

Использование данных биобанков в изучении генетической архитектуры остеопороза и разработке шкал генетического риска

Сотникова Е. А.¹, Киселева А. В.¹, Мешков А. Н.^{1,2}, Ершова А. И.¹, Иванова А. А.¹, Колчина М. А.¹, Куценко В. А.^{1,3}, Скрипникова И. А.¹, Драпкина О. М.¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России. Москва; ²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава России. Москва; ³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова». Москва, Россия

Остеопороз — хроническое системное заболевание скелета, характеризующееся снижением костной массы и нарушением костной микроархитектуры, что может приводить к уменьшению прочности костей и повышению риска переломов при незначительной травме. Показатель, на основе которого устанавливается диагноз остеопороза — минеральная плотность кости (МПК), обладает высокой наследуемостью, составляющей по разным данным от 50 до 85%. Как и в случае с другими комплексными признаками, наиболее распространенный подход к поиску генетических вариантов, влияющих на МПК, — это полногеномный поиск ассоциаций. Чем ниже величина эффекта или частота варианта, тем больший размер выборки требуется для достижения убедительной статистической поддержки выявленной ассоциации. Исследования, включающие сотни тысяч участников, на основе выборок и данных биобанков позволяют выявить наибольшее число вариантов, ассоциированных с МПК. Кроме того, данные биобанков используются при разработке шкал генетического риска переломов и развития остеопороза, применение которых возможно в сочетании с существующими прогностическими алгоритмами и независимо от них. Цель обзора — представить наиболее значимые публикации по изу-

чению генетики остеопороза, в т.ч. на основе данных биобанков, включающие исследования по полногеномному поиску ассоциаций, а также работы по оценке шкал генетического риска и анализу вклада редких вариантов.

Ключевые слова: остеопороз, минеральная плотность кости, шкала генетического риска, биобанк, GWAS (genome-wide association study).

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 07/09-2021

Рецензия получена 26/09-2021

Принята к публикации 07/10-2021



Для цитирования: Сотникова Е. А., Киселева А. В., Мешков А. Н., Ершова А. И., Иванова А. А., Колчина М. А., Куценко В. А., Скрипникова И. А., Драпкина О. М. Использование данных биобанков в изучении генетической архитектуры остеопороза и разработке шкал генетического риска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021;20(8):3045. doi:10.15829/1728-8800-2021-3045

Biobank data for studying the genetic architecture of osteoporosis and developing genetic risk scores

Sotnikova E. A.¹, Kiseleva A. V.¹, Meshkov A. N.^{1,2}, Ershova A. I.¹, Ivanova A. A.¹, Kolchina M. A.¹, Kutsenko V. A.^{1,3}, Skripnikova I. A.¹, Drapkina O. M.¹

¹National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow; ²Russian National Research Medical University. Moscow;

³Lomonosov Moscow State University. Moscow, Russia

Osteoporosis is a chronic systemic disease of the skeleton, characterized by a decrease in bone mass and an impairment of bone microarchitecture, which can lead to a decrease in bone strength and an increase in the risk of minor trauma fractures. Osteoporosis is diagnosed on the basis of bone mineral density (BMD). BMD is characterized by high heritability that ranges according to various sources from 50 to 85%. As in the case of other complex traits, the most common approach to searching for genetic variants that affect BMD is a genome-wide association study. The lower effect size or frequency of a variant is, the larger the sample size is required to achieve statistically significant data on associations. Therefore, the

studies involving hundreds of thousands of participants based on biobank data can identify the largest number of variants associated with BMD. In addition, biobank data are used in the development of genetic risk scores for osteoporosis that can be used both in combination with existing prognosis algorithms and independently of them. The aim of this review was to present the most significant studies of osteoporosis genetics, including those based on biobank data and genome-wide association studies, as well as studies on the genetic risk scores and the contribution of rare variants.

Keywords: osteoporosis, bone mineral density, genetic risk score, biobank, GWAS (genome-wide association study).

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: sotnikova.evgeniya@gmail.com

Тел.: +7 (985) 452-09-69

[Сотникова Е. А.* — м.н.с. лаборатории молекулярной генетики, ORCID: 0000-0002-8395-4146, Киселева А. В. — к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики, ORCID: 0000-0003-4765-8021, Мешков А. Н. — к.м.н., руководитель лаборатории молекулярной генетики, доцент кафедры общей и медицинской генетики медико-биологического факультета, ORCID: 0000-0001-5989-6233, Ершова А. И. — к.м.н., руководитель лаборатории клиномики, ORCID: 0000-0001-7989-0760, Иванова А. А. — ординатор, ORCID: 0000-0002-2812-959X, Колчина М. А. — м.н.с. отдела профилактики остеопороза, ORCID: 0000-0002-8164-8946, Куценко В. А. — м.н.с. лаборатории биостатистики, аспирант кафедры теории вероятностей механико-математического факультета, ORCID: 0000-0001-9844-3122, Скрипникова И. А. — д.м.н., руководитель отдела профилактики остеопороза, ORCID: 0000-0002-1763-0725, Драпкина О. М. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор, ORCID: 0000-0002-4453-8430].

Relationships and Activities: none.

Sotnikova E. A.* ORCID: 0000-0002-8395-4146, Kiseleva A. V. ORCID: 0000-0003-4765-8021, Meshkov A. N. ORCID: 0000-0001-5989-6233, Ershova A. I. ORCID: 0000-0001-7989-0760, Ivanova A. A. ORCID: 0000-0002-2812-959X, Kolchina M. A. ORCID: 0000-0002-8164-8946, Kutsenko V. A. ORCID: 0000-0001-9844-3122, Skripnikova I. A. ORCID: 0000-0002-1763-0725, Drapkina O. M. ORCID: 0000-0002-4453-8430.

*Corresponding author: sotnikova.evgeniya@gmail.com

Received: 07/09-2021

Revision Received: 26/09-2021

Accepted: 07/10-2021

For citation: Sotnikova E. A., Kiseleva A. V., Meshkov A. N., Ershova A. I., Ivanova A. A., Kolchina M. A., Kutsenko V. A., Skripnikova I. A., Drapkina O. M. Biobank data for studying the genetic architecture of osteoporosis and developing genetic risk scores. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(8):3045. (In Russ.) doi:10.15829/1728-8800-2021-3045

ВНП — вариант нуклеотидной последовательности, ДИ — доверительный интервал, МПК — минеральная плотность кости, ПОП — поясничный отдел позвоночника, УМПК — МПК, оцененная на основе данных костной ультрасонографии, ШБ — шейка бедренной кости, ШГР — шкала генетического риска, FRAX — Fracture Risk Assessment Tool (шкала для оценки 10-летней вероятности остеопорозных переломов), GWAS — genome-wide association study (полногеномный поиск ассоциаций).

Остеопороз — хроническое системное заболевание скелета, характеризующееся снижением костной массы и нарушением костной микроархитектуры, что может приводить к уменьшению прочности костей и повышению риска переломов при незначительной травме [1]. Остеопорозом страдают представители обоих полов разных этнических групп, к группе с наибольшим риском относятся женщины европейского происхождения в постменопаузальном периоде [2, 3]. В 2010г количество лиц ≥ 50 лет с высоким риском переломов было оценено в 158 млн [4]. Большинство исследований показывают, что риск переломов увеличивается при снижении минеральной плотности кости (МПК) [5]. На долю переломов, обусловленных остеопорозом, приходится $\sim 1\%$ лет жизни, скорректированных по нетрудоспособности, вызванной неинфекционными заболеваниями, — 2,8 млн лет ежегодно в Европе и Америке [6]. В России общее число случаев перелома проксимального отдела бедренной кости в 2010г было оценено в 112 тыс. случаев [7]. В работе Mai H, et al. (2019) было показано, что 21% переломов у женщин и 16% у мужчин обусловлены остеопорозом; на лиц пожилого возраста (>70 лет) больных остеопорозом приходилось $\sim 60\%$ переломов бедра [8]. Ранее было показано, что $>90\%$ всех переломов бедра и позвоночника у пожилых женщин европейского происхождения, связаны с остеопорозом [9]. Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения с 1994г и действующим федеральным клиническим рекомендациям по диагностике, лечению и профилактике остеопороза, диагноз устанавливается при значении МПК, измеренной с помощью двухэнергетической рентгеновской денситометрии, на $\geq 2,5$ стандартных отклонений ниже среднего показателя для молодого взрослого [10, 11]. Другой способ оценки плотности кости — костная ультрасонометрия (КУС), основными параметрами которой являются скорость распространения звука (SOS — speed of sound) и показатель затухания ультразвука (BUA — broadband ultrasound attenuation) [12]. Оцененная с помощью ультрасонографии МПК

(УМПК, eBMD — estimated bone mineral density) обладает высокой предсказательной способностью для переломов, характеризуется высокой наследуемостью (50-80%) [13] и корреляцией с МПК ($r=0,42-0,61$) [14].

К основным факторам риска переломов, независимо от МПК, снижающих прочность кости, относят пол, возраст, значение индекса массы тела, курение, употребление алкоголя, ревматоидный артрит, прием глюкокортикоидов, предшествующий перелом, перелом бедра у родителей [5]. Наследуемость МПК, по разным данным, составляет от 50 до 85% [15]. Наследственная предрасположенность к снижению МПК и развитию остеопороза неоднократно оценивалась в близнецовых исследованиях. В исследовании Harris M, et al. (1998) изучалась МПК у 97 пар женщин-близнецов в поясничном отделе позвоночника (ПОП) и в шейке бедренной кости (ШБ), наследуемость которых составила 77 и 72%, соответственно [16]. По данным другой работы, где анализировалась МПК с учетом массы тела и массы жировой ткани у 55 пар монозиготных и 55 пар дизиготных близнецов, 79% МПК определялось генетическими факторами [17]. В близнецовом исследовании остеопороза с участием 724 пар женщин-близнецов, находящихся в постменопаузе, анализ данных показал, что наследуемость снижения МПК составила 40% [18].

Генетическая архитектура остеопороза складывается из вариантов, приводящих к редким моногенным формам, и более частых вариантов, представляющих собой факторы генетической предрасположенности к первичному остеопорозу [19]. Ряд редких моногенных заболеваний приводит к развитию тяжелых форм остеопороза. Наиболее распространенным из них является несовершенный остеогенез. Два наиболее часто встречающихся типа данной патологии обусловлены вариантами в генах *COL1A1* и *COL1A2*, кодирующих про-альфа-цепи проколлагена 1 типа, что нарушает формирование нормальной костной ткани и значительно увеличивает риск переломов, угрожающих жизни [20].

Распространенность несовершенного остеогенеза достигает 6-7 случаев на 100 тыс. новорожденных, 90% случаев обусловлены вариантами в вышеуказанных генах [21]. Остальные случаи несовершенного остеогенеза связаны с вариантами в генах *CRTAP*, *P3H1 (LEPRE1)* и *PP1B*, для которых характерен аутосомно-рецессивный тип наследования. Данные гены кодируют комплекс белков, необходимых для формирования нормальной структуры коллагена [22]. Инактивирующие варианты в гене *LRP5* приводят к развитию синдрома остеопороза-псевдоглиомы. Данное состояние имеет аутосомно-рецессивный тип наследования, а его распространенность не превышает 1:2 000 000 [23]. В регуляции МПК у мужчин большую роль играют эстрогены. Варианты в генах ароматазы *CYP17A1 (CYP17)* и альфа-рецептора эстрогена *ESR1* у мужчин также приводят к развитию моногенных форм остеопороза [24, 25].

Современные методы поиска факторов генетической предрасположенности к комплексным заболеваниям имеют наибольшую эффективность при использовании больших выборок, охарактеризованных фенотипически и генетически. Одним из источников таких данных могут служить биобанки, доступность данных которых предоставляет возможность кросс-валидации полученных результатов.

Цель обзора — представить наиболее значимые исследования генетики остеопороза на основе данных биобанков, включающие исследования полногеномного поиска ассоциаций, работы по оценке шкал генетического риска (ШГР) и вклада редких вариантов.

В представленной работе были использованы данные полногеномного поиска ассоциаций GWAS (genome-wide association study) Catalog [26] и The Polygenic Score (PGS) Catalog [27].

Полногеномный поиск ассоциаций

Во время реализации проекта “Геном человека” была высказана гипотеза, согласно которой значительный вклад в развитие распространенных комплексных заболеваний вносят частые генетические варианты [28]. Поиск таких вариантов было предложено осуществлять с помощью GWAS. При этом подходе отсутствуют предварительные гипотезы о связи конкретного гена или локуса с признаком, а нулевая гипотеза заключается в отсутствии определяемых ассоциаций [29]. Дизайн GWAS, в основе которого лежит явление неравновесного сцепления, направлен на обнаружение ассоциаций между вариантом нуклеотидной последовательности (ВНП) и признаком [30]. Первый GWAS МПК и других важных для предсказания переломов количественных признаков был проведен на основе Фремингемского исследования (n=1141), однако выявленные ассоциации не достигли полногеном-

ной значимости [31]. В период с 2007 по 2011гг с помощью GWAS был выявлен 91 вариант, ассоциированный с МПК, 26 из них были найдены более чем в одном исследовании [26].

Несмотря на высокую наследуемость признака, показанную в близнецовых исследованиях, обнаруженные варианты объясняли лишь малую часть его вариабельности. Например, 77 вариантов, выявленных в работе Stykarsdottir U, et al. (2008), из которых только три достигли геномного уровня значимости, объясняли 3% общей вариабельности МПК бедра и ПОП [32]. Данные биобанка исландского исследования (deCODE Genetics) в 2009г были включены в метаанализ результатов 5-ти GWAS МПК ШБ и ПОП (n=19195), который позволил идентифицировать 13 новых локусов и подтвердить 7 выявленных ранее [33]. Позже было высказано предположение о “потерянной наследуемости” — феномене, связанном с тем, что для объяснения наследуемости комплексных заболеваний недостаточно учитывать только распространенные варианты с большим эффектом, обычно выявляемые в GWAS [34]. Наследуемость обусловлена еще и редкими вариантами или вариантами с небольшим эффектом, для убедительной статистической поддержки выявленной ассоциации которых требуется больший размер выборки [35]. Метаанализ результатов 17-ти GWAS, проведенный Estrada K, et al. (2012), позволил выявить 64 ВНП в 56 локусах, ассоциированных с МПК, в т.ч. 32 новых. Среди вариантов, отобранных до стадии репликации, был проведен поиск ассоциаций с переломами, в результате которого были выявлены 14 локусов, ассоциированных с любыми типами переломов [36]. Medina-Gomez C, et al. (2018) провели метаанализ 30 эпидемиологических исследований, включавших данные о результатах генотипирования и денситометрии 66628 чел. из популяций Европы, Америки и Австралии, в т.ч. данные deCODE Genetics и UK biobank. ВНП, ассоциированные с МПК всего тела, были выявлены в 80 локусах, для 36 из них ассоциация была показана впервые. Суммарно выявленные ВНП объясняли 10% вариабельности МПК всего тела [37]. Другой метаанализ 2-х GWAS позволил обнаружить два новых локуса, ассоциированных с МПК [38]. Исследования, включающие сотни тысяч участников на основе выборки и данных UK biobank, позволили выявить сотни и тысячи ассоциаций [13, 39-41]. При этом найденные Morris JA, et al. (2018) ассоциации объясняют уже 20% вариабельности УМПК [13]. В этих исследованиях использовалась УМПК, поскольку она была оценена у 487428 чел. в выборке UK biobank, тогда как двухэнергетическая рентгеновская денситометрия была проведена только у 4741 чел. [13, 42].

Результаты GWAS характеризуются высокой воспроизводимостью [43]: в таблице 1 приведены

Таблица 1

Список генов, ассоциированных с МПК по данным GWAS

№	Ген/локус	Наиболее значимые ВНП (р-значение*)
1	AL356534.1	rs7741021 ($p=2 \times 10^{-369}$)
2	AC009154.1	rs71390846 ($p=2 \times 10^{-71}$)
3	AC009743.1	rs370387 ($p=7 \times 10^{-148}$)
4	AL133334.1	rs113166754 ($p=1 \times 10^{-108}$)
5	CCDC170	rs4869739 ($p=4 \times 10^{-340}$)
6	CPED1	rs17284876 ($p=1 \times 10^{-300}$), rs147514708 (1×10^{-300})
7	ESR1	rs3020331 ($p=3 \times 10^{-346}$)
8	FAM3C	rs138090420 ($p=5 \times 10^{-164}$)
9	HSP90AB3P	rs11934731 ($p=3 \times 10^{-75}$)
10	LEKRI	rs7650127 ($p=5 \times 10^{-67}$), rs6441103 ($p=5 \times 10^{-67}$)
11	LINC02341	rs9594738 ($p=8 \times 10^{-170}$)
12	LNCAROD	rs7902708 ($p=3 \times 10^{-393}$)
13	LRP5	rs11228240 ($p=3 \times 10^{-92}$)
14	SEMI	rs35108541 ($p=3 \times 10^{-124}$)
15	SFRP4	rs6973667 ($p=2 \times 10^{-215}$)
16	SOST	rs2741856 ($p=2 \times 10^{-105}$)
17	SOX6	rs56074687 ($p=8 \times 10^{-38}$)
18	SPTBN1	rs11898505 ($p=1 \times 10^{-313}$)
19	STARD3NL	rs6973667 ($p=2 \times 10^{-215}$)
20	THORLNC	rs115242848 ($p=2 \times 10^{-289}$)
21	TMEM135	rs608966 ($p=9 \times 10^{-261}$)
22	TNFSF11	rs138818878 ($p=1 \times 10^{-24}$)
23	WHSC1L2P	rs2741856 ($p=2 \times 10^{-105}$)
24	WLS	rs2566752 ($p=2 \times 10^{-75}$)
25	WNT16	rs2908007 ($p=7 \times 10^{-1700}$)
26	ZBTB40	rs6684375 ($p=6 \times 10^{-147}$)

Примечание: * — приведено минимальное р-значение по данным GWAS catalog [27]. ВНП — вариант нуклеотидной последовательности.

гены, для ВНП в которых ассоциация с МПК была показана >20 раз по данным GWAS catalog [26]. Информация, полученная при помощи GWAS и в метаанализах, используется для изучения остеопороза и прогнозирования риска его развития.

ШГР

Оценка вероятностной предрасположенности человека к заболеванию — прогнозирование риска, играет центральную роль в принятии клинических решений, особенно в контексте раннего выявления распространенных заболеваний, которое сегодня зачастую базируется на основных демографических характеристиках (возраст, пол и этническая принадлежность), а также на параметрах здоровья и факторах образа жизни (индекс массы тела, статус курения, употребление алкоголя) [44]. Существующие алгоритмы оценки риска переломов — Fracture Risk Assessment Tool (FRAX), Garvan Institute Fracture Risk Calculator, учитывают такие факторы, как пол, возраст, предыдущие переломы, МПК, но не учитывают генетические данные.

Оценка генетического риска комплексных заболеваний требует агрегирования информации о большом количестве ВНП, ассоциированных

с признаком, для чего на их основе создаются ШГР. Основные стратегии выбора ВНП при конструировании ШГР — включение ВНП, значимых на геномном уровне [36, 41, 45]; включение ВНП, не достигающих геномного уровня значимости [41, 42]; и отбор ВНП, относящихся к определенным метаболическим путям или процессам [46]. При этом может учитываться как величина эффекта каждого включенного в ШГР ВНП, так и только количество аллелей риска [46]. Практика включения сотен тысяч вариантов в ШГР, несмотря на их слабую ассоциацию с признаком, основана на том, что многие ассоциации, возможно, упускаются из-за недостаточной мощности оригинального метода GWAS [46].

В настоящее время исследования сосредоточены на использовании ШГР для выявления лиц с высоким генетическим риском развития заболевания с целью его стратификации. Эта информация может быть полезной при принятии решений об участии в скрининговых программах, изменении образа жизни или профилактическом лечении, когда это возможно и целесообразно [47]. Несколько ШГР различных заболеваний в настоящее время проходят клинические испытания [48].

Большинство исследований оценки риска развития остеопороза с помощью ШГР были проведены в последнее десятилетие и поначалу включали небольшое количество ВНП, которое возросло до тысяч ВНП в сравнительно недавних работах [36, 41, 42, 45, 49].

Выявленные в результате GWAS ВНП Estrada K, et al. (2012) использовали для создания двух ШГР: включающей 63 ВНП, ассоциированных с МПК ШБ, и включающей 16 ВНП, ассоциированных с переломами. Суммарный размер выборки, в которой проводился поиск ассоциаций, составил 32961 участника, в т.ч. 7605 из биобанка deCODE Genetics [36]. При моделировании предсказательной способности разработанных ШГР было показано, что женщины из группы с наибольшими значениями ШГР, связанной с МПК ШБ, имели больший риск развития остеопороза (ОШ 1,56, 95% ДИ: 1,12-2,18), а женщины из группы с наименьшими значениями — меньший риск (ОШ 0,38, 95% ДИ: 0,23-0,63) по сравнению с лицами, распределенными в среднюю группу (ОШ 1,0) из пяти групп риска [36].

В другом исследовании с использованием выявленных Styrkarsdottir U, et al. (2008) ВНП, ассоциированных с МПК ШБ и ПОП [32], были созданы три ШГР, включающие 62 ВНП: две на основе коэффициентов регрессии, относящихся к МПК ШБ и ПОП, а третья — рассчитываемая посредством подсчета количества выявленных аллелей риска [45]. В этой работе оценивали ассоциации между ШГР и МПК, а также между ШГР и риском переломов. Было показано, что созданные ШГР объясняли от 1,1 до 1,6% вариальности МПК, ШГР на основе коэффициентов регрессии, относящихся к МПК ШБ, в сочетании с весом, возрастом и полом объясняла ~42% вариальности МПК ШБ, а в сочетании с полом и весом — 35,1% вариальности МПК ПОП. Добавление ШГР к существующей шкале оценки абсолютного риска переломов (Garvan Institute Fracture Risk Calculator) привело к улучшению точности прогнозирования риска переломов на 12%. На основании 62 включенных в ШГР ВНП были отобраны 33, имеющие сопоставимую с ШГР из 62 ВНП предсказательную способность [45].

В работе Kim SK были использованы три метода создания ШГР (с использованием бета-коэффициентов, байесовского метода и LASSO регрессии) для прогнозирования УМПК, риска остеопороза и переломов на основе проведенного им GWAS с УМПК пяточной кости [41]. Используемые в этой работе коэффициенты были связаны с эффектом повышения МПК. Все этапы исследования выполнены на основе данных UK Biobank. ШГР, для которой была показана наибольшая корреляция с УМПК (0,415), была получена с помощью метода LASSO и включала

22886 ВНП. В результате было показано, что у лиц в группе с критически низкими значениями ШГР (2,2% выборки) риск развития остеопороза был в 6,19 раз выше (95% ДИ: 6,18-6,20), чем в средней группе (центральные 25% выборки вокруг медианы ШГР), а в группе с критически высокими значениями ШГР (2,2% выборки) составлял 0,221 (95% ДИ: 0,218-0,224) относительно центральной части выборки. Комбинированная шкала (включавшая ШГР, рост, вес, пол и возраст) позволила объяснить 24,6% вариальности УМПК. В результате анализа валидационной когорты лица с критически низкими значениями ШГР имели средний t-балл УМПК, равный -1,6, что, в среднем, на 1,16 баллов ниже, чем t-балл лиц, попавших в среднюю группу по ШГР. Риск наличия остеопороза у лиц с критически низкими значениями ШГР был в 17,37 раз выше (95% ДИ: 17,35-17,38), чем у лиц в средней группе [41].

В исследовании Forgetta V, et al. (2020) [42] на этапах GWAS, создания моделей ШГР и отбора лучшей из них использовались только данные UK Biobank; кроме того, из этой выборки была составлена одна из когорт для тестирования выбранной ШГР. Оценка полигенного риска была проведена с использованием 6 моделей LASSO для прогнозирования SOS. ШГР, объясняющая больше всего вариальности УМПК — 23,2% (95% ДИ: 22,7-23,7%), включала 21717 ВНП. Была оценена специфичность и чувствительность корректности идентификации участников, требующих лечения, с генетическим прескринингом и без него. В качестве референсного метода оценки вероятности переломов была использована модель FRAX, учитывающая клинические факторы риска с учетом МПК или без нее. Без предварительного генетического скрининга чувствительность и специфичность метода для правильного назначения лечения составили в валидационных когортах 99,6 и 97,1%, соответственно. Однако для достижения такой точности у 81% населения использовали только клинические факторы риска, а у 37% требовалось включение в калькулятор показателей МПК. Использование ШГР в предварительном скрининге и отбор для дальнейшего скрининга лиц с низкими значениями ШГР привели к небольшим изменениям чувствительности и специфичности (93,4 и 98,5%, соответственно), но доля лиц, которых планировали обследовать с помощью FRAX без МПК и с учетом МПК, сократилась на 37 и 41%, соответственно [42].

Еще в одном исследовании рассматривали, как добавление ШГР может улучшить производительность FRAX [49]. Три ШГР, основанные на опубликованных ранее результатах GWAS, содержали 15, 75 и 1055 ВНП, отобранных из 15, 81 и 1103 ВНП, соответственно [13, 37, 50]; значения ШГР были рассчитаны для каждого участника ис-

следования (n=23981). Первичными исходами были крупный остеопоротический перелом и перелом ШБ. Каждую модель оценивали с использованием площади под ROC-кривой (AUC). ШГР, содержащие 75 и 1055 ВНП, были значимо ассоциированы с риском остеопоротических переломов и переломов ШБ независимо от основных факторов риска FRAX. По сравнению с базовой моделью FRAX модели с ШГР улучшили реклассификацию остеопоротических переломов: индекс реклассификации по методу NRI (net reclassification improvement) составил 0,5% (95% ДИ: 0,2-0,9%; $p<0,01$) для ШГР, содержащей 15 ВНП, 0,3% (95% ДИ: 0,1-0,6%; $p=0,01$) для ШГР, содержащей 75 ВНП, и 2,1% (95% ДИ: 0,3-2,8%; $p<0,01$) для ШГР, содержащей 1103 ВНП. Аналогичные результаты получены и для переломов ШБ. Это исследование показало, что добавление ШГР дает небольшие преимущества в реклассификации FRAX для остеопоротических переломов и переломов ШБ [49].

ШГР могут быть использованы для более индивидуализированной оценки риска переломов в сочетании с существующими инструментами прогнозирования снижения МПК или стратификации населения по уровню риска. В отличие от других алгоритмов оценки риска, оценка с использованием ШГР может быть проведена в любом возрасте. Исследований экономической эффективности применения ШГР для остеопороза еще не проводилось, но для других заболеваний ШГР были показаны экономически-эффективными при профилактике и лечении заболеваний [46].

Редкие варианты

Увеличение размера выборок усилило статистическую мощность метода GWAS, однако для большинства признаков выявленные генетические ассоциации объясняют лишь малую часть их наследуемости. По частоте генетические варианты делят на: частые аллели — частота минорного аллеля (MAF) $>5\%$ с очень слабым эффектом, низкочастотные (MAF — 1-5%) и редкие варианты (MAF $<1\%$) со слабым или умеренным эффектом. Полагают, что именно те генетические варианты, которые вне досягаемости наиболее статистически мощных GWAS, и обуславливают вклад в “потерянную наследуемость”. Исследования, направленные на изучение влияния редких вариантов на комплексные заболевания, пока относительно немногочисленны, но для большинства признаков в них была показана обратная зависимость между величиной эффекта варианта и его частотой в популяции [51].

Lu T, et al. (2021) проверяли гипотезу о том, что у больных остеопорозом с низким значением ШГР вероятность иметь редкие патогенные варианты выше. Генетический риск оценивался с помощью созданной ШГР УМПК, поиск редких вариантов

проводился в генах *COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *PLS3* среди 44550 чел. с данными секвенирования экзона из UK Biobank [52]. У 189 (0,43%) чел. были выявлены редкие патогенные ВНП. Среди больных остеопорозом распространенность редких патогенных ВНП была выше у лиц с низкой полигенной предрасположенностью (значение ШГР меньше значения, соответствующего 50 перцентилу в популяции), чем среди лиц с высокой полигенной предрасположенностью (значение ШГР ≥ 50 перцентил в популяции) — 1,34 vs 0,22%, соответственно ($p<0,05$) [52].

В другом исследовании сравнивали две ШГР: одну, основанную только на частых ВНП (19 ВНП из 17 генов), и вторую — включающую как частые, так и редкие ВНП (31 ВНП из 5 генов), ассоциированные с остеопорозом [53]. Точность прогнозирования любых переломов у пациентов с остеопенией была улучшена на 6,8% ($p<0,001$) за счет добавления ШГР, основанной только на частых вариантах, и на 9,6% ($p<0,001$) за счет добавления ШГР, включавшей и частые, и редкие варианты. ШГР, основанная на частых вариантах, повысила точность классификации при оценке риска переломов позвоночника и других переломов на 7,3 ($p=0,005$) и 3,0% ($p=0,091$), соответственно, а ШГР с частыми и редкими вариантами повысила точность на 10,2 ($p<0,001$) и 4,9% ($p=0,008$), соответственно. ШГР, основанная на частых вариантах, объясняла 2,0% генетической вариативности МПК ПОП и 3,0% генетической вариативности МПК ШБ. ШГР, включавшая и частые, и редкие варианты, объясняла 2,2% генетической вариативности МПК ПОП и 3,2% МПК ШБ. Обе ШГР были связаны с МПК и до, и после корректировки на клинические факторы риска (p от 0,007 до 0,023) у всех участников ($n=4877$). Кроме того, они были связаны с риском любого перелома, перелома позвоночника и других переломов как до, так и после корректировки на клинический фактор риска и МПК (p от 0,049 до $<0,001$) у всех участников. Результаты показывают, что как частые, так и редкие функциональные ВНП могут способствовать остеопоротическим переломам и что добавление данных генетического профиля к существующим моделям позволит улучшить прогнозирование переломов, связанных с остеопорозом [53].

Исследования генетики остеопороза в России

В одном из первых исследований генетики остеопороза в России был выполнен анализ распределения аллелей гена *COL1A1* в разных группах пациентов с остеопорозом [54]. В ряде других работ также изучались ассоциации отдельных ВНП [55, 56]. Юренева С. В. и др. (2015) провели исследование по оценке взаимосвязи 8 ВНП в генах *OPG*, *RANKL*, *VDR* и *SOST* с МПК и переломами на выборке из 236 женщин в постменопаузе [57]. В ра-

боте Фазуллиной О. Н. и др. (2018) изучались ассоциации 13 ВВП в генах цитокинов и матриксных металлопротеиназ с МПК на выборке из 197 женщин с сахарным диабетом 2 типа в постменопаузе [58]. Другой группой ученых был проведен ряд исследований ВВП в кандидатных генах [59], а также репликативных исследований ВВП, выявленных в результате GWAS [60, 61].

На сегодняшний день, согласно литературным данным, в России не проводились исследования генетики остеопороза с использованием коллекций биобанков, в т.ч. GWAS и разработка ШГР. Согласно общедоступной информации о коллекциях членов Национальной ассоциации биобанков и специалистов по биобанкированию (НАСБИО) [62], нет данных о наличии собранных выборок с установленным значением МПК. В то же время в биобанке ФГБУ «НМИЦ ТПМ» Минздрава России выполняются два проекта, включающие сбор биоматериала (кровь) и измерение МПК у их участников: «Комплексная оценка суммарных рисков и ранних доклинических маркеров остеопороза и атеросклероза» (250 образцов) и «Состав тела и состояние костной ткани у пациентов с хронической сердечной недостаточностью» (100 образцов). Биологические образцы этих двух выборок планируется использовать для изучения генетики остеопороза.

Литература/References

1. Consensus development conference. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. Am J Med. 1993;94(6):646-50. doi:10.1016/0002-9343(93)90218-E.
2. Vasilyeva LV, Bezzubtseva EN, Gosteva EV, et al. The role of genetic and metabolic disorders in osteoporosis. Medical Herald of the South of Russia. 2021;12(1):6-13. (In Russ.) Васильева Л. В., Беззубцева Е. Н., Гостева Е. В. и др. Роль генетических и метаболических нарушений при остеопорозе. Медицинский вестник Юга России. 2021;12(1):6-13. doi:10.21886/2219-8075-2021-12-1-6-13.
3. Cauley JA. Defining ethnic and racial differences in osteoporosis and fragility fractures. Clinical Orthopaedics and Related Research. 2011;469(7):1891-9. doi:10.1007/s11999-011-1863-5.
4. Oden A, McCloskey EV, Kanis JA, et al. Burden of high fracture probability worldwide: secular increases 2010–2040. Osteoporosis International. 2015;26(9):2243-8. doi:10.1007/s00198-015-3154-6.
5. Kanis JA, Melton III LJ, Christiansen C, et al. The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res. 1994;9(8):1137-41. doi:10.1002/jbmr.5650090802.
6. World Health Organization. Assessment of osteoporosis at the primary health care level. Summary report of a WHO scientific group. WHO; 2007:6. https://www.sheffield.ac.uk/FRAX/pdfs/WHO_Technical_Report.pdf (26 October 2021).
7. Lesnyak O, Ershova O, Belova K, et al. Epidemiology of fracture in the Russian Federation and the development of a FRAX model. Arch Osteoporos. 2012;7(1):67-73. doi:10.1007/s11657-012-0082-3.
8. Mai HT, Tran TS, Ho-Le TP, et al. Two-thirds of all fractures are not attributable to osteoporosis and advancing age: implications for fracture prevention. J Clin Endocrinol Metab. 2019;104(8):3514-20. doi:10.1210/je.2018-02614.
9. Melton III LJ, Thamer M, Ray NF, et al. Fractures attributable to osteoporosis: report from the National Osteoporosis Foundation. J Bone Miner Res. 1997;12(1):16-23. doi:10.1359/jbmr.1997.12.1.16.
10. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO study group [meeting held in Rome from 22 to 25 June 1992]. World Health Organization; 1994:5. ISBN:9241208430. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39142/WHO_TRS_843_eng.pdf (26 October 2021).
11. Mel'nikhenko GA, Belaya ZhE, Rozhinskaya LYa, et al. Russian Federal clinical guidelines on the diagnostics, treatment, and prevention of osteoporosis. Problems of Endocrinology 2017;63(6):392-426. (In Russ.) Мельниченко Г. А., Белая Ж. Е., Рожинская Л. Я. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике остеопороза. Проблемы эндокринологии. 2017;63(6):392-426. doi:10.14341/probl2017636392-426.
12. Zakharov IS. Radial diagnostics of osteoporosis — current state of the problem. Polytrauma. 2015(1):69-73. (In Russ.) Захаров И. С. Лучевая диагностика остеопороза — современное состояние проблемы. Политравма. 2015(1):69-73.
13. Morris JA, Kemp JP, Youlten SE, et al. An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice. Nat Genet. 2019;51(2):258-66. doi:10.1038/s41588-018-0302-x.
14. Gonnelli S, Cepollaro C, Gennari L, et al. Quantitative ultrasound and dual-energy X-ray absorptiometry in the prediction of fragility

Заключение

Прогресс в определении генетических факторов, влияющих на развитие остеопороза, достигнутый во многом благодаря использованию данных биобанков, позволяет улучшать предсказательную способность существующих калькуляторов риска переломов. Создание в России доступной для исследователей коллекции образцов с информацией о МПК позволит, как это происходит в случае данных UK Biobank, проводить повторные исследования с разным дизайном, а также оценивать этнические особенности наследуемости остеопороза. Поскольку генетические факторы в течение жизни не меняются и могут быть определены уже в раннем детстве, включение их в оценку риска остеопороза позволит начинать его профилактику в группах высокого генетического риска уже с детского или подросткового возраста и контролировать его развитие в дальнейшем. При этом задачи поиска «потерянной наследуемости», а также идентификации и функциональной характеристики новых генов и вариантов, связанных с остеопорозом, все еще актуальны.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

- fracture in men. *Osteoporos Int.* 2005;16(8):963-8. doi:10.1007/s00198-004-1771-6.
15. Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2010;31(5):629-62. doi:10.1210/er.2009-0044.
16. Harris M, Nguyen TV, Howard GM, et al. Genetic and environmental correlations between bone formation and bone mineral density: a twin study. *Bone.* 1998;22(2):141-5. doi:10.1016/S8756-3282(97)00252-4.
17. Nguyen TV, Howard GM, Kelly PJ, et al. Bone mass, lean mass, and fat mass: same genes or same environments? *Am J Epidemiol.* 1998;147(1):3-16. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009362.
18. Makovey J, Nguyen TV, Naganathan V, et al. Genetic effects on bone loss in peri-and postmenopausal women: a longitudinal twin study. *J Bone Miner Res.* 2007;22(11):1773-80. doi:10.1359/jbmr.070708.
19. Tobias JH, Karasik D. Recent Advances in the Genetics of Osteoporosis. *Front Endocrinol.* 2021;12:171. doi:10.3389/fendo.2021.656298.
20. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat.* 2007;28(3):209-21. doi:10.1002/humu.20429.
21. van Dijk FS, Cobben JM, Kariminejad A, et al. Osteogenesis imperfecta: a review with clinical examples. *Mol Syndromol.* 2011;2(1):1-20. doi:10.1159/000332228.
22. Cabral WA, Chang W, Barnes AM, et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat Genet.* 2007;39(3):359-65. doi:10.1038/ng1968.
23. Gong Y, Vikkula M, Boon L, et al. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. *Am J Hum Genet.* 1996;59(1):146.
24. Morishima AK, Grumbach MM, Simpson ER, et al. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(12):3689-98. doi:10.1210/jcem.80.12.8530621.
25. Smith EP, Boyd J, Frank GR, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *New Engl J Med.* 1994;331(16):1056-61. doi:10.1056/NEJM199410203311604.
26. Buniello A, MacArthur JA, Cerezo M, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D1005-12. doi:10.1093/nar/gky1120.
27. Lambert SA, Gil L, Jupp S, et al. The Polygenic Score Catalog as an open database for reproducibility and systematic evaluation. *Nat Genet.* 2021;53(4):420-5. doi:10.1038/s41588-021-00783-5.
28. Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science.* 1996;274(5287):536-9. doi:10.1126/science.274.5287.536.
29. Hardy J, Singleton A. Genomewide association studies and human disease. *New Engl J Med.* 2009;360(17):1759-68. doi:10.1056/NEJMr0808700.
30. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, et al. 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *Am J Hum Genet.* 2017;101(1):5-22. doi:10.1016/j.ajhg.2017.06.005.
31. Kiel DP, Demissie S, Dupuis J, et al. Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet.* 2007;8(1):1-3. doi:10.1186/1471-2350-8-S1-S14.
32. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *New Engl J of Med.* 2008;358(22):2355-65. doi:10.1056/NEJMoa0801197.
33. Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2009;41(11):1199. doi:10.1038/ng.446.
34. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461(7265):747-53. doi:10.1038/nature08494.
35. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, et al. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet.* 2005;6(2):109-18. doi:10.1038/nrg1522.
36. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet.* 2012;44(5):491-501. doi:10.1038/ng.2249.
37. Medina-Gomez C, Kemp JP, Trajanoska K, et al. Life-course genome-wide association study meta-analysis of total body BMD and assessment of age-specific effects. *Am J Hum Genet.* 2018;102(1):88-102. doi:10.1016/j.ajhg.2017.12.005.
38. Pei YF, Hu WZ, Yan MW, et al. Joint study of two genome-wide association meta-analyses identified 20p12.1 and 20q13.33 for bone mineral density. *Bone.* 2018;110:378-85. doi:10.1016/j.bone.2018.02.027.
39. Kemp JP, Morris JA, Medina-Gomez C, et al. Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis. *Nat Genet.* 2017;49(10):1468-75. doi:10.1038/ng.3949.
40. Kichaev G, Bhatia G, Loh PR, et al. Leveraging polygenic functional enrichment to improve GWAS power. *Am J Hum Genet.* 2019;104(1):65-75. doi:10.1016/j.ajhg.2018.11.008.
41. Kim SK. Identification of 613 new loci associated with heel bone mineral density and a polygenic risk score for bone mineral density, osteoporosis and fracture. *PloS One.* 2018;13(7):e0200785. doi:10.1371/journal.pone.0213962.
42. Forgetta V, Keller-Baruch J, Forest M, et al. Development of a polygenic risk score to improve screening for fracture risk: a genetic risk prediction study. *PLoS Med.* 2020;17(7):e1003152. doi:10.1371/journal.pmed.1003152.
43. Marigorta UM, Rodríguez JA, Gibson G, Navarro A. Replicability and prediction: lessons and challenges from GWAS. *Trends Genet.* 2018;34(7):504-17. doi:10.1016/j.tig.2018.03.005.
44. Torkamani A, Wineinger NE, Topol EJ. The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nat Rev Genet.* 2018;19(9):581-90. doi:10.1038/s41576-018-0018-x.
45. Ho-Le TP, Center JR, Eisman JA, et al. Prediction of bone mineral density and fragility fracture by genetic profiling. *J Bone Miner Res.* 2017;32(2):285-93. doi:10.1002/jbmr.2998.
46. Nguyen TV, Eisman JA. Post-GWAS Polygenic Risk Score: Utility and Challenges. *JBMR Plus.* 2020;4(11):e10411. doi:10.1002/jbmr.410411.
47. Lewis CM, Vassos E. Polygenic risk scores: from research tools to clinical instruments. *Genome Med.* 2020;12:1. doi:10.1186/s13073-020-00742-5.
48. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Polygenic+Risk+Score&draw=1&rank=2#rowId1>. (26 October 2021).
49. Xiao X, Wu Q. The Utility of Genetic Risk Score to Improve Performance of FRAX for Fracture Prediction in US Postmenopausal Women. *Calcif Tissue Int.* 2021;108(6):746-56. doi:10.1007/s00223-021-00809-4.
50. Trajanoska K, Morris JA, Oei L, et al. Assessment of the genetic and clinical determinants of fracture risk: genome wide association and mendelian randomisation study. *BMJ.* 2018;362. doi:10.1136/bmj.k3225.

51. Bomba L, Walter K, Soranzo N. The impact of rare and low-frequency genetic variants in common disease. *Genome Biol.* 2017;18(1):1-7. doi:10.1186/s13059-017-1212-4.
52. Lu T, Zhou S, Wu H, et al. Individuals with common diseases but with a low polygenic risk score could be prioritized for rare variant screening. *Genet Med.* 2021;23(3):508-15. doi:10.1038/s41436-020-01007-7.
53. Lee SH, Kang MI, Ahn SH, et al. Common and rare variants in the exons and regulatory regions of osteoporosis-related genes improve osteoporotic fracture risk prediction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(11):E2400-11. doi:10.1210/jc.2014-1584.
54. Moskalenko MV, Aseev MV, Zazerskaya IE, et al. Analysis of Association of the Col1a1 Gene Alleles with the Risk of Osteoporosis. *Russ J Genet.* 2002;38(12):1443-6. doi:10.1023/A:1021656309758.
55. Reznichenko NA, Adunts AG. Associations of rs1801197 polymorphism of the calcitonin receptor gene CALCR with postmenopausal osteoporosis. *Medical genetics.* 2020;19(8):63-4. (In Russ.) Резниченко Н.А., Адунц А.Г. Ассоциации полиморфизма rs1801197 гена рецептора кальцитонина CALCR с постменопаузальным остеопорозом. *Медицинская генетика.* 2020;19(8):63-4. doi:10.25557/2073-7998.2020.08.63-64.
56. Zakharov IS, Mozes VG, Ushakova GA, et al. Role of CYP1B1 Gene Polymorphism in the Development of Postmenopausal Osteoporosis. *Medicine in Kuzbass.* 2017;16(1):57-60. (In Russ.) Захаров И.С., Мозес В.Г., Ушакова Г.А. и др. Роль полиморфизма гена CYP1B1 в формировании постменопаузального остеопороза. *Медицина в Кузбассе.* 2017;16(1):57-60.
57. Yureneva SV, Donnikov AE, Bordakova EV, et al. Clinical and prognostic significance of molecular genetic factors in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis and Bone Diseases.* 2015;18(1):3-6. (In Russ.) Юренева С.В., Донников А.Е., Бордакова Е.В. и др. Клинико-прогностическое значение молекулярно-генетических факторов при постменопаузальном остеопорозе. *Остеопороз и остеопатии.* 2015;18(1):3-6.
58. Fazullina ON, Klimontov VV, Konenkov VI, et al. Associations of polymorphisms in the gene promoters of cytokines and matrix metalloproteinases with bone mineral density in postmenopausal type 2 diabetic women. *Diabetes Mellitus.* 2018;21(1):26-33. (In Russ.) Фазуллина О.Н., Климонтов В.В., Коненков В.И. и др. Ассоциации полиморфизмов генов цитокинов и матриксных металлопротеиназ с минеральной плотностью костной ткани у женщин в постменопаузе с сахарным диабетом 2 типа. *Сахарный диабет.* 2018;21(1):26-33.
59. Maltsev AV, Khusainova RI, Khusnutdinova EK. Molecular genetic study of candidate genes of postmenopausal osteoporosis in Volga-Ural region. *Vestnik Bashkirskogo universiteta.* 2013;18(4):1057-61. (In Russ.) Мальцев А.В., Хусаинова Р.И., Хуснутдинова Э.К. Молекулярно-генетическое исследование генов-кандидатов постменопаузального остеопороза в Волго-Уральском регионе. *Вестник Башкирского университета.* 2013;18(4):1057-61.
60. Khusainova RI, Nurligayaynov RZ, Tyurin AV, et al. Genetic and epigenetic aspects of osteoporosis. *Osteoporosis and Bone Diseases.* 2020;23(2):192-3. (In Russ.) Хусаинова Р.И., Нурлыгаянов Р.З., Тюрин А.В. и др. Генетические и эпигенетические аспекты остеопороза. *Остеопороз и остеопатии.* 2020;23(2):192-3.
61. Yalaev BI, Tyurin AV, Mirgalieva RI, et al. Investigating the role of osteoprotegerin gene polymorphic variants in osteoporosis. *Russ Open Med J.* 2021;10(1):e0101. doi:10.15275/rusomj.2021.010.
62. National Association of Biobanks and Biobanking Specialists. Members <http://nasbio.ru/en/membership/members> (1 October 2021).