помощи математических методов анализа: описательная статистика и корреляционный анализ, метод общего генетического балла и Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) [12].

Для учета индивидуального генетического риска использовалась методика расчета общего генетического балла (ОГБ). Максимальное значение ОГБ было принято за 12, а минимальное – ноль, при условии сочетания генотипов, ассоциированных только с патогенезом почек. При отсутствии в генотипе аллелей, ассоциированных с риском, он получал 0 баллов, при наличии 1 аллели – 1 балл, 2 аллелей – 2 балла. ОГБ представляет собой сумму показателей всех исследованных генов.

Для определения накопления факторов риска использовался статический показатель относительного риска (ОР). Относительный риск – отношение вероятностей развития определенного исхода в группах сравнения.

Показатель относительного риска сравнивался с 1 с целью определения характера связи фактора и исхода:

–  $OR = 1$  (исследуемый фактор не влияет на вероятность исхода (отсутствие связи между фактором и исходом));

–  $OR > 1$  (фактор повышает частоту исходов – прямая связь);

–  $OR < 1$  (фактор снижает вероятность исхода при воздействии фактора – обратная связь). Для оценки полученных показателей относительного риска использовался доверительный интервал, ДИ (confidence interval, CI): мера точности оценки показателя, отражающая диапазон, в котором могут находиться его реальные значения. Диапазон 95% ДИ будет включать в себя 95% результатов, полученных в исследованиях с аналогичной структурой, одинаковыми размерами выборки и характеристиками участников [5].

Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) проводился с использованием размещенного в открытом доступе ПО MDR v.3.0.2. Математической базой данных программы является непараметрический кластерный анализ для обнаружения и описания нелинейного типа взаимодействия между дискретными генетическими атрибутами. В процессе моделирования нами были использованы высоко консервативные настройки поиска конфигурации модели, которые позволили однозначно дифференцировать наличие/отсутствие статистически значимых эффектов:

– количество атрибутов (attribute count range) – от 1 до n (где n – количество переменных в модели);

– воспроизводимость модели (cross-validation count) – 5;

– анализ топ-моделей (track top models) – 500;

– поиск конфигурации модели (searchmethod configuration) – exhaustive;

– метод сравнения (ambiguous cell analysis) – fisher's exact test. [12]

Исследования проводились на базе Отраслевой лаборатории “Лонгитудинальные исследования” ПолесГУ.

Ультразвуковое обследование плотности костной ткани (денситометрия) проводилась с помощью ультразвукового остеоденситометра “Omnisense 9000” (Израиль).

Диагностические критерии УЗИ-денситометрии (Z-критерий) минеральной плотности костной ткани (МПК) сформиро-

ваны в соответствии с рекомендациями ВОЗ 1994 года [13]:

нормальные показатели: изменение МПК в пределах  $-1$  стандартного отклонения;

остеопения I степени: снижение МПК в пределах от  $-1$  до  $-1,5$  SD;

остеопения II степени: снижение МПК в пределах от  $-1,6$  до  $-2,0$  SD;

остеопения III степени: снижение МПК в пределах от  $-2,1$  до  $-2,5$  SD;

остеопороз: снижение МПК  $< -2,5$ .

**Результаты и обсуждение.** В рамках исследования проведенное ультразвуковое морфо-денситометрическое обследование минеральной плотности костной ткани (МПК) спортсменов позволило поделить их на 2 подгруппы с изменениями и без изменений МПК.

В результате проведенного анализа полученных данных выделено сочетание аллелей генов, не обеспечивающее максимально возможную реализацию генетического потенциала и функциональных возможностей организма к развитию костной ткани в процессе спортивной деятельности: ТТ гена VDR, ТТ гена PPAR $\alpha$ , АА гена EPAS1, ТТ гена ACTN3, Ser/Ser гена PPARGC1A и ТТ гена COL1A. На основании выделенных параметров был рассчитан ОГБ (рисунок 1).

В подгруппе спортсменов с отклонением МПК отмечается более высокая величина ОГБ по сравнению с подгруппой без отклонений в плотности костной ткани, где максимальное значение ОГБ составляет 9-10 баллов.

Согласно сложившимся критериям по результатам ранее проведенных исследований [3] спортсмены могут быть отнесены к группам риска развития остеопороза и травматических повреждений (значения Z-критерия МПК составляют от 2,5 до 1,99 у.е.), а также нагрузочного повреждения опорно-двигательного аппарата, когда значение ОГБ составляет  $> 8$  баллов.

При комплексном анализе маркеров исследуемых с отклонением МПК и без нарушений МПК был рассчитан относительный риск (RR) образования нарушений МПК при накоплении предрасполагающих генотипов и особенно их комбинаций.

Полученные результаты расчета относительного риска подтвердили, что определяющее значение для развития нарушений имеет кумуляция предрасполагающих вариантов генов в индивидуальном генотипе: у носителей 5 предрасполагающих вариантов генотипа относительный риск (RR) составил 3.163 при 95% CI – 1.265-7.912.

В результате были выделены группы риска развития нарушений МПК на основании оценки накопления факторов риска при помощи расчета общего генетического балла (ОГБ) и отношения рисков.

При анализе данных молекулярно-генетического тестирования методом MDR, все исследуемые были разделены на 2 подгруппы: исследуемые с отклонением МПК и без, на основании УЗ-исследования МПК (Z-критерий).

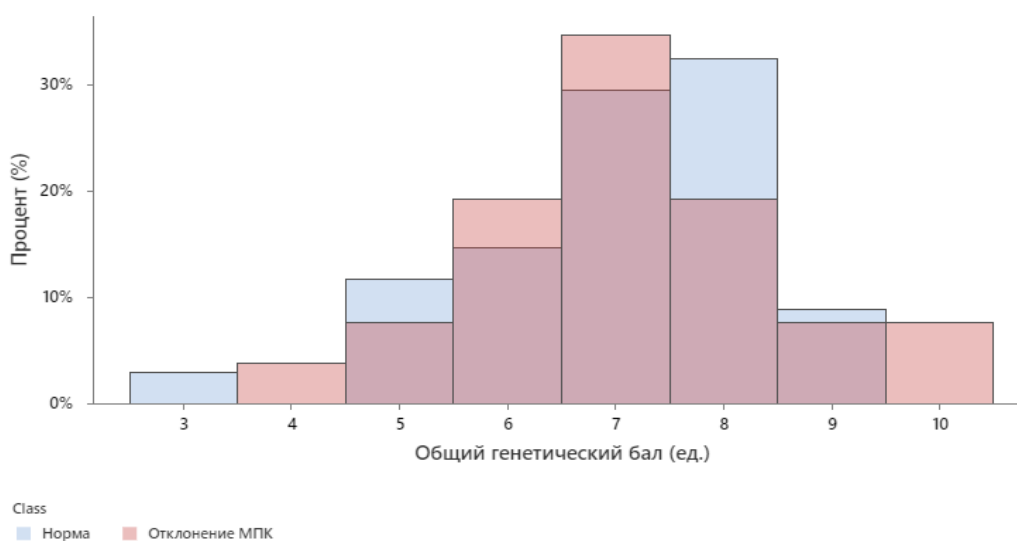


Рисунок 1. – Распределение значений ОГБ среди всех обследованных спортсменов

В результате проведенного анализа была выявлена единственная статистически достоверная повторяющаяся модель комбинаций генотипа, влияющая на развитие нарушений МПК (рисунок 2), что продемонстрировало гипотетическое распределение случаев встречаемости комбинации генов. При расчетах среди исследуемых с генотипом PPARD (T/T) показано статистически достоверное смещение в сторону исследуемых без нарушений МПК.

С учетом того, что выраженных статистически достоверных комбинаций генотипов генов, отвечающих за моделирование костной ткани, выявлено не было, а также того, что ген PPARD преддетерминирует прирост

аэробных способностей и адаптацию к тренировкам данного вида, важным выводом является следующее: носительство TT гена PPARD и CC гена ACTN3 в совокупности с нарушениями МПК может приводить к повышению частоты возникновения стресс-травм даже в рамках тренировочного процесса.

При дальнейшем рассмотрении расчетных статистических моделей, включающих более 2-х генов, не было показано достаточной достоверности и повторяемости выборочной модели, что может быть связано с неоднородностью выборок обследованных.

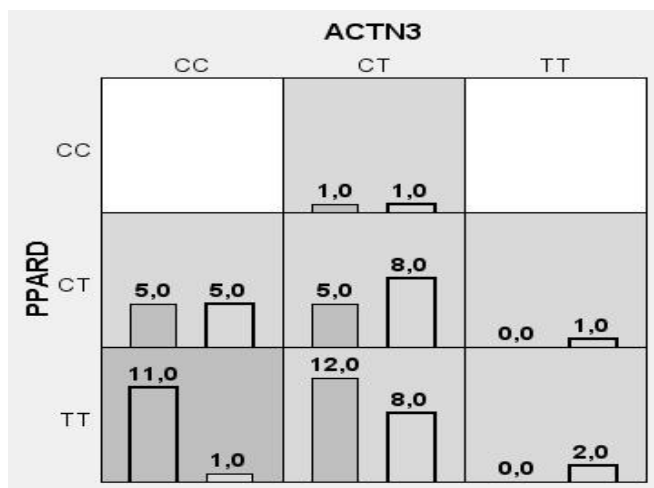


Рисунок 2. – Диаграмма моделей взаимодействий исследуемых подгрупп ( $p = 0,0062$ )

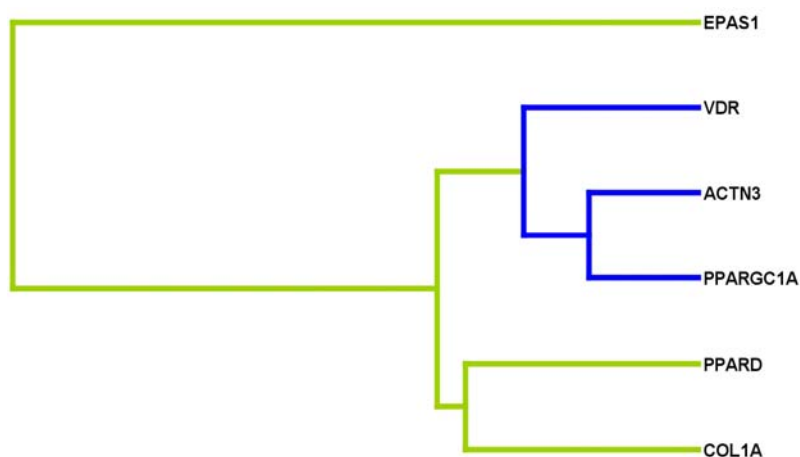


Рисунок 3. – Межгенные взаимодействия полиморфных вариантов генов: характер взаимодействия – антагонизм (зеленый – умеренному антагонизму и синий – выраженному антагонизму)

При рассмотрении дендрограммы межгенных взаимодействий (рисунок 3), полученной в результате MDR анализа, не было выявлено синергирующих межгенных взаимодействий. Однако был смоделирован комплекс генов, находящихся в антагонистических взаимодействиях, в рамках рассчитанной статистически достоверной модели VDR, ACTN3 и PPARGC1A.

**Заключение.** Таким образом, полученные результаты проведенного комплексного исследования особенностей состояния минеральной плотности костной ткани и ее ДНК-анализа по комплексу генов у профессиональных спортсменов позволяют дополнить и расширить известные представления по оценке индивидуальной предрасположенности к развитию потенциальных нарушений МПК и выделить группы риска развития остеопороза и нагрузочных повреждений опорно-двигательного аппарата при помощи проведения молекулярно-генетического тестирования и оценки накопления факторов риска в рамках предложенной модели с использованием комбинированного метода подсчета общего генетического балла, расчета отношения рисков и MDR анализа.

#### Список литературы

1. Ахметов, И. И. Молекулярная генетика спорта: монография / И. И. Ахметов. – М.: Советский спорт, 2009. – 268 с.
2. Баранов, В. С. Генетический паспорт и медицина будущего / В. С. Баранов // Химия и жизнь. – 2011. – № 1. – С. 6-11.
3. Жур, Н. В. Исследование динамики состояния метаболизма костной ткани у спортсменов юниорского и молодежного возраста / Н. В. Жур, Т. Л. Лебедь, Н. В. Шепелевич // Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси : материалы XVII международной молодежной научно-практической конференции, Пинск, 14 апреля 2023 г. : в 2-х ч. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.] ; редкол.: В.И. Дунай [и др.]. – Пинск : ПолесГУ, 2023. – Ч. 2. – С. 208-211.
4. Козлова, А. С. Полиморфизм генов ACTN3 и PPARGC1A у профессиональных таэквондистов / А. С. Козлова, Н. Г. Кручинский, С. Б. Мельнов // Здоровье для всех: материалы четвертой международной научно-практической конференции, УО «Полесский государственный университет» г. Пинск, 26-27 апр. 2012 г. / Национальный банк Республики Беларусь [и др.]; редкол.: К. К. Шебеко [и др.]. – Пинск : ПолесГУ, 2012. – С. 246 – 249.
5. Критерии и методы относительный риск [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://medstatistic.ru/methods/methods7.html> / – Дата доступа: 27.04.2024
6. Кручинский, Н.Г. Генетические маркеры успешности спортивной деятельности как элемент программы генетического мониторинга по определению профиля спортивной деятельности и индивидуализации тренировочного процесса спортсменов / Н. Г. Кручинский [и др.] // Инновационные технологии в подготовке спортсменов : материалы 3-й научно-практической конференции. – М.: ГКУ «ЦСТиСК» Москомспорта, 2015. – С. 40 – 43.
7. Мельнов С.Б. Генетические маркеры успешности спортивной деятельности единоборцев / С.Б. Мельнов [и др.] // Спортивная медицина. – Киев, 2014. – № 2. – С. 20 – 31.
8. Оганов, В. С. О возможной связи проявлений остеопении с биохимическими и генотипическими маркерами костного метаболизма у спортсменов после интенсивной физической нагрузки. Часть I. / В. С. Оганов [и др.] // Остеопороз и остеопатии. – 2008. – Т.11. – № 1. – С. 2-5. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://elibrary.ru/contents.asp?id=33381344&selid=12897140>.
9. Руководство по ранней диагностике рака [Guide to cancer early diagnosis]. – Женева : Всемирная организация здравоохранения; 2018. Лицензия: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
10. Alzheimer's Association: 2022 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's Dement* 18 (4):700–789, 2022. DOI: 10.1002/alz.12638
11. Brukner P., Khan K. (Eds). *Biomechanics of Common Sporting Injuries*. Chapter 5 (With Agosta J.) In: *Clinical Sports Medicine*, McGraw-Hill Professional, 2008. – PP. 40-77.
12. Multifactor Dimensionality Reduction [Электронный ресурс] 24.12.2014. – Режим доступа:

<https://sourceforge.net/projects/mdr/>. – Дата  
доступа: 27.04.2024

13. Report of a WHO Study Group. 1994 Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. 1994 World Health Organ Tech Rep Ser 843:1-129

### References

1. Ahmetov I.I. *Molekulyarnaya genetika sporta* [Molecular genetics of sports] Moscow, Sovetskij sport, 2009. 268 p. (In Russian)
2. Baranov V.S. Geneticheskij pasport i medicina budushogo [Genetic passport and medicine of the future]. *Himiya i zhizn* [Chemistry and life]. 2011, no. 1, pp. 6-11. (In Russian)
3. Zhur N.V., Lebed T.L., Shepelevich N.V. Issledovanie dinamiki sostoyaniya metabolizma kostnoj tkani u sportsmenov yunior'skogo i molodezhnogo vozrasta [Investigation of the dynamics of the state of bone metabolism in athletes of junior and youth age] *Nauchnyj potencial molodezhi budushemu Belarusi* [Scientific potential of youth – the future of Belarus] Ed. Dunaj V.I. et al. Pinsk, PolesGU, 2023, pp. 208-211. (In Russian)
4. Kozlova A.S., Kruchinskij N.G., Melnov S.B. Polimorfizm genov ASTN3 i PPARGCIA u professionalnyh taekvondistov [Polymorphism of the genes ASTN3 and PPARGCIA in professional taekwondo practitioners] *Zdorove dlya vseh* [Health for all]. Ed. Shebeko K. K. et al. Pinsk, PolesGU, 2012, pp. 246 – 249. (In Russian)
5. *Kriterii i metody odnositelnyj risk* [Criteria and methods of relative risk]. (In Russian). Available at: <https://medstatistic.ru/methods/methods7.html>. (accessed: 27.04.2024).
6. Kruchinskij, N.G. Mel'nov, S.B. Evdolyuk, S.V. Davydov, V.Yu. *Geneticheskie markery uspešnosti sportivnoj deyatelnosti kak element programmy geneticheskogo monitoringa po opredeleniyu profilya sportivnoj deyatelnosti i individualizacii trenirovochnogo processa sportsmenov* [Genetic markers of the success of sports activity as an element of the genetic monitoring program to determine the profile of sports activity and individualization of the training process of athletes]. M.: GKU «CSTiSK» Moskomsporta, 2015. С. 40-43. (In Russian)
7. Melnov S.B. Kozlova A.S., Kruchinskij N.G., Lebed T.L. Geneticheskie markery uspešnosti sportivnoj deyatelnosti edinoborcev [Genetic markers of the success of sports activities of martial artists]. *Sportivnaya medicina* [Sports Medicine]. Kiev, 2014, no. 2, pp. 20-31. (In Russian)
8. Oganov V. S., Vinogradova O. L., Dudov N. S., Baranov V.S., Minenkov A.S., *Vozmožnoj svyazi proyavlenij osteopenii s biohimicheskm i genotipicheskimi markerami kostnogo metabolizma u sportsmenov posle intensivnoj fizicheskoj nagruzki* [On the possible connection of manifestations of osteopenia with biochemical and genotypic markers bone metabolism in athletes after intense physical activity] Chast I. Osteoporoz i osteopatii. 2008, vol.11, no. 1, pp. 2-5. (In Russian). Available at: <https://elibrary.ru/contents.asp?id=33381344&selid=12897140>.
9. *Rukovodstvo po rannej diagnostike raka* [Guide to cancer early diagnosis]. Zheneva, Vsemirnaya organizaciya zdorooohraneniya; 2018. Licenziya: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. (In Russian)
10. Alzheimer's Association: 2022 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement* 18 (4):700–789, 2022. DOI: 10.1002/alz.12638
11. Brukner P., Khan K. (Eds). *Biomechanics of Common Sporting Injuries*. Chapter 5 (With Agosta J.) In: *Clinical Sports Medicine*, McGraw-Hill Professional, 2008. PP. 40-77.
12. Multifactor Dimensionality Reduction. Available at: <https://sourceforge.net/projects/mdr/> (accessed: 27.04.2024)
13. Report of a WHO Study Group. 1994 Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. 1994 World Health Organ Tech Rep Ser 843:1-129.

Received 15 April 2024