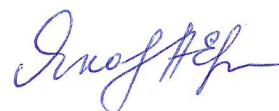


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-ВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. М.К. АММОСОВА»

На правах рукописи



Яковлева Александра Еремеевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МНОЖЕСТВЕННОЙ
ЭКЗОСТОЗНОЙ ХОНДРОДИСПЛАЗИИ В ЯКУТИИ**

1.5.7. – генетика (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Максимова Надежда Романовна

Якутск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Характеристика генетического разнообразия якутской этнической группы	14
1.1.1. Молекулярно-генетические исследования наследственных заболеваний в якутской этнической группе.....	18
1.2. Множественная экзостозная хондродисплазия	26
1.2.1. Классификация наследственных заболеваний скелета и множественной экзостозной хондродисплазии.....	29
1.2.2. Эпидемиология множественной экзостозной хондродисплазии.....	33
1.2.3. Клиническая картина множественной экзостозной хондродисплазии ...	34
1.2.4. Молекулярно-генетические аспекты множественной экзостозной хондродисплазии.....	38
1.2.5. Структура и функции белков EXT1/EXT2.....	41
1.2.6. Генотип-фенотипические исследования множественной экзостозной хондродисплазии в мировых популяциях	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
2.1. Дизайн исследования	55
2.2. Материалы исследования	55
2.3. Клинико-генеалогическая характеристика больных с множественной экзостозной хондродисплазией	56
2.4. Молекулярно-генетические методы исследования	58
2.4.1. Выделение геномной ДНК.....	58
2.4.2. Метод прямого секвенирования по Сэнгеру.....	60
2.4.3. Метод массового параллельного секвенирования.....	63
2.5. Биоинформатический анализ.....	63
2.6. Методы статистического анализа.....	67
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	68
3.1. Эпидемиология множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии...	68
3.1.1. Распространенность множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии	69
3.2. Клинико-генеалогический анализ больных с множественной экзостозной хондродисплазией в Якутии	74

3.3. Идентификация вариантов нуклеотидной последовательности множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии.....	81
3.3.1. Поиск мутаций множественной экзостозной хондродисплазии в генах <i>EXT1</i> и <i>EXT2</i>	81
3.3.2. Спектр выявленных вариантов при массовом параллельном секвенировании	83
3.3.3. Валидация результатов МПС методом прямого секвенирования по Сэнгеру	89
3.3.4. Результаты валидации выявленных вариантов нуклеотидной последовательности в гене <i>EXT1</i>	98
3.3.5. Результаты валидации выявленных вариантов нуклеотидной последовательности в гене <i>EXT2</i>	105
3.4. Распределение выявленных мутаций в генах <i>EXT1/EXT2</i> по районам (улусам) РС (Я).....	111
3.5. Гено-фенотипический анализ больных с мутациями в генах <i>EXT1/EXT2</i> ..	113
3.6. Медико-генетическая помощь семьям с множественной экзостозной хондродисплазией	120
3.6.1. Алгоритм диагностики множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии	128
3.7. Прогноз развития клинических форм у больных с множественной экзостозной хондродисплазией в якутской популяции в зависимости от молекулярно-генетических причин	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	138
ВЫВОДЫ	143
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	144
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	146
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	174

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Наследственная патология и врожденные пороки развития вносят существенный вклад в заболеваемость, инвалидизацию и смертность как детского, так и взрослого населения, являясь не только медицинской, но и социальной проблемой [Амелина С.С., 2006]. Генетическое разнообразие индивида в основном определяется его принадлежностью к этнической группе и географическому региону [Степанов В.А., 2010].

К наследственным заболеваниям скелета (НЗС) относятся более половины всех врожденных заболеваний, сопровождающихся значительными нарушениями функций пораженных органов и приводящих к инвалидизации [Хисаметдинова Г.Р., 2007; Вальков Р.А., 2017]. Частота встречаемости НЗС в различных популяциях в среднем составляет от 2 до 4,7 случаев на 10 000 населения [Baitner A.C. et al., 2000]. Нозология генетических скелетных заболеваний включает 461 заболевание и классифицируется на 42 группы [Mortier G.R. et al., 2019]. Развитие молекулярно-генетических технологий позволило подтвердить диагноз у более чем 70% больных с клиническими признаками системных поражений скелета [Соловьев Ю.Н., 2003; Маркова Т.В. и др., 2020].

Множественная экзостозная хондродисплазия (МЭХД) – аутосомно-доминантное заболевание, встречающееся в разных популяциях мира с частотой 1:50000 [Hennekam R.C., 1991; Xia P. et al., 2016; Hong G. et al., 2017]. МЭХД характеризуется наличием множественных хрящевых экзостозов в районах костного роста [Шишкина Н.С. и др., 2004]. Заболевание относится к физарным дисплазиям, характеризуется нарушениями формирования ростковой эпифизарной пластинки. Согласно нозологической классификации генетических скелетных заболеваний МЭХД относится к 29 группе, включающей заболевания с аномальным развитием скелетных компонентов [Mortier G.R. et al., 2019].

Период интенсивного развития МЭХД совпадает с физиологическим ростом скелета в детском и юношеском возрасте. Клиническая картина представлена экзостозами, генерализованными формами поражения скелета с многочисленными прогрессирующими деформациями, укорочением и вторичными изменениями костей и суставов, которые могут вызвать клинические и социально-психологические проблемы, ухудшающие качество жизни больного [Шишкина Н.С. и др., 2004; Фохтин В.В. и др., 2014].

Экзостозы вызывают сдавливание крупных сосудов и нервов, что требует неоднократного хирургического вмешательства по их удалению в период роста и развития организма [Чеснокова Г.Г., 1999; Wang Y. et al., 2020]. Клиническое течение заболевания обусловлено его генетической гетерогенностью. Гены *EXT1* и *EXT2*, ответственные за развитие МЭХД, картированы и клонированы на хромосомах 8q24 и 11p12, соответственно. На сегодняшний день выявлено более 500 мутаций в гене *EXT1* и около 400 – в гене *EXT2*. Также предполагается участие гена *EXT3* в патогенезе заболевания. Данный ген картирован на коротком плече 19 хромосомы [Чеснокова Г.Г., 1999]. При этом считается, что гены *EXT1* и *EXT2* являются генами-супрессорами канцерогенеза [Lonie L. et al., 2006], т. к. установлено их участие в процессах злокачественной трансформации хрящевой и костной ткани [Чеснокова Г.Г., 1999]. В настоящее время в литературе описаны случаи злокачественной трансформации экзостозов с частотой от 0,5% до 5,0% [Bovee J.V., 2008; Чеснокова Г.Г., 1999; Wang Y. et al., 2020].

Научно-исследовательских работ, посвящённых изучению молекулярно-генетических причин МЭХД в мире достаточно много. В то же время в России данная сторона патологии остаётся малоизученной.

В Республике Саха (Якутия) (РС (Я)) накоплены многолетние данные клинических наблюдений, в которых описываются спорадические и семейные случаи «экзостозной болезни», которые свидетельствуют о достаточно высокой частоте распространенности данной патологии в регионе. При этом клинико-генеалогические, эпидемиологические и молекулярно-генетические исследования МЭХД на

современном уровне не проводились. Это обуславливает актуальность фундаментальной научной проблемы по изучению молекулярно-генетических причин данного наследственного заболевания, в том числе и решения медико-социальных задач по диагностике, профилактике и прогнозированию его течения.

Степень научной разработанности темы исследования

Величина и структура груза наследственных болезней среди этнотерриториальных групп является результатом эволюционного развития этносов и этнических популяций [Конева Л.А., 2009]. По данным ряда авторов, в популяциях, сохраняющих традиционный уклад жизни, и существующих долгое время в условиях относительной изоляции, может наблюдаться высокая отягощенность по наследственной патологии [Конева Л.А., 2009; Максимова Н.Р., 2009]. Исследование изолированных популяций позволило медицинским генетикам выявить неизвестные прежде наследственные болезни, картировать их гены, описать клиническую вариабельность. Этноспецифическим наследственным болезням были присвоены имена популяций, в которых они встречаются чаще, чем в мировом народонаселении: «еврейские», «финские» заболевания. В группу наследственных болезней, названную «якутской», был отнесен ряд наследственных патологий (спиноцеребеллярная атаксия I типа, миотоническая дистрофия, наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия, окулофарингеальная миодистрофия, атаксия Фридрейха, спинальнобульбарная амиотрофия Кеннеди, 3-М синдром и SOPH синдром), которые широко распространены в якутской этнической группе по сравнению с мировым народонаселением [Конева Л.А., 2009; Максимова Н.Р., 2009].

Результаты ранее проведенных молекулярно-генетических исследований указывают на наличие частых мутаций в генах, являющихся причинами ряда распространенных наследственных болезней, характерных только для якутской популяции (наследственная несиндромальная глухота, 3-М синдром, SOPH синдром, наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия и др.) [Барашков Н.А., 2007; Максимова Н.Р., 2009; Галеева Н.М. и др., 2013].

МЭХД относится к числу достаточно распространенных наследственных заболеваний. Встречается в разных популяциях с частотой 1,3–2 случая на 100 тыс. населения или 1 на 7000 больных ортопедического профиля [Hennekam R.C., 1991; Wickland C.L. et al., 1995]. Высокие показатели уровня распространенности МЭХД были обнаружены в популяциях коренных жителей острова Гуам (65 на 100 тыс.) и индейцев Поингасси (1298 на 100 тыс.) [Hennekam R.C., 1991; Krooth R. et al., 1961; Kang Q. et al., 2013]. В России по данным эпидемиологических исследований наследственных болезней, МЭХД встречается с довольно высокой частотой. При этом отмечается явная этническая и генетическая подразделенность: у татар (4,8 на 100 тыс.), у башкир (0,06 на 100 тыс.), у чувашей (0,34 на 100 тыс.), у адыгейцев (0,9 на 100 тыс.), а также в русских популяциях Костромской области (0,04 на 100 тыс.), Краснодарского края (0,28 на 100 тыс.), Кировской области (0,11 на 100 тыс.), Тверской области (0,39 на 100 тыс.) [Бочков Н.П., 2012; Зинченко Р.А. и др., 2014].

Для контроля груза и профилактики наследственных и врожденных заболеваний с 2001 г. коллективом медико-генетического центра Республиканской больницы №1-Национального центра медицины (МГЦ РБ №1-НЦМ) был введен в работу автоматизированный Республиканский генетический регистр наследственной и врожденной патологии РС (Я), который постоянно обновляется и пополняется новыми данными [Генетические исследования населения Якутии, 2014].

В регистр занесены данные 1955 больных по 112 нозологиям. Наиболее частыми заболеваниями с аутосомно-доминантным типом наследования являются спиноцеребеллярная атаксия 1-го типа (337 больных), миотоническая дистрофия (202 больных), нейрофиброматоз Реклинхаузена (136 больных), окулофарингеальная миодистрофия (72 больных), синдром Марфана (47 больных), МЭХД (65 больных) [Генетические исследования населения Якутии, 2014].

В РС (Я) по данным Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии по состоянию на 2020 год на диспансерном учете состоят 85 представителей разных этнических групп с установленным клиническим диагнозом МЭХД. До настоящего времени больные проходили только клиническое

обследование, инструментальную диагностику и хирургическое лечение с последующим занесением в регистр. Эпидемиологические, молекулярно-генетические и гено-фенотипические исследования не проводились.

Цель исследования

Клинико-эпидемиологическое и молекулярно-генетическое изучение множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии.

Задачи исследования

1. Проанализировать распространенность МЭХД в Якутии.
2. Установить спектр мутаций в генах *EXT1* и *EXT2* у больных с МЭХД.
3. Описать клинико-генетические особенности и провести анализ гено-фенотипических ассоциаций в группе больных с МЭХД.
4. Разработать и внедрить молекулярно-генетический метод диагностики МЭХД в практику медико-генетического консультирования в РС (Я).

Научная новизна

В настоящем исследовании впервые получены эпидемиологические данные о распространенности и особенностях клинико-генетического описания МЭХД в РС (Я). Наибольшее количество больных с МЭХД выявлено среди коренного якутского населения. Впервые проведен поиск молекулярно-генетической причины МЭХД с использованием МПС и секвенирования по Сэнгеру. Обнаружены 10 различных мутаций в генах *EXT1*, *EXT2*. Из них 3 мутации (с.970delT (p.Tyr324Phefs*35), с.1003delC (p.Leu335Trpfs*24), с.1703_1713delCGGTGCTTTCA (p.Thr568Asnfs*16)) в гене *EXT1* являются новыми и ранее неописанными, что расширило спектр мутаций в генах *EXT1* и *EXT2*. Впервые идентифицированы 2 мажорные мутации в гене *EXT2* у больных якутской этнической группы: с.310delA (p.Ile104fs*8) в экзоне 2 и с.751C>T (p.Gln251*) в эк-

зоне 5. Впервые разработан алгоритм диагностики МЭХД с использованием молекулярно-генетических методов, включающий идентификацию 2 мажорных мутаций в гене *EXT2*.

Теоретическая и практическая значимость

Клинико-генеалогические исследования проведены в обширной группе больных с МЭХД и их родственников (85 больных из 41 неродственной семьи). Изучена эпидемиология МЭХД в Якутии, проведено молекулярно-генетическое исследование причин болезни в 31 семье в результате чего 48 пациентам из 25 семей подтвержден диагноз МЭХД. В 6 семьях продолжается поиск патологических вариантов генов, ответственных за развитие заболевания. Результаты данного исследования позволяют расширить известный патологический спектр мутаций в генах *EXT1* и *EXT2*, понять этиологию болезни МЭХД, что в дальнейшем может быть включено в программу ранней диагностики заболевания. Получены новые данные о клинико-генетических особенностях больных с МЭХД в Якутии. На основании результатов научного исследования разработаны 2 медицинские технологии, которые внедрены в диагностическую практику медико-генетического консультирования региона и предназначены для использования врачами различных специальностей. Материалы могут быть использованы в образовательном процессе при подготовке студентов медицинских и биологических факультетов, в учебных программах повышения квалификации на факультетах последипломного образования и в практическом здравоохранении.

Методология и методы диссертационного исследования

В диссертационной работе применены методы клинико-генеалогического, молекулярно-генетического, биоинформационного и статистического анализов. Распространенность МЭХД по республике по этническим группам рассчитана по данным Всероссийской переписи 2010 г. Клиническое обследование осуществлялось совместно с врачом-генетиком на базе МГЦ РБ №1-НЦМ и в ходе экспедици-

онных выездов в улусы. Данные о пациенте заполнялись в специально составленном нами протоколе, включающем анамнез заболевания, сроки проявления признаков заболевания, данные о функциональных и инструментальных методах исследований. Генеалогические карты составлялись из медицинских карт и со слов больных и их родственников. Для верификации и валидации молекулярно-генетических анализов использованы методы выделения ДНК, полимеразная цепная реакция, секвенирование клинического экзона на высокопроизводительном секвенаторе MiSeq (Illumina, USA) с использованием панели Trusight One Sequencing panel (Illumina, USA) и секвенирование по Сэнгеру. Для биоинформатического анализа использованы программы Variant Studio 3.0., базы ExAC, 1000G и ESP6500. Для проверки функциональной значимости применяли программные средства SIFT, PolyPhen2, MutationTaster. Для сопоставления клинических данных были использованы некоторые базы данных dbSNP, ClinVar, HGMD, OMIM. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы IBM SPSS Statistics v.22 (IBM Corporation, USA).

Экспериментальные исследования проведены на базе Центра коллективного пользования Арктического инновационного центра ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова» (СВФУ им. М.К. Аммосова).

Положения, выносимые на защиту:

1. МЭХД является одним из распространенных наследственных заболеваний в Якутии с частотой 8,9 случаев на 100 тыс. населения. Для якутской этнической группы характерна локализация в отдельных улусах с преимущественно коренным населением, где частота колеблется от 47,6 до 116,3 случаев на 100 тыс. населения.

2. Молекулярно-генетическими причинами МЭХД в Якутии являются 10 мутаций (3 новые) в генах *EXT1*, *EXT2*, обнаруженные в 25 (80,6%) из 31 обследованной семьи. В 16 (64,0%) из 25 семей с установленными молекулярно-генетическими причинами выявлены 2 мажорные мутации в гене *EXT2*: с.310delA (p.Ile104fs*8) – в 12 (48,0%) семьях и с.751C>T (p.Gln251*) – в 4 (16,0%) семьях.

3. Выраженность клинических проявлений МЭХД ассоциирована с мажорными мутациями в гене *EXT2*: с.310delA (p.Ile104fs*8) – с выраженной формой заболевания, а мутация с.751C>T (p.Gln251*) – с умеренной.

4. Разработан и внедрен в практику медико-генетического консультирования алгоритм подтверждающей молекулярно-генетической диагностики частых мутаций с.310delA (p.Ile104fs*8) и с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2*, позволяющий определить генетическую причину заболевания у 64,0% пробандов.

Степень достоверности результатов проведенных исследований:

Достоверность полученных результатов работы основана на репрезентативной выборке пациентов из Якутии. Аналитическая достоверность обеспечена использованием современных высокоинформативных технологий анализа генома.

Апробация материалов диссертации

Материалы и результаты по теме диссертации представлены в виде устных докладов и тезисов на научно-практических конференциях: на VII Всероссийском конгрессе с международным участием «Экология и здоровье человека на Севере», посвященном 60-летию СВФУ им. М.К. Аммосова, (Якутск, 14-19 ноября 2016 г.), VIII Всероссийском конгрессе с международным участием «Экология и здоровье человека на Севере», Аспирантских чтениях «Северное сияние», (Якутск, 13-16 ноября 2017 г.), на II Молодежной конференции с международным участием «Генетика и здоровье: Актуальные вопросы и современные технологии», посвященной 25-летию ГАУ РС (Я) РБ№1-НЦМ, (Якутск, 8-9 июня 2017 г.), на XI научной конференции «Генетика человека и патология», посвящённой 35-летию Научно-исследовательского института медицинской генетики, (Томск, 27-30 ноября 2017 г.), на IV научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы медицинской генетики на крайнем севере», посвященной 30-летию медико-генетической службы и 30-летию курса медицинской генетики в РС (Я), (Якутск, 7-9 июня 2019 г.), на XII научной конференции «Генетика человека и патология»: Актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики,

(Томск, 20-22 ноября 2019 г.), European Human Genetics Conference, (Вена, Австрия, 6-9 июня 2020 г.), на IX съезде Российского общества медицинских генетиков, (Москва, 30 июня, 1-2 июля 2021 г.), European Human Genetics Conference, (Вена, Австрия, 28-31 августа 2021 г.), Bionformatics of genome regulation and structure/systems biology, the Thirteenth International Multiconference, (Новосибирск, Россия, 04-08 июля 2022 г.), на VIII научной конференции «Генетика человека и патология», посвящённой 40-летию Научно-исследовательского института медицинской генетики, (Томск, 20-22 ноября 2022 г.).

Работа поддержана грантом Главы РС (Я) для молодых ученых, специалистов, студентов (№103-РГ от 7 февраля 2017 г.).

Представленные результаты получены в рамках выполнения государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. («Геномика Арктики: эпидемиология, наследственность, патология», FSRG–2020–0014).

Личное участие автора

Автором проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы. Автор лично принимала участие при осмотре пациентов, анализировала генетические карты с последующим заполнением индивидуальных протоколов. Принимала участие в экспедиционных выездах с целью сбора образцов крови. Участвовала при формировании выборки для проведения МПС, проводила все этапы молекулярно-генетических исследований (выделение ДНК, ПЦР, прямое секвенирование по Сэнгеру). Автор непосредственно участвовала в статистической обработке полученных данных, включая анализ гено-фенотипических корреляций. Принимала участие в биоинформационном анализе данных секвенирования. Результаты настоящего исследования опубликованы и представлены автором в научных конференциях. Текст и оформление диссертационной работы выполнены лично автором.

Публикации

По материалам диссертационного исследования опубликовано 13 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, а также тезисы докладов на российских и международных конференциях.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 206 страницах машинописного текста, содержит 33 таблицы, 36 иллюстраций. Состоит из следующих разделов: список сокращений, оглавление, введение, основная часть с результатами собственных исследований, заключение, выводы, список литературы и приложения. Библиографический указатель включает 227 источников, из них 81 отечественных и 128 – зарубежных авторов, а также 18 интернет ресурсов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика генетического разнообразия якутской этнической группы

Для оценки генетического разнообразия популяций и этнических групп используется широкий спектр маркерных систем: классические маркеры генов (группы крови, сывороточные белки и ферменты), различные типы молекулярно-генетических полиморфных вариантов как по аутосомным локусам, так и по мтДНК, и Y-хромосоме [Cadenas A.M. et al., 2008; Данилова А.Л., 2009]. Знание о генетическом разнообразии популяций, этнических групп дает возможность определить генетические основы формирования уровня здоровья населения, адаптацию человека к конкретным условиям проживания и специфику заболеваемости как моногенными, так и мультифакториальными формами патологии [Cox M.P. et al., 2007], также их историю формирования, этногенеза и относительной значимости факторов популяционной динамики, имевших место на протяжении всего периода их эволюции [Данилова А.Л., 2009].

Проблемой изучения генетического разнообразия якутов на протяжении многих лет занимались различные группы исследователей [Спицын В.А., 1985; Посух О.Л. и др., 1990; Федорова С.А., 2008; Пузырев В.П., Максимова Н.Р., 2008]. Генетические маркеры систем иммунологического (эритроцитарные антигены групп крови) и биохимического (белки и ферменты сыворотки крови, эритроцитарные ферменты крови) вариантов [Максимова Н.Р., 2009], аутосомные STR-локусы [Степанов В.А., 2002], линии митохондриальной ДНК [Пузырев В.П. и др., 2002; Pakendorf V. et al., 2003; Федорова С.А., 2008], Y-хромосомы [Pakendorf V. et al., 2006; Федорова С.А., 2008], гены-кандидаты широко распространенных заболеваний [Пузырев В.П. и др., 2007; Спиридонова М.Г. и др., 2004], генетические варианты наследственных болезней [Брахфогель И.Ф., 2000; Назаренко Л.П. и др., 2002б; Федорова С.А. и др., 2005; Барашков Н.А., 2007; Галеева Н.М. и др., 2006; Максимова Н.Р., 2009].

Как и для других этнических групп, первыми маркерными системами при изучении генетического разнообразия якутов являлись классические маркеры генов: группы крови, эритроцитарные и сывороточные белки, ферменты [Фефелова В.В., 1987; Боева С.Б., 1988; Посух О.Л. и др., 1990; Данилова А.Л., 2009]. Анализ изменчивости классических маркеров генов выявил неоднородность генетической структуры якутов в генетическом отношении [Спицын В.А., 1985; Фефелова В.В., 1987].

В популяционных исследованиях при описании генетической структуры этнических групп активно используются данные по полиморфизму аутосомных систем генов (в том числе гены кандидаты широко распространенных заболеваний), мтДНК и маркеров генов, локализованных на Y-хромосоме [Pritchard M.P. et al., 1999; Santos J.E.P. et al., 2003; Lappalainen T. et al., 2008]. Наиболее ранние результаты исследований по полиморфизму ДНК у коренного населения Якутии были опубликованы в работах М. В. Деренко с соавторами [1998а; б], в дальнейшем исследования у коренного населения Якутии проводились несколькими группами: В. П. Пузырев соавторами [2002], В. А. Степанов [2002], М. Г. Спиридонова с соавторами [2004], С. А. Федорова [2003; 2008], Л. А. Тарская с соавторами [2005] [Данилова А.Л., 2009].

Проведенные исследования инсерций *Alu*–повторов по 8 полиморфным аутосомным локусам (*ACE*, *PLAT*, *APOA1*, *PV92*, *F13B*, *A25*, *D1*) выявили высокую долю межпопуляционных различий в общем генетическом разнообразии у якутов ($G_{ST} = 2,1\%$), что свидетельствует о более выраженной подразделенности якутских популяций и об однородности генофонда эвенков [Хитринская И.Ю., 2003]. В целом для якутов характерен спектр аллельных частот, типичный для других азиатских популяций, но, по сравнению с другими этносами, якуты характеризуются наименьшим генетическим разнообразием и отсутствием интенсивного потока генов извне [Максимова Н.Р., 2002; Хитринская И.Ю. и др., 2003].

В популяциях якутов проведен анализ распространения 6 полиморфных вариантов 3 генов *NOS*: полиморфизма С/Т в гене *NOS1*, G-954С в гене *NOS2* [Данилова А.Л., 2009], С-691Т, С774Т, G894Т и VNTR в гене *NOS3*. Полиморфизм гена

нейрональной синтазы оксида азота *NOS1* является генетическим маркером подверженности многим заболеваниям: *NOS1* – кандидатный ген патологии легких, предрасположенности к бронхиальной астме [Grasemann H. et al., 1999]. По частотам большинства изученных полиморфизмы генов *NOS1* якутов находились в границах оценок, полученных для других этнических групп. Широкий диапазон изменчивости частот аллелей был показан по генетическим вариантам *NOS3*, при этом наибольшее разнообразие было характерно для полиморфизма С691 [Косянкова Т.В., 2002]. Исследование частот генотипов полиморфных локусов [Данилова А.Л., 2009] (2059С/Т и 2197С/Т гена *APOE*, 34622С/Т гена *APOB*, 22125Т/Г гена *LPL*, 20200Г/А гена *CETP*, минисателлита в 4 интроне гена *NOS3*, 16341А/Г гена *PON1*, I/D гена *ACE*, 1166А/С гена *AT1R*) позволило сделать заключение о близости якутов с другими монголоидными популяциями и их отличии от европеоидных [Григорьева Л.В. и др., 2006].

В настоящее время в различных популяциях активно исследуется полиморфный вариант С677Т гена метилентетрагидрофолат-редуктазы (*MTHFR*) при различных наследственных заболеваниях, также данный маркер используется для оценки риска подверженности к широко распространенным заболеваниям [Brattstrom L. et al., 1998; Rosenberg N.A. et al., 2002; Данилова А.Л., 2009], изучаются ассоциации полиморфизма *MTHFR* с сосудистыми нарушениями, преэклампсией, дефектом нервной трубки и эмбриональной гибелью. Все исследованные якутские популяции характеризовались высоким уровнем разнообразия по полиморфизму С677Т гена *MTHFR* – теоретическая гетерозиготность варьирует в пределах от 0,37 до 0,43 [Спиридонова М.Г. и др., 2004].

В последнее время в качестве ДНК-маркера широко используются микросателлитные локусы. Одним из таких маркеров является участок тринуклеотидных (СТГ)_n – повторов в 3'– области гена миотонинпротеинкиназы *DMPK* на хромосоме 19 (q13,3), изучение которого представляет значительный интерес как в медицинском, так и в эволюционном аспектах. Анализ полиморфизма СТГ-повтора гена *DMPK* во многих популяциях выявил различия в частотах аллельных вариантов в норме и при патологии [Данилова А.Л., 2009], причем отличия показаны не только

между этносами, но и субпопуляциями одного этноса [Novelli G. et al., 1994; Zerylnick C. et al., 1995; Иващенко Т.Э. и др., 1997; Сломинский П.А. и др., 2000; Pan H. et al., 2001; Porova S.N. et al., 2001; Лимборская С.А. и др., 2002]. Изучение нормального полиморфизма по участку (CTG)_n-повторов у якутов (центральных, виллюйских и северных) [Данилова А.Л., 2009] выявило резкое преобладание аллелей (CTG)₁₁₋₁₄ до 89% [Федорова С.А. и др., 2005б; Степанова С.К., 2015]. Оценка уровня генетической дифференциации якутских популяций демонстрирует однородность якутского этноса ($F_{st} = 0,79\%$) по сравнению с популяциями Северной Евразии ($F_{st} = 11,83\%$) [Степанова С.К., 2015].

Для анализа генетического разнообразия с целью изучения происхождения популяций и различных этносов активно привлекаются сведения о распределении гаплоидных линий, передающихся по материнской (мтДНК) и отцовской (Y-хромосома) линиям. Данные о полиморфизме мтДНК и Y-хромосоме дополняют друг друга, позволяя вычлнить вклад различных этнических составляющих по отцовской и материнской линии в структуру генофондов [Лимборская С.А. и др., 2002; Федорова С.А., 2008].

Анализ полиморфизма V региона мтДНК у якутов из различных районов Республики выявил высокое разнообразие: наиболее высокий полиморфизм при этом отмечен в Северном и Центральном регионах Якутии [Тарская Л.А. и др., 2003]. Автором данной работы высказано предположение о том, что высокий уровень полиморфизма этого локуса у якутов не является следствием смешения с соседними популяциями, а, возможно, является результатом естественного отбора в распределении линий мтДНК человека; также не исключается влияние климатических факторов [Тарская Л.А., 2005; Данилова А.Л., 2009].

По полиморфизму гипервариабельного сегмента I мтДНК у якутов монголоидный компонент генофонда составляет 90%, европеоидный – 10%. У якутов выявлены 67 гаплотипов мтДНК, которые относятся к 14 гаплогруппам. Наибольшим разнообразием характеризуются гаплогруппы C и D, а среди тюркоязычных этносов у якутов выявлен наиболее низкий показатель генетического разнообразия ($H=0,964$) [Федорова С.А. и др., 2003]. Высокая частота и разнообразие гаплогрупп

С и D также зарегистрированы в исследованиях В. П. Пузырева с соавторами [2003]. В исследованиях, выполненных С. А. Федоровой [2003; 2008], проведено сравнение разнообразия мтДНК якутов и современных палеоазиатов (чукчи, коряки, ительмены), которое не подтвердило гипотезу о вкладе палеоазиатского субстрата в генофонд якутского этноса. В. Pakendorf et al. [2006] по данным об изменчивости линий мтДНК подтверждают южное происхождение якутов и их большую близость с популяциями Центральной Азии и Южной Сибири, чем с северо-восточными – эвенками, эвенами и юкагирами. При этом высокая частота гаплогруппы С у якутов и высокая частота трех гаплотипов С у эвенков предполагает некоторую «примесь» у первых мтДНК эвенкийского происхождения [Федорова С.А. и др., 2003, 2008; Pakendorf V. et al., 2003, 2006]. Уровень разнообразия гаплотипов мтДНК у якутов значительно выше, чем в других популяциях Северо-Востока России и тофаларов из Южной Сибири, не отличается от данных, полученных для тувинцев, тоджинцев и славянских популяций, но ниже, чем в монголоидных популяциях [Тарская Л.А., Мелтон Ф., 2006; Данилова А.Л., 2009].

В якутских популяциях обнаружены четыре гаплогруппы Y-хромосомы: *N3(HG16)*, *N*/N1/N2 (HG12)*, *R1a1(HG3)* и *HG2*. Подавляющая часть мужского генного пула якутов (87,2%) представлена гаплогруппой *N3(HG16)* (аллель *Tat C*) [Пузырев В.П. и др., 2002], т. е. выявлено низкое генетическое разнообразие якутских популяций по гаплогруппам Y-хромосомы. Характер распределения Y-хромосомы у якутов и близкое родство к линиям Y-хромосомы у эвенков позволяет предположить, что мужской генофонд якутской популяции сложился в основном на базе локального (нетюркского) компонента [Пузырев В.П. и др., 2002; Харьков В.Н. и др., 2005; Данилова А.Л., 2009].

1.1.1. Молекулярно-генетические исследования

наследственных заболеваний в якутской этнической группе

В РС (Я) у коренного якутского населения наблюдается высокое накопление наследственных заболеваний. Медико-генетическое исследование параллельно с

молекулярно-генетическими работами позволили идентифицировать этноспецифические мутации генов моногенных заболеваний у якутов [Пузырев В.П., Максимова Н.Р., 2008].

Спиноцеребеллярная атаксия I типа (СЦА1) – наследственное аутосомно-доминантное заболевание, увеличение числа тринуклеотидных CAG-повторов до 39–71 по сравнению с 19–36 в норме в гене *SCA1*, локализованном в области 6p22 – p23 [Lunkes A. et al., 1994]. Возраст манифестации заболевания составляет к 20–40 лет, в клинической картине наблюдается сочетание прогрессирующей мозжечковой и пирамидной симптоматики [Пузырев В.П., Максимова Н.Р., 2008]. До середины 1970-х годов болезнь относили к «мозжечковой форме» вилюйского энцефаломиелита [Владимирцев А.И., 1964; Зубри Г.Л., Гольдфарб Л.Г., 1975]. Распространенность среди якутов – 36,8 на 100 тыс. якутского населения (Таблица 1). Накопление наблюдается в Лено-Алданском междуречье, Индигирской группе улусов и бассейнах верхнего течения рек Вилюй и Лена [Lunkes A. et al., 1994; Goldfarb L.G. et al., 1996; Брахфогель И.Ф., 2000; Платонов Ф.А., 2003; Иллариошкин С.Н. и др., 2006]. Анализ аллельного полиморфизма триплетных повторов (CAG)_n в популяции якутов выявил 10 аллельных вариантов, содержащих от 26 до 40 CAG повторов [Попова С.Н. и др., 2002]. Величина индекса фиксации *F_{st}* (степень гетерогенности) в популяции якутов была самой низкой из всех изученных популяций России в 2–3 раза, что говорит о большей генетической гомогенности данной популяции.

Миотоническая дистрофия (МД) – наследственное аутосомно-доминантное заболевание. В клинической картине наблюдается миопатия, сердечно-сосудистые нарушения, эндокринно-вегетативные расстройства, катаракта и снижение интеллекта [Максимова Н.Р., 2009]. Установлена клиническая вариабельность МД с разным возрастом [Максимова Н.Р. и др., 2008], но наиболее часто начинается в 20–30 лет, а также возникают тяжесть клинических форм, мультисистемное поражение, внутри- и межсеме́йный полиморфизм [Сухомясова А.Л., 2005]. Распространенность МД1 в мире в различных популяциях варьирует от 4,0 до 5,0 на 100 тыс.

населения (Таблица 1). В РС (Я) распространенность данного заболевания в среднем по республике составила 10,3 на 100 тыс. населения. Среди выявленных больных около 94% составляют якуты и встречается с частотой 21,3 на 100 тыс. якутского населения [Максимова Н.Р. и др., 2008].

Таблица 1 – Данные по наследственным заболеваниям у якутов и в мире

Заболевание (ОМIM)	Тип наследования	Распространенность болезни на 100 тыс. чел.		Мутация	Литературная ссылка
		у якутов	в мире		
Спиноцеребеллярная атаксия I типа (164400)	АД	36,8	1,0-2,0	Экспансия CAG-повторов в гене <i>ATXN1</i>	Брахфогель И.Ф., 2000
Миотоническая дистрофия (160900)	АД	21,3	4,0-5,0	Экспансия CTG-повторов в гене <i>DMPK</i>	Сухомясова А.Л., 2005
Окулофарингеальная дистрофия (164300)	АД	11,1	1,0	Экспансия GCG-повторов в гене <i>PABPN1</i>	Максимова Н.Р., 2009
3-М синдром (273750)	АР	12,72	-	Нонсенс-мутация 458insT в гене <i>CUL7</i>	Максимова Н.Р., 2009
SOPH синдром (614800)	АР	9,95	-	Мутация G5741 – А в гене <i>NBAS</i>	Максимова Н.Р., 2009
Мукополисахаридоз-плюс синдром (617303)	АР	-	-	Мутация с.1492C>T в гене <i>VPS33A</i>	Kondo H. et al., 2017
Нейрональный цероидный липофуциноз 6 типа (601780)	АР	2,4	0,56 - 13,6*	Мутация с.396dupT в гене <i>CLN6</i>	Гурьева П.И. и др., 2017
Наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия (250800)	АР	14,9	1,0	Мутация P269Leu в гене <i>DIA1</i>	Галеева Н.М. и др., 2006
Несиндромальная глухота 1a типа (220290)	АР	16,2		Мутация (IVS1+1G>A) гена <i>GJB2</i>	Барашков Н.А. и др., 2017

Примечание: ОМIM – номер электронной версии каталога В. МакКьюсика «Mendelian Inheritance in Man» (MIM): www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/; АД – ауто-сомно-доминантный тип наследования; АР – ауто-сомно-рецессивный типа наследования; * - все типы НЦЛ.

Наблюдается очаг накопления в улусах бассейна реки Вилюй и Центральной Якутии (территории первоначального проживания якутов) (Таблица 1) [Сухомясова А.Л., 2005; Пузырев В.П., Максимова Н.Р., 2008].

Молекулярно-генетической основой МД1 является увеличение числа тринуклеотидных СТG-повторов в 3'-нетранслируемого гена миотонинпротеинкиназы (*DMPK*). В норме число тринуклеотидных СТG-повторов варьирует от 5 до 27–37. Количество повторов от 37 до 50 – это премутации. При патологии – более 50 и до нескольких тысяч СТG-повторов. У больных выявлена корреляция между числом СТG-повторов и тяжестью клинического синдрома [Сухомясова А.Л., 2005; Пузырев В.П., Максимова Н.Р., 2008].

Проведенные молекулярно-генетические исследования полиморфизма СТG-повторов гена *DMPK* в популяциях Якутии (якуты, эвенки, эвены, юкагиры и долганы) показали, что для всех, кроме юкагиров, характерно резкое преобладание аллелей (СТG) iM4 с наиболее частыми аллелями 12 и 13 (88–89%) [Максимова Н.Р., 2009]. По данным полиморфизма СТG-повторов и низкое содержание нестабильных аллелей говорит о том, что накопление МД1 в якутской популяции скорее связано с дрейфом генов и эффектом основателя, а не с накоплением нестабильных СТG-повторов (больше 19), значение варьирует от 0 до 15,1% [Федорова С.А. и др., 2005].

Окулофарингеальная миодистрофия (ОФМД) – это аутосомно-доминантное наследственное заболевание нервной системы, манифестирующее обычно на пятом, шестом десятилетии жизни. Болезнь проявляется прогрессирующей мышечной слабостью и атрофией проксимальных отделов конечностей, расстройством глотания и фонации, птозом, слабостью лицевой мускулатуры. ОФМД относится к числу редких заболеваний в мире. Однако в некоторых этнических и территориальных группах эффект основателя ОФМД намного выше, например, во франко-канадской популяции – 1:1000 чел., у евреев Бухары – 1:600 чел. В России исследования ОФМД единичны [Пузырев В.П., Максимова Н.Р., 2008; Максимова Н.Р., 2009].

В Якутии наблюдается высокое накопление ОФМД, среди больных 96,0% приходится на коренное якутское население. Распространенность в РС (Я) составляет 5,3 на 100 тыс. населения, среди якутов 11,0 на 100 тыс. якутского населения (Таблица 1). В республике ОФМД среди якутов распределена неравномерно, с накоплением в отдельных районах [Пузырев В.П., Максимова Н.Р., 2008; Максимова Н.Р., 2009].

Молекулярно-генетической причиной ОФМД также является экспансия три-нуклеотидных GCG-повторов. В норме ген содержит шесть tandemных копий повторов GCG. У больных число повторов может достигать 8–13 копий. В некоторых популяциях экспансия числа повторов происходит за счет простого добавления GCG-повторов [Максимова Н.Р., 2009; Куртанов Х.А., 2015], а в других вместе с экспансией GCG-повторов происходит вставка четырех GCG-повторов. На основании проведенных исследований разработан алгоритм диагностики ОФМД с использованием прямой ДНК-диагностики ОФМД [Пузырев В.П., Максимова Н.Р., 2008; Максимова Н.Р., 2009].

Якутия является эндемическим очагом аутосомно-рецессивного заболевания – энзимопенической наследственной метгемоглобинемии I типа (НЭМ) [Назаренко Л.П. и др., 2002б; Данилова А.Л., 2009].

Заболевание проявляется цианозом кожных покровов и слизистых, одышкой, головной болью, умственной отсталостью различной степени выраженности, повышенным уровнем метгемоглобина и недостаточностью метгемоглобинредуктазы в крови [Пузырев В.П., Максимова Н.Р., 2008; Максимова Н.Р., 2009].

В Якутии распространенность среди якутов составляет 14,9 на 100 тыс. якутского населения, в мире 1,0 на 100 тыс. населения (Таблица 1) [Максимова Н.Р., 2009]. Молекулярно-генетические исследования по поиску мутаций у больных якутской этнической группы, на основании ранее идентифицированных 3 точковых мутаций (Leu72Pro, Vall105Met, Arg57Gln) в гене *DIA1* в японской и китайской популяциях, показали отсутствие каждой из них [Банщикова Е.С., 2002; Назаренко Л.П. и др., 2002б]. Была выявлена новая миссенс-мутация в экзоне 9, приводящая к

аминокислотной замене Pro269Leu фермента NADH-цитохром-b5-редуктазы [Галеева Н.М. и др., 2006; Максимова Н.Р. и др., 2008].

3-М синдром (Якутский синдром низкорослости) – аутосомно-рецессивное заболевание. Это редкое наследственное заболевание [Максимова Н.Р. и др., 2007; Пузырев В.П., Максимова Н.Р., 2008] характеризуется пре- и постнатальной задержкой роста, лицевыми дизморфиями, нормальным интеллектом и рентгенологическими изменениями в костях (тонкие трубчатые кости и длинные позвонки) [Максимова Н.Р. и др., 2009]. Частота 3-М синдрома не известна, так как было выявлено около 50 единичных случаев данного синдрома в мире в течение 30 лет в разных этнических группах [Максимова Н.Р. и др., 2008; Максимова Н.Р., 2009].

В Якутии данное заболевание встречается только у коренного якутского населения. Распространенность 3-М синдрома в РС (Я) для всего населения составляет 5,79 на 100 тыс. населения и 12,72 на 100 тыс. якутского населения (Таблица 1). Характерно неравномерное распределение с накоплением в отдельных районах. Наибольшая частота зарегистрирована в Ленском, Оленекском, Усть-Майском, Амгинском, Намском и Сунтарском улусах [Максимова Н.Р., 2009].

Для выяснения молекулярно-генетической причины был проведен поиск мутации у больных и их родственников с использованием современных молекулярно-генетических методов, в результате которого впервые у якутской популяции найдена единственная генетическая причина заболевания – нонсенс-мутация 458insT в гене *CUL7*. Далее проведены популяционные исследования частоты выявленной мутации среди якутов из 3 групп районов республики (центральная, вилюйская и северная). Частота мутации 458insT у якутов из центральных районов Якутии составила 3,2%, из северных районов – 1,0%, из вилюйской – 0,4% [Максимова Н.Р., 2009]. Общая популяционная частота данной мутации составила 1,5%, а частота гетерозиготного носительства – 3% [Генетические исследования населения Якутии, 2014]. Получен патент Российской Федерации №2315310 «Способ диагностики 3-М синдрома в якутской популяции» и внедрен молекулярно-генетический метод в практику медико-генетического консультирования в РС (Я).

SOPH синдром – наследственное аутосомно-рецессивное заболевание. Основными клиническими симптомами являются: постнатальная гипоплазия, пропорционально низкий рост, лицевые дизморфии, микромелия стоп и кистей, вялая и дряблая кожа, атрофия зрительных нервов, пельгеровская аномалия нейтрофилов, без умственной отсталости [Максимова Н.Р., 2009].

В Якутии этот синдром встречается только среди коренного якутского населения и описан впервые. Распространенность SOPH синдрома в РС (Я) составила 4,53 на 100 тыс. для всего населения, а среди якутов 9,95 на 100 тыс. якутского населения (Таблица 1). Заболевание зарегистрировано в 14 районах республики [Максимова Н.Р., 2009].

Далее проведен поиск молекулярно-генетической причины SOPH синдрома у больных с использованием современных молекулярно-генетических методов, в результате которого выявили миссенс-мутацию G5741–А в гене *NAG* в гомозиготном состоянии у больных [Максимова Н.Р., 2009]. Для установления частоты гетерозиготного носительства мутации G5741 – А (R1914H) в гене *NAG* проведено популяционное исследование у здоровых якутов. В результате частота гетерозиготного носительства составила 13 на 1000 здоровых якутов [Максимова Н.Р. и др., 2016]. Внедрен молекулярно-генетический метод (ПЦР) в практику медико-генетического консультирования в РС (Я).

В 2016 г. сотрудниками УНЛ «Геномная медицина» Клиники МИ совместно с МГЦ РБ №1-НЦМ выявлено ранее неизвестное заболевание из группы лизосомных болезней накопления – мукополисахаридоз-плюс синдром (МПС ПС). Это наследственное аутосомно-рецессивное заболевание. Клиническая картина: грубые черты лица, скелетные аномалии, нарушения со стороны дыхательной системы, поражение почек, печени, сердца, отставание в психомоторном развитии [Kondo H. et al., 2017].

В настоящее время выявлено 19 пациентов с данным заболеванием. 17 пациентов были обнаружены среди якутов (Россия) и два пациента из Турции. В 2017 году впервые в мире одновременно у больных якутской и турецкой популяций была идентифицирована молекулярно-генетическая причина данного заболевания,

мутация с.1492C>T в гене *VPS33A*, которая приводит к аминокислотной замене аргинина на триптофан в позиции 498 [Kondo H. et al., 2017]. Методом секвенирования по Сэнгеру подтверждена данная мутация у всех пациентов в гомозиготном состоянии и у родителей в гетерозиготном состоянии.

Новое заболевание включено в международную базу данных наследственных заболеваний OMIM под номером (#617303). Прогнозируется заболеваемость МПС ПС в якутской популяции 1 на 12100 рождений. Популяционные исследования на носительство мутации с.1492C>T (p.Arg498Trp) в гене *VPS33A* у 110 здорового якутского населения выявили частоту аллеля 1 из 81 [Kondo H. et al., 2017].

Нейрональный цероидный липофусциноз 6 типа (НЦЛ-6) – наследственное тяжелое нейродегенеративное заболевание с рецессивным типом наследования. Проявляется в возрасте 2–4 лет, среди его симптомов, в частности, эпилепсия, частичная или полная потеря координации движений (атаксия), регресс психологического развития, деменция, нарушение зрения [Гурьева П.И. и др., 2017].

НЦЛ 6 типа впервые в Якутии диагностирован в 2016 году. Все больные якутской национальности. Среди якутов распространенность составила 2,4 случая на 100 тыс. населения. В мире распространенность всех типов НЦЛ колеблется от 0,56 до 13,6 на 100 тыс. населения (Таблица 1).

Совместно с медико-генетическим центром РБ №1-НЦМ на базе УНЛ «Геномная медицина» Клиники СВФУ им. М.К. Аммосова проведен молекулярно-генетический поиск мутации, приводящей к НЦЛ 6 типа. В результате исследования выявлена мутация с.396dupT (p.Val133CysfsTer18) в 4-м экзоне гена *CLN6* в гомозиготном состоянии, приводящая к сдвигу рамки считывания. Родители больных являлись гетерозиготными носителями [Гурьева П.И. и др., 2017]. Внедрен молекулярно-генетический метод (ПЦР) в практику медико-генетического консультирования в РС (Я).

Несиндромальная глухота 1а типа – наследственное аутосомно-рецессивное заболевание. Заболевание проявляется врожденной глухотой. Это одна из наиболее частых заболеваний человека, регистрируемая с частотой 1 на 650–1000 ново-

рожденных детей. Более 50% всех случаев врожденной глухоты имеют наследственные причины. Наиболее частой формой наследственной глухоты считается несиндромальная глухота, которая характеризуется клиническим полиморфизмом и генетической гетерогенностью [Барашков Н.А. и др., 2017; Чердонова А.М. и др., 2020]. В Якутии заболевание встречается с частотой 16,2 на 100 тыс. якутов, вызывается мутацией в гене *GJB2* (Таблица 1). Молекулярно-генетическим исследованием впервые выявлена в популяции якутов мажорная мутация донорного сайта сплайсинга IVS1+1G>A в гене *GJB2*. При популяционном исследовании среди коренного населения Якутии (эвены, эвенки, долганы, якуты) гетерозиготное носительство данной мутации составило от 3,8 до 11,7% [Барашков Н.А. и др., 2017]. Внедрен молекулярно-генетический метод (ПЦР) в практику медико-генетического консультирования в РС (Я).

1.2. Множественная экзостозная хондродисплазия

МЭХД или множественные остеохондромы (МО) (OMIM 133700, OMIM 133701) – это генетически гетерогенное заболевание, проявляющееся генерализованными формами поражения скелета с многочисленными прогрессирующими деформациями костей и суставов [Philippe C. et al., 1997; Tian C. et al., 2014].

МЭХД имеет аутосомно-доминантный тип наследования, очень велика доля семейных случаев [Чеснокова Г.Г., 1999]. Заболевание ассоциировано с мутациями генов *EXT1* (OMIM #608177) и *EXT2* (OMIM #608210), кодирующих соответственно белки EXT1 (экзостозин 1) и EXT2 (экзостозин 2). По данным некоторых авторов сообщается, что преобладание мужчин с МЭХД в два раза больше, чем женщин [Wickland C.L. et al., 1995; Чеснокова Г.Г., 1999].

Заболевание встречается в двух формах: МЭХД и солитарный костно-хрящевой экзостоз. При солитарных поражениях выявляются неподвижные различных размеров и форм опухолевидные образования; кожные покровы над ними обычно не изменены. Большинство авторов рассматривает одиночные и множественные экзостозы как две формы единого по своей сущности процесса. Наряду с этим в литературе и клинической практике одиночное образование часто расценивают как

доброкачественную опухоль – хондрому или остеохондрому. Факт наследования одиночных экзостозов не установлен [Зоткин А.В., 2011]. Костно-хрящевой экзостоз больших размеров может оказывать давление на сосуды или нервные стволы, вызывая боль. Около 75% больных подвергаются хирургическому лечению по удалению экзостозов [Kang Q. et al., 2013].

МЭХД интенсивно развивается в период физиологического роста скелета, в детском и юношеском возрасте [Шишкина Н.С. и др., 2004] и представлен генерализованными формами поражения скелета с многочисленными прогрессирующими деформациями костей и суставов, укорочением и вторичными изменениями костей, вторичными изменениями в мышечной системе. К 18–20 годам рост экзостозов прекращается [Благодатский М.Д. и др., 1999; Makhdom A.M. et al., 2014; Федотов В.П. и др., 2015; Боголепова Н.Н., Матюшевская Е.В., 2016].

По данным А. В. Русакова, «хрящевые экзостозы – это не просто опухолеподобная ткань, а интегральные части порочно развивающихся костных органов». Он, как и все другие авторы, считал экзостозы дистопией деривата скелетогенной мезенхимы, определяющей рост костей в длину. Подтверждением этого А. В. Русаков с соавторами считали, что экзостозы сохраняют ту же реактивность, что и нормальный ростковый хрящ. Это подтверждается тем, что период усиленного роста ребенка совпадает со временем усиленного роста экзостозов [Зацепин С.Т., 2001].

В 1740 году впервые дано описание экзостозов итальянским врачом Gockelius [Волков М.В. и др., 1982; Волков М.В., 1985; Цыбанов А.С., 2004]. Первые МЭХД была упомянута в 1786 году Джоном Хантером в его «Лекциях о принципах хирургии». А в 1814 году Бойером была описана первая семья с МЭХД. В 1837 г. Купером было установлено, что экзостозы происходят из хряща, а в 1864 году Р. Вирхов выделил три вида костных разрастаний: разрастания, возникающие из надкостницы вследствие ее раздражения; разрастания, образующиеся путем окостенения мышц, фасций, связок и сухожилий; разрастания, образующиеся из хряща наподобие нормальной костной ткани. Для последних он и оставил название «экзостоз». В последующие годы хрящевым экзостозам как в отечественной, так и в

зарубежной литературе было посвящено большое количество публикаций, в которых их описывали под разными названиями [Лагунова И.Г., 1989; Зацепин С.Т., 2001; Федотов В.П. и др., 2015].

Beighton et al. проанализировали скелеты взрослых в Музее патологической анатомии в Вене, который был основан в 1796 г. императором Францем II и содержит 44 000 экспонатов. Beighton et al. описали скелет человека с МО, который умер в 1842 г. от разрыва аневризмы аорты (вероятно, сифилитической) [Beighton P. et al., 1992, 1993]. Krooth et al. (1961) в своей статье сообщают, что первые описания заболевания были сделаны Stocks and Barrington (1925), которые обобщили клиническое описание 1189 случаев из литературы со всего мира, провели исследование 21 больного из 6 семей с диафизарным аклазисом (множественными экзостозами) [Krooth R. et al., 1961].

По данным отечественной и зарубежной литературы, МЭХД составляет 41% от всех первичных опухолей и опухолеподобных дисплазий скелета у детей, от 5 до 14% случаев. Остеохондромы (опухоли костной ткани с хрящами) на сегодняшний день наиболее распространены среди всех первичных доброкачественных опухолей кости (50%) [Фохтин В.В. и др., 2014; Jurik A.G., 2020].

По мнению Т. П. Виноградовой, в основе этого заболевания лежит нарушение энхондрального окостенения. По данным М. В. Волкова (1974), это заболевание составляет 27% от всех первичных опухолей и опухолеподобных дисплазий скелета у детей, костно-хрящевые экзостозы среди доброкачественных опухолей костей встречаются в 40% случаев. Заболевание хорошо изучено в клиническом, рентгенологическом, морфологическом и генетическом аспектах. Доказан факт его наследственной передачи в 75% от всех наблюдений [Зацепин С.Т., 2001; Зоткин А.В., 2011].

Таким образом, МЭХД является достаточно распространенным наследственным заболеванием, не исключается в случаях солитарных экзостозов воздействие внешних факторов, механическое воздействие.

1.2.1. Классификация наследственных заболеваний скелета и множественной экзостозной хондродисплазии

Классификация наследственных заболеваний скелета имеет длительную историю. На протяжении около 100 лет проводились исследования. Начиная с 60-х годов XX века начала создаваться систематизация наследственной патологии опорно-двигательного аппарата. Классификации строились на разных основаниях: на принципах нарушения формирования кости, на основании локализации дефекта моделирования кости (рентгеноанатомическая систематизация). Последний вид систематизации представлен в работе Ф. Рубина 1964 года «Об организации динамической классификации дисплазий костей».

Применение новых технологий в исследовании заболеваний скелета, относящихся к сфере next generation sequencing (NGS), секвенированию нового поколения, позволяет определить новые клинические объекты и сферы исследований, идентификации генов и причин, приводящих к нарушениям. Технология NGS нового поколения – массовое параллельное секвенирование, разработанное в этих рамках в 1990 году, позволяет секвенировать мРНК транскрипты и оценивать генную экспрессию, опираясь на индивидуальные уровни мРНК в отдельной клетке. Эти изменения должны помогать исследователям в области биологии скелета, а также практикующим клиницистам в более точной диагностике и лечении заболеваний, имеющих в своей основе генетическую предрасположенность и наличие генных нарушений.

Разработки в области номенклатуры конституциональных заболеваний костей берут свое начало в конце 60-х и в начале 70-х годов XX столетия. Специалисты в области радиологии, ортопедической хирургии, педиатрии и генетики в Париже начали прорабатывать общую номенклатуру генетических нарушений скелета. Это было вызвано тем фактом, что была обнаружена значительная гетерогенность генетических нарушений скелета по сравнению с тем, как считалось ранее. Появилось представление о разнообразии рентгенологического характера среди пациентов с «конституциональным» нарушением костей.

Первоначально была создана Международная номенклатура и классификация остеохондродисплазий. Развитие представлений о заболеваниях способствовало тому, что номенклатура обновлялась неоднократно – в 1977, 1983, 1992 и 1997 годах. Достигнутые в ходе исследований результаты приводят к созданию «Нозологии и классификации генетических нарушений скелета». Этому способствовали публикации касательно Международной номенклатуры и классификации остеохондродисплазий.

В работе Дж. Шпрангера 1992 года, опубликованной в журнале «Европейская педиатрия» описана классификация остеохондродисплазий. Этой же теме посвящена работа П. Бейтона, А. Гредиона, Р. Горлина, Б. Хортон, К. Козловского, Дж. Шпрангера и др., опубликованная в журнале «Американская медицинская генетика» в 1992 году [Spanger J., 1992].

Д. Раймон в 1997 году описывал новую версию Международной номенклатуры «конституциональных» нарушений костей в журнале «Педиатрическая радиология» [Rimoin D.L., 1979]. В этом же издании появилась работа Р. С. Лахмана 1997 года, в которой описаны номенклатура и классификация остеохондродисплазий [Lachman R.S., 1998].

В 1999 году было создано Международное общество дисплазии скелета (ISDS). Пересмотр Номенклатуры был передан экспертному комитету, который возник в рамках этого общества. Особенность работ над этим вариантом классификации – наличие большого количества специалистов, которые являлись носителями полного набора клинических, радиологических, генетических представлений. Они продолжили работу над обновленной Номенклатурой. Очередной пересмотр Нозологии был представлен в 2002 году, а затем публиковались новые версии классификации через определенные промежутки времени: С. М. Холл (2002), А. Суперти-Фурга, С. Унгер (2007), М. Л. Варман и др. (2011), Л. Бонафе и др. (2015) [Hall, 2002; Superti-Furga A., Unger S., 2007; Warman M.L. et al., 2011; Bonafe L. et al., 2015].

Наконец, в 2019 году вышла свежая «Нозология и классификация генетических нарушений скелета», версия 2019 года в журнале «Американская медицинская генетика» [Mortier G.R. et al., 2019]. Обновление последней версии Нозологии

было проведено Комитетом по нозологии Международного общества дисплазии скелета.

Включение отдельных расстройств в классификацию происходит в соответствии с рядом критериев. К ним относятся следующие:

1. расстройство должно предполагать значительную распространенность на скелет, чему соответствуют скелетные дисплазии/дизостозы, метаболические нарушения костей, либо синдромы пороков развития/редукции скелета;
2. расстройство должно быть описано в рецензируемой публикации, которая включена в PubMed, OMIM, иной биомедицинский архив/базу данных;
3. под ним должна существовать генетическая основа, которую подтверждает наличие родословной либо один и тот же фенотип в неродственных семьях. Еще одним обоснованием может выступать молекулярный анализ (анализ мутаций или сцепленного наследования);
4. расстройство должно представлять собой нозологическую автономную единицу, иными словами, не быть вариацией другой нозологии.

Если расстройство соответствует этим критериям, оно получает запись в классификации. Причем на нее не влияет схема наследования.

В обновленную нозологию включены 461 нарушение, все они разбиты на 42 группы. Эта классификация разделяет наследственные заболевания опорно-двигательного аппарата на группы, исходя из анатомо-физиологического основания и характера нарушения – усиления или торможения развития определенной зоны кости. В итоге хондродисплазии делятся на 4 большие группы: эпифизарные, физарные, метафизарные, диафизарные дисплазии и гиперплазии [Rubin P., 1964]. Данная систематизация одобрена практической медициной и используется практикующими специалистами. С развитием генетики разработки в области систематизации наследственных нарушений опорно-двигательного аппарата получили дополнительный импульс.

Хондродисплазии представлены в различных группах этой классификации. Традиционная систематизация заболеваний по типу хондродисплазий в рамках динамической классификации, делит заболевания, учитывая характер и тип поражения хрящевой ткани, на основные группы:

1. Эпифизарные. Это поражения суставного хряща эпифиза. Основные заболевания этой группы: болезнь Волкова, спондилоэпифизарная дисплазия, псевдоахондроплазия, болезнь Фэрбанка.

2. Физарные. Относятся к области формирования ростковой эпифизарной пластинки. К этой группе относятся ахондроплазия (хондродистрофия), гипохондроплазия, экзостозная хондродисплазия.

3. Метафизарные. Патологические изменения происходят как следствие задержки энхондрального роста на фоне неправильного окостенения хрящей метафизов. Наименее изученная область. Существует описание ряда заболеваний этого типа: ихондроплазия (болезнь Олье), хондродисплазии типа Янсена, Шмида, МакКьюсика.

Соотнося эту принятую в практической медицине систематизацию с Нозологией Международного общества дисплазии скелета, можно заметить, что с генетической точки зрения ряд заболеваний, например, нескольких типов спондилоэпифизарной дисплазии попадет в рамках Нозологии в группу TRPV4 по признаку отнесения к определенной группе генов. Это группа №8 в «Нозологии и классификации генетических нарушений скелета. Версия 2019 года».

Метафизарные дисплазии по типу Шмида, Янсена и другие соответствуют 11 группе «Нозологии» – Metaphyseal dysplasias [Mortier G.R. et al., 2019].

В нескольких работах, посвященных экзостозной хондродисплазии, представлены различные классификации и описание. Так, М. В. Волков (1985) относил данное заболевание в группу физарных дисплазий по форме: холмовидные, шаровидные, пальцевидные, шиповидные и др. [Фохтин В.В. и др., 2014].

А. А. Аренберг (1964 г.) разработал классификацию экзостозной хондродисплазии, в основу которой положен принцип локализации очагов поражения [Фохтин В.В. и др., 2014].

I форма – акроформа – поражение костей кисти и стопы. II форма – моноメリческая – поражение костей одной конечности с прилегающей частью тазового или плечевого пояса. III форма – односторонняя или преимущественно односторонняя. IV форма – двусторонняя [Цыбанов А.С., 2004]:

- а) по форме патологии: солитарная и множественная;
- б) по активности роста: умеренная, повышенная, быстро пролиферирующая;
- в) наличие связи с ростковой зоной: имеется или отсутствует;
- г) по видам: с узким основанием (пальцевидные, грибовидные, крючковидные), с широким основанием (холмовидные), муфтообразные (циркулярное поражение кости) [Цыбанов А.С., 2004; Фохтин В.В. и др., 2014].

МЭХД относится к физарным дисплазиям, характеризуется нарушениями формирования ростковой эпифизарной пластинки. По классификации генетических скелетных заболеваний соответствует к группе №29, включающей заболевания с аномальным развитием скелетных компонентов [Mortier G.R. et al., 2019].

1.2.2. Эпидемиология множественной экзостозной хондродисплазии

МЭХД относится к числу достаточно распространенных наследственных заболеваний. По данным ряда исследователей, заболевание встречается преимущественно среди европеоидных популяций. В мире варьирует от 1:1000 в небольшой популяции Гуама до 1,3:100 000 в европейской популяции [Hennekam R.C., 1991; Krooth R. et al., 1961]. В западных странах мира встречается с частотой 1:50000 [Hennekam R.C., 1991; Xia P. et al., 2016; Hong G. et al., 2017]. В популяциях европейской части России частота МЭХД составляет: у башкиров – 0,06:100000, у чувашей – 0,34:100000, в Тверской области – 0,39:100000, в Ростовской области – 0,16:100000, в Краснодарском крае 0,28:100000 (Таблица 2) [Бочков Н.П. и др., 2012; Зинченко Р.А. и др., 2009, 2014].

Таблица 2 – Распространенность МЭХД в различных популяциях

Популяция	Численность населения, тыс.чел.	Географическое расположение	Частота на 100 тыс.	Литература
В мире				
Чаморро	32	о. Гуам (США)	65 (21 случай, 1 :1000)	[Hennekam R.C., 1991; Krooth R. et al., 1961]
Индейцы Поингасси	0,583	резервация Поингасси (Манитоба, Канада)	1298 (1:77)	[Hennekam R.C., 1991; Krooth R. et al., 1961]
Обще-европейская	—	Европа	1,3-2	[Wuyts W. et al., 1996; Wang X. et al., 2012]
В Российской Федерации				
Карачаевцы	194,3	Карачаево-Черкесская Республика	0,9	[Зинченко Р.А. и др., 2014]
Татары	2012,6	Республика Татарстан	4,8 (1:20927)	[Зинченко Р.А. и др., 2014]
Башкиры	1199,7	Республика Башкортостан	0,06	[Бочков Н.П. и др., 2012]
Чуваши	814,8	Республика Чувашия	0,34	
Русские	3795,6	Ростовская область	0,16	
Русские	626,1	Костромская область	0,04	
Русские	4522,9	Краснодарский край	0,28	
Русские	1199,6	Кировская область	0,11	
Русские	1296,7	Тверская область	0,39	

Высокие показатели уровня распространенности МЭХД были обнаружены в популяциях коренных жителей острова Гуам и индейцев Поингасси (Таблица 2) [Hennekam R.C., 1991]. Частота заболевания среди азиатского населения до сих пор не изучена [McCormick C. et al., 1998; Яковлева А.Е., Максимова Н.Р., 2018].

1.2.3. Клиническая картина множественной экзостозной хондродисплазии

Заболевание встречается в двух формах: МЭХД и солитарный костно-хрящевой экзостоз, которые могут поражать любую кость. Излюбленной локализацией являются метафизы длинных трубчатых костей [Цыбанов А.С., 2004].

Клиническая симптоматика МЭХД зависит от формы заболевания, локализации, размеров экзостозов, их формы и взаимоотношения с окружающими органами

и тканями. По данным С. Т. Зацепина (2001), клинически экзостозы могут проявляться весьма различно, так как могут вызывать множество вторичных симптомов. Врачам хорошо известно, что экзостозы имеют разную форму: сравнительно широкое основание и тонкий, острый конец; узкое основание, заканчивающееся округлым или шаровидным концом, в основном хрящевым; одни экзостозы почти одновременно с ростом окостеневают, другие имеют большую хрящевую необызвестляющуюся «шапку» [Зацепин С.Т., 2001]. Размер и количество экзостозов постоянно увеличиваются, вызывая деформации суставов и костей, ограничения движения, сдавливая нервы, кровеносные сосуды, соединительную ткань (Рисунок 1) [Hennekam R.C., 1991].



Рисунок 1 – Больной с МЭХД, экзостозы в области метафизов, плеча и коленных суставов (https://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_medicine/21489/)

При солитарных поражениях выявляются неподвижные по отношению к кости различных размеров и форм опухолевидные образования; кожные покровы над ними обычно не изменены. Костно-хрящевые экзостозы больших размеров могут оказывать давление на сосуды или нервные стволы, вызывая боль. Расположение

экзостозов в области позвоночника с их ростом в сторону позвоночного канала может вызвать компрессию спинного мозга [Цыбанов А.С., 2004].

При множественной форме экзостозной хондродисплазии нередко на первый план выступают такие симптомы, как низкорослость, косорукость, вальгусная деформация коленных суставов. Расположение экзостозов в области позвоночника с их ростом в сторону позвоночного канала может вызвать компрессию спинного мозга [Чеснокова Г.Г., 1999]. Число экзостозов у одного больного может колебаться от одного до тысячи и более [Цыбанов А.С., 2004]. Приводятся случаи бессимптомного течения заболевания, когда экзостозы выявляли при рентгенологическом обследовании по поводу других заболеваний или травм [Цыбанов А.С., 2004].

Размеры и формы костно-хрящевого экзостоза разнообразны. Основными признаками экзостозов являются: локализация в метафизарной или метадиафизарной зоне; костно-хрящевой экзостоз может иметь широкую или узкую ножку, являющуюся продолжением кортикального слоя самой кости и костномозговой полости; основная масса экзостоза представляет костную структуру, наружная поверхность его может быть ровной или с шиповидными выростами (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Рентгенограмма больного с МЭХД, стрелками указаны экзостозы (фото автора)

Локализация экзостозов по частоте соответствует зонам роста с наибольшей его потенцией – это нижняя зона роста бедренной кости, верхней плечевой, боль-

шеберцовой костей и т. д., рост экзостоза продолжается обычно в период роста костей, но иногда увеличение его размеров отмечается и после закрытия зон роста [Шавырин Д.А., 2014].

По данным некоторых авторов, первые клинические проявления заболевания чаще встречаются в период физиологического роста скелета, в детском и юношеском возрасте. Выявление экзостозных разрастаний в более раннем возрасте относится к казуистическим случаям [Раззаков А.А., 1986; Шишкина Н.С. и др., 2004]. Также некоторые авторы сообщают о том, что клиническая картина множественной формы заболевания проявляется до 12-летнего возраста [Legeai-Mallet L. et al., 1997; Liang Ch. et al., 2020].

Наиболее частой локализацией МЭХД являются метафизы длинных трубчатых костей. Поражения дистального метафиза бедренной кости, проксимальных метафизов плечевой и большеберцовой костей встречаются в 48% случаев от всех костно-хрящевых экзостозов [Stickens D. et al., 1996; Зацепин С.Т., 2001; Heinritz W. et al., 2009; Xia P. et al. 2016].

Одним из грозных осложнений течения костно-хрящевых экзостозов является их озлокачествление [Чеснокова Г.Г., 1999; Зоткин А.В., 2011], трансформация экзостозов в хондросаркому или остеосаркому, встречающуюся у 0,5–5% больных с МЭХД [Bovee J.V., 2008]. По данным С. Т. Зацепина, Л. П. Кузьминой, превращение экзостозов в хондросаркому отмечено у 12,5% больных, по данным Adler (1983) – около 20%. В. В. Балберкин (1994) отмечает, что среди 29 случаев озлокачествившихся костно-хрящевых экзостозов в 25 наблюдениях была диагностирована хондросаркома и в 4 – остеогенная саркома. Чаще озлокачествление экзостозов имеет место у больных с множественной формой экзостозной хондродисплазии (72%). Превалирующей локализацией озлокачествления экзостозов являются кости таза, реже лопатка, ребра, позвоночник [Зацепин С.Т., 2001; Kang Q. et al., 2013]. По данным А. М. Герасимова и А. А. Раззакова (1985), анализ компонентов протеогликановых агрегатов экстракта хряща экзостозов с повышенной активностью роста (с признаками равномерного и неравномерного костеобразования) позволил выявить повышение содержания гиалуроновой кислоты в 5-10 раз; соотношение

хондроитин-4-сульфата и хондроитин-6-сульфата было равно 85:15 при норме 50:50. Соотношение белков из протеогликановых агрегатов хряща экзостозов с повышенной активностью роста было близко к соотношению, характерному для хряща новорожденных и некоторых других растущих опухолей, в то время как в экстрактах хряща крыла подвздошной кости тех же больных оно соответствовало возрастной норме [Зацепин С.Т., 2001]. Белки экзостозин 1 и экзостозин 2 образуют гетероолигомерный комплекс, который функционирует в биосинтезе протеогликана-гепарансульфата [Chen X-J. et al., 2016].

1.2.4. Молекулярно-генетические аспекты множественной экзостозной хондродисплазии

В настоящее время в диагностике МЭХД высокую информативность обеспечивают методы молекулярно-генетического анализа генов *EXT1* и *EXT2*. Разработка эффективных и дешевых способов ДНК-диагностики МЭХД затруднена большим числом мутаций, ответственных за МЭХД (*EXT1*>500, *EXT2*>350) [ClinVar <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> (Дата обновления 2.10.21), по <https://gnomad.broadinstitute.org/gnomAD>].

Наиболее частым вариантом являются мутации в генах *EXT*, которые отвечают не менее чем 90% всех случаев МЭХД [Федотов и др., 2015; Боголепова, Матюшевская, 2016]. К настоящему времени описаны 3 локуса генов (*EXT1*, *EXT2* и *EXT3*, картированные 8q24, 11p12 и 19p, соответственно). Мутации гена *EXT2* встречаются в 3 раза реже, чем в гене *EXT1*, для локуса *EXT3* известны лишь единичные описания [Лагунова И.Г., 1989; Чеснокова Г.Г., 1999]. Мутации в генах *EXT1*, *EXT2*, являющиеся молекулярно-генетической причиной МЭХД, были идентифицированы анализом генетической связи в хромосомах 8q24.1, 11p11-13 и 19p [Stickens D. et al., 1996; Чеснокова Г.Г., 1999; Lonie L. et al., 2006].

Ahn J. et. al. определили два основных района изменения, которые приводят к МЭХД: 8q24.11 и 11p11.2. В 1995 году в районе 8q24.1 был клонирован ген *EXT1*, кодирующая последовательность которого составила 2238 п.о. (746 аминокислот) [Ahn J. et. al., 1995; Чеснокова Г.Г., 1999].

Цитогенетическое расположение: 8q24.11 на длинном плече (Q) хромосомы 8 в положении 24.11 (Рисунок 3).

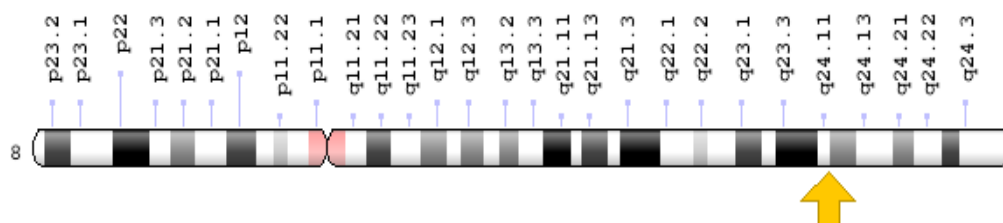


Рисунок 3 – Цитогенетическое расположение гена *EXT1* (8q24.11-q24.13)

Молекулярное расположение: пар оснований от 117797496 до 118111819 на хромосоме 8 (Homo sapiens Annotation Release 108, GRCh38.p7) (NCBI)) состоит из 11 экзонов (Рисунок 4), имеет длину 317364 п.о. Самыми длинными экзонами гена *EXT1* являются экзоны 1 и 11, имеют длину 1735 пар оснований и 534 пар оснований, соответственно. Мутации в этом гене вызывают множественный экзостоз I типа [Ahn J. et. al., 1995; Чеснокова Г.Г., 1999].



Рисунок 4 – Кодирующие области гена *EXT1*

Ген *EXT2* клонирован в 1996 году в районе 11p11.2, кодирующая последовательность 2154 пар оснований (718 аминокислот) [Ahn J. et al., 1995; Stickens D. et al., 1996; Чеснокова Г.Г., 1999; Faiyaz-Ul-Haque M. et al., 2004; Wu Y. et al., 2013].

Цитогенетическое расположение: 11p11.2 на коротком плече (p) хромосомы 11 в положении 11.2 (Рисунок 5).

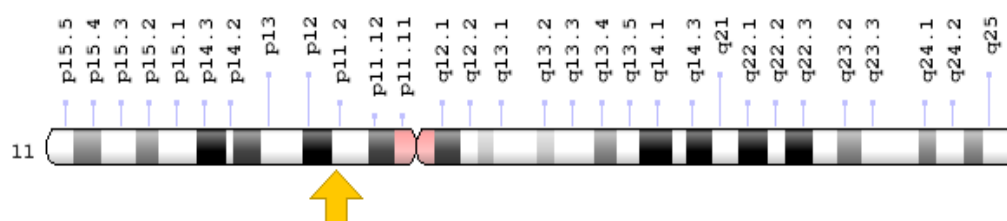


Рисунок 5 – Цитогенетическое расположение гена *EXT2* (11p12-p11)

Молекулярное расположение: 44095549 пар оснований к 44245430 на хромосоме 11 (Homo sapiens Annotation Release 108, GRCh38.p7) (NCBI) состоит из 14 экзонов (Рисунок 6), были отмечены альтернативно сплайсированные варианты транскрипта, кодирующие различные изоформы. Мутации в этом гене вызывают множественный экзостоз II типа [Ahn J. et. al., 1995; Чеснокова Г.Г., 1999].



Рисунок 6 – Кодированные области гена *EXT2*

Согласно базе данных <https://gnomad.broadinstitute.org/>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> описано более 500 вариантов в гене *EXT1* (OMIM 608177) из них патогенных около 300 (Рисунок 7), а в гене *EXT2* (OMIM 608210) известно более 350 вариантов, из них приблизительно 120 патогенные (Рисунок 8) [Шишкина Н.С. и др., 2004; Шавырин Д.А., 2014; Федотов В.П. и др., 2015].

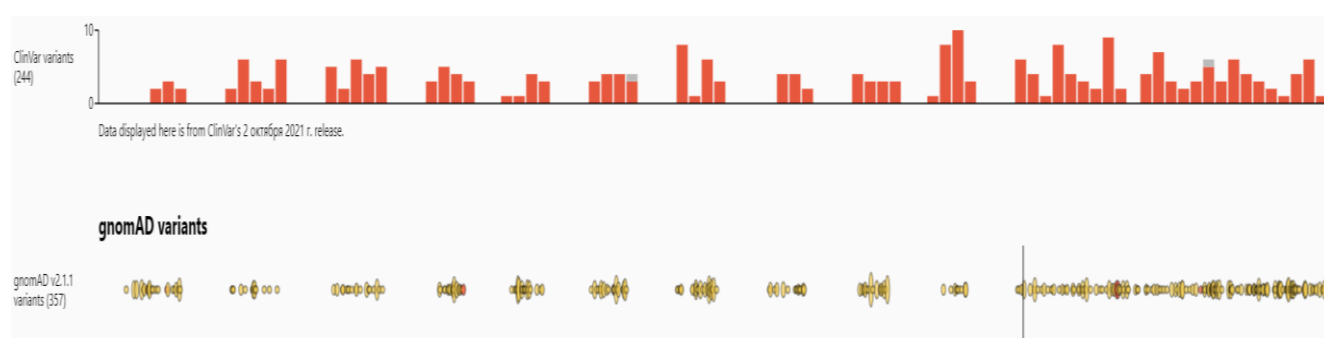


Рисунок 7 – По базе данных с агрегированными сведениями о геномах gnomAD. ■ – патогенные; ■ – вероятно патогенные варианты в гене *EXT1* по ClinVar (дата обновления 2.10.21)

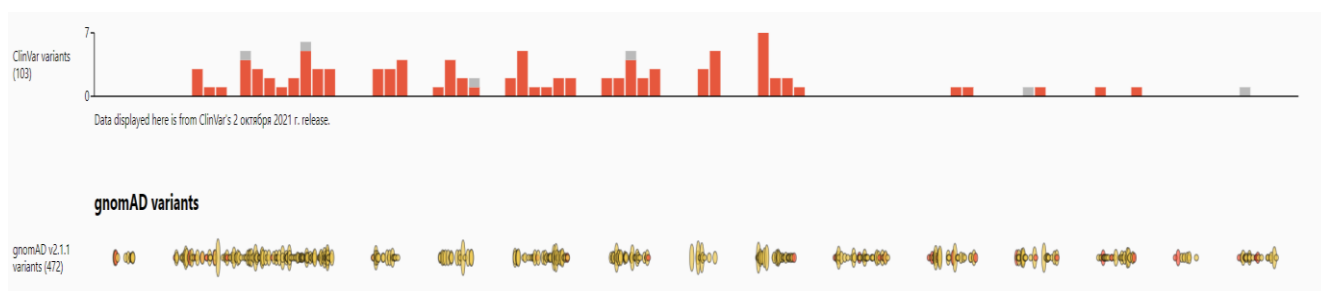


Рисунок 8 – По базе данных с агрегированными сведениями о геномах gnomAD. ■ – патогенные; ■ – вероятно патогенные варианты в гене *EXT2* по ClinVar (дата обновления 2.10.21), по gnomAD

Продукт генов принимает участие в экспрессии протеогликанов на поверхности клетки и в экстрацеллюлярном матриксе. Мутация гена приводит к снижению уровня гепарансульфата, образованию экзостозов, аномалиям эпифизов трубчатых костей, синдактилии [Hecht J.T. et al., 1997; Pacifici M., 2017].

1.2.5. Структура и функции белков EXT1/EXT2

Белки EXT1, EXT2 являются ферментами гликозилтрансферазы, образуют гетероолигомерный комплекс, катализируют транспортировку гликанов к субстрату, тем самым способствуя удлинению цепи гепарансульфатов. Мутации в генах *EXT1*, *EXT2* приводят к снижению уровня гепарансульфата, т. е. образуются не полноценные молекулы гепарансульфата с короткими углеводными цепями, не способными участвовать в проведении сигналов фактора роста, приводя к патологическому состоянию [Busse-Wicher M. et al., 2014; Goni O., 2021].

Гепарансульфаты (ГС) – неотъемлемые компоненты на клеточной поверхности и внеклеточного матрикса всех животных клеток, состоят из белкового кора и ковалентно связанных с ним уникальных сульфатированных углеводных цепей – гликозаминагликанов. Гликозаминагликаны построены из глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. ГС-цепи различаются в разных органах и типах клеток и изменяются в процессе развития и при патологии. Биосинтез углеводной цепи

представляет собой сложный процесс, в котором участвует серия ферментов: ферменты полимеризации цепи (EXT1 и EXT2) и ряд ферментов модификации цепи [Шевелев О.Б. и др., 2012; Busse-Wicher M. et al., 2014].

Удлинение цепей ГС происходит путем поочередного присоединения глюконовой кислоты и N-ацетилглюкозамин из соответствующих уридиндифосфат сахаров в комплексе EXT1/EXT2. Это трансмембранные белки II типа, расположенные в аппарате Гольджи и имеющие N-концевой цитоплазматический хвост, трансмембранный домен и большой глобулярный домен с ферментативной активностью (Рисунок 9) [McCormick C. et al., 2000].

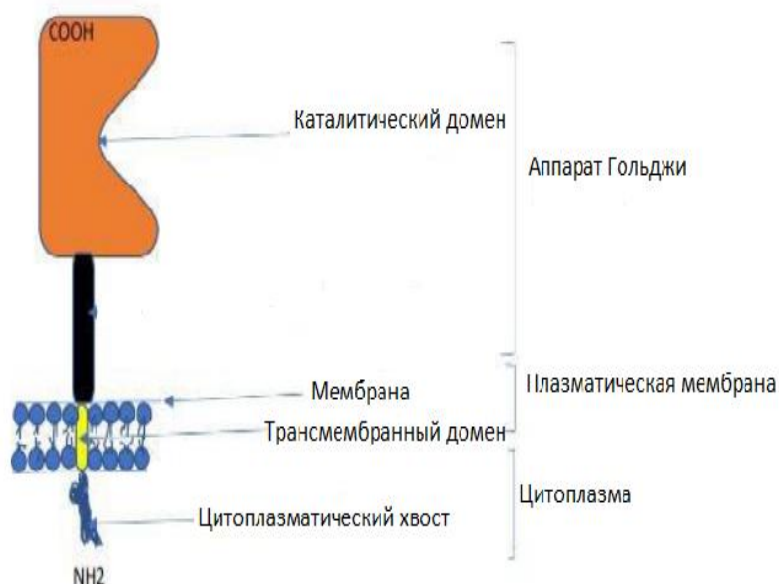


Рисунок 9 – схема строения трансмембранного белка II типа [McCormick C. et al., 2000]

Факторы роста для нормального функционирования должны связываться с гепарансульфатпротеогликанам. Полноценный синтез ГС возможен только при работе в комплексе белков EXT1/EXT2, при этом основную каталитическую функцию выполняет EXT1. Роль EXT2 не до конца ясна, но известно, что данный белок выполняет вспомогательные функции [Goni O., 2021].

Мутации в генах *EXT1*, *EXT2* приводят образованию костно-хрящевых экзостозов в метафизах трубчатых костей, аномалиям скелета и связаны с наследственным заболеванием МЭХД. Предполагается, что гены *EXT1* и *EXT2* являются генами-супрессорами канцерогенеза, так как установлено их участие при злокачественной трансформации хрящевой и костной ткани [Hecht J.T. et al., 1997; Чеснокова Г.Г., 1999; McCormick C. et al., 2000]. Мутации в генах *EXT1* и *EXT2* ответственны за преждевременную терминацию и потерю функции белков EXT [Kim S. et al., 2022].

На рисунке 10 представлены функциональные домены белков (Рисунок 10) [ebi.ac]. Мутации в доменах приводят к нарушению функции белка, снижая уровень ГС, что приводит образованию экзостозов [Hecht J.T. et al., 1997; Pacifici M., 2017].

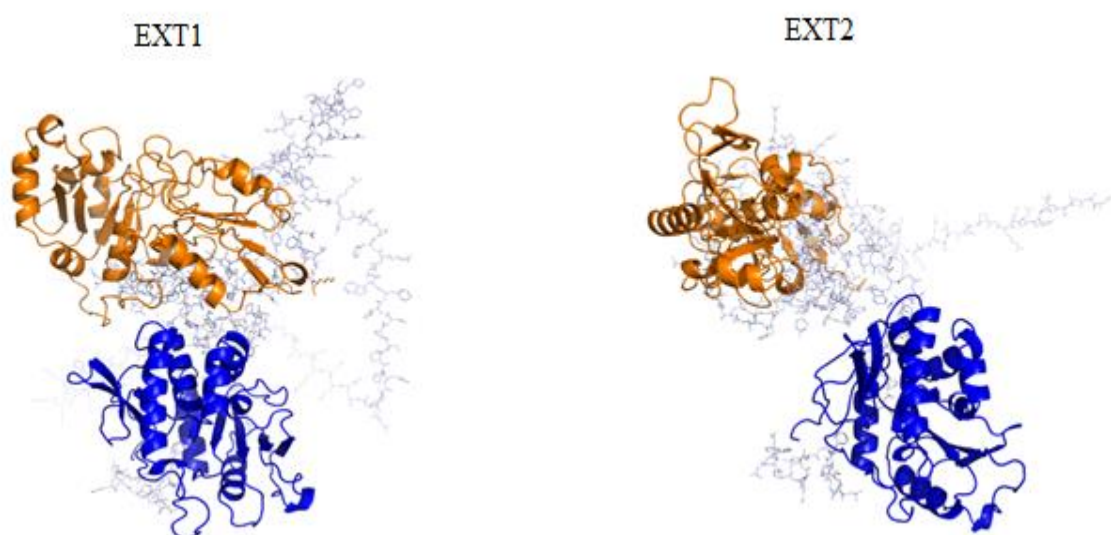


Рисунок 10 – Трехмерная структура белков EXT1, EXT2 с обозначением функциональных доменов (синим цветом домен Exostosin, Glycosyl transferase 47, оранжевым – Glycosyl transferase 64) [ebi.ac]

Вслед за самыми первыми исследованиями, в которых впервые установили генетическую причину МЭХД (мутации в генах в *EXT*) [Ahn J. et al., 1995; Cheung P.K. et al., 2001] и связь с синтезом гепарансульфатов, последующие работы дополнили данными о различных нонсенс, миссенс-мутациях и мутациях сайта сплайсинга в генах *EXT1* и *EXT2* у пациентов с МЭХД [Hecht J.T. et al., 1995; Jennes I. et

al., 2009; Zuntini M. et al., 2010]. По данным литературы известно, что мутации в гене *EXT1* связаны с более тяжелым фенотипом опорно-двигательного аппарата, что определяется количеством остеохондром, пораженных анатомических участков, деформаций и физических ограничений [Jennes I. et al., 2009; Zuntini M. et al., 2010; Clement N.D., Porter D.E., 2014]. Более серьезные последствия мутаций в гене *EXT1* по сравнению с мутациями в гене *EXT2*, вероятно, отражают тот факт, что белок EXT1 выполняет основную каталитическую функцию в полимеризации ГС, в то время как белок EXT2, тоже не менее важный, может играть структурную или поддерживающую роль в комплексах Гольджи EXT1/EXT2 [Busse-Wicher M. et al., 2014].

В Южной части Италии была изучена большая когорта больных с МЭХД. С помощью методов MLPA и CGH микрочипов было выявлено 66 мутаций и одна крупная делеция в гене *EXT2*. 20 мутаций, в том числе делеция в гене *EXT2*, ранее были не описаны. В соответствии с предыдущими исследованиями было обнаружено, что мутации в гене *EXT1* расположены на всем протяжении белкового остова, в то время как мутации в гене *EXT2* были более сосредоточены в направлении N-конца.

Известны более 90% случаев МЭХД, связанные с гетерозиготными мутациями в генах *EXT1* или *EXT2* [Ahn J. et al., 1995; Hecht J.T. et al., 1995; Wuyts W., Van Hul W., 2000; Cheung P.K. et al., 2001], которые кодируют резидентные гликозилтрансферазы в аппарате Гольджи, ответственные за синтез и сборку цепей ГС на белок синдеканов, глипиканов и других богатых гепарансульфатами протеогликанов [Wuyts W., Van Hul W., 2000; McCormick C. et al., 2000; Bishop J.R. et al., 2007]. Поскольку белки EXT1 и EXT2 организованы как комплекс и оба необходимы для синтеза ГС, гетерозиготные мутации любого гена *EXT* приводят к его системному дефициту примерно у 50% пациентов с МЭХД [Anower-E-Khuda M.F. et al., 2013]. Такой частичный дефицит может влиять на различные физиологические процессы и механизмы, включая липидный обмен и клиренс у пациентов [Moosj H.L. et al., 2015], но, по-видимому, недостаточен для запуска образования остеохондромы.

В соответствии с гипотезой Кнудсона об онкогенезе [Knudson A., 1971], образование остеохондромы при МЭХД требует «второго удара», дополнительного фактора влияния, который бы еще больше снизил уровень ГС, делая пораженные локальные клетки неспособными сохранять нормальный фенотип и превращая их в онкогенные клетки. Генетические исследования и анализ отдельных клеток показали, что потеря гетерозиготности (LOH), анеуплоидия или другие изменения могут возникать в остеохондромах человека, что приводит к полному отсутствию белков EXT1- или EXT2 в соседних клетках [Bovee J.V. et al., 1999; Bernard M.A. et al., 2001; Hameetman L. et al., 2007; Reijnders C.M.A. et al., 2010]. Параллельные исследования других авторов описали пациентов с альтернативными генетическими изменениями, включая сложные гетерозиготные мутации в генах *EXT1* и *EXT2* [Hall C.M. et al., 2002; Jennes I. et al., 2009; Zuntini M. et al., 2010]. Такие расходящиеся генетические сценарии и возможные вытекающие из них патогенные механизмы у пациентов хорошо коррелируют с исследованиями на мышах, которые проводились в течение последних нескольких лет. Было обнаружено, что одиночные гетерозиготные мутантные мыши *EXT1*+/- или *EXT2*+/- в значительной степени имеют нормальный фенотип [Stickens D. et al., 2005; Zak B.M. et al., 2011], что подтверждает гипотезу о том, что одиночные гетерозиготные мутации в генах *EXT* недостаточны для запуска МЭХД. Однако сложные гетерозиготные *EXT1*+/-; *EXT2*+/- мутантные мыши и условные *EXT1*- нулевые мыши (обе производят гораздо меньше ГС, чем одиночные гетерозиготные мыши в пораженных тканях) действительно демонстрировали МО и имитировали человеческий фенотип МЭХД во многих отношениях. [Jones K.B. et al., 2010; Matsumoto K. et al., 2010; Zak B.M. et al., 2011; Sgariglia F. et al., 2013].

Таким образом, формирование остеохондромы требует второго «генетического события» и значительного снижения, но не обязательно полной потери ГС. В отличие от гликозаминогликанов, таких как гиалуронат, цепи ГС представляют собой чрезвычайно сложные макромолекулы [Wuyts W., Van Hul W., 2000; Bishop J.R. et al., 2007; Sarrazin S. et al., 2011]. Во время опосредованной EXT1/EXT2 полимеризации цепи ГС на остатках серина вдоль основного белка протеогликана цепи

претерпевают одновременный ряд модификаций и реакций, осуществляемых большим набором ферментов, что приводит к деацетилированию N-ацетилглюкозамина и N-сульфатированию, эпитеризации глюкуроновой кислоты в идуроновую кислоту и осульфатирование в положениях C2, C3 или C6 остатков глюкозамина [Wuyts W., Van Hul W., 2000; Bishop J.R. et al., 2007; Sarrazin S. et al., 2011]. Эти согласованные процессы производят цепи с уникальными паттернами сульфатирования и модификаций сахаров в сегментах длиной от 6 до 12 сахарных остатков, окруженных сегментами в основном немодифицированными и несульфатированными сахарами [Sarrazin S. et al., 2011], таким образом, выявляя значительную степень структурной гетерогенности и уникальности среди цепей ГС. Дальнейшее развитие цепей может происходить на поверхности клетки, где эндосульфатазы SULF1 и SULF2 могут удалять определенные сульфатные группы [Dhoot G.K. et al., 2001; Morimoto-Tomita M. et al., 2002].

Поскольку внутриклеточные ферменты и ферменты, модифицирующие клеточную поверхность, экспрессируются тканеспецифическим образом, общий выход и структура цепей ГС могут различаться в разных тканях и клетках [Sarrazin S. et al., 2011]. Исследования показали, что цепи ГС и протеоглики, частью которых они являются, выполняют большое количество онтогенетических и физиологических функций [Bernard M.A. et al., 2001; Sarrazin S. et al., 2011]. Заметной и важной является их способность взаимодействовать с ключевыми сигнальными белками, включая представителей семейства факторов роста фибробластов (FGF), костных морфогенетических белков (BMP), а также регулировать распределение белков, диффузию, биодоступность и действие на целевые клетки и ткани [Lin X., 2004; Xu D., Esko J.D., 2014; Billings P.C., Pacifici M., 2015]. Все сигнальные белки имеют специфический связывающий ГС домен [Lin X., 2004; Xu D., Esko J.D., 2014; Billings P.C., Pacifici M., 2015]. Примечательно, что первоначально было показано, что дефицит ГС вызывает широкое распространение и неуправляемую активность гомолога индийского ежа, (ИНН) в пластинках роста длинных костей мыши [Koziel L. et al., 2004]. Более поздние исследования, проведенные на мышинной модели

МЭХД, показали, что условная абляция *EXT1* приводила к широкой и эктопической канонической передаче сигналов ВМР в надхрящнице вдоль пластинок роста длинных костей, за которыми следует эктопический хондрогенез и остеохондромоподобное развитие, таким образом связывая избыточную передачу сигналов ВМР и к образованию остеохондромы [Huegel J. et al., 2013]. Приведенные выше результаты исследований ясно показывают, что последние несколько десятилетий целенаправленной работы по МЭХД и гепарансульфата позволили получить фундаментальное представление о множестве важных процессов и механизмов, имеющих отношение к патофизиологии заболевания и развитию остеохондромы.

Наиболее явным симптомом и распространенным осложнением МЭХД являются остеохондромы, и большинство исследований направлены именно на них. Остеохондромы развиваются с формирования эктопического росткового хряща, ориентированного примерно под углом 90° по отношению к соседним эндогенным хрящевым пластинкам роста. Эктопические хрящевые массы со временем удлиняются, подвергаются окостенению в проксимальной части и дистально сохраняют хрящевой колпачок, даже когда общий рост прекращается. Первоначально считалось, что остеохондромы происходят из хондроцитов пластинки роста, расположенных вдоль границы с надхрящницей, как было описано ранее [Anower-E-Khuda M.F. et al., 2013]. Было предположено, что вместо этого остеохондромы происходят из клеток-предшественников, расположенных во внутреннем слое надхрящницы [Huegel J., Mundy C. et al., 2013; Huegel J., Sgariglia F. et al., 2013], и многие исследования свидетельствуют о том, что такой слой является хранилищем клеток-предшественников, обычно участвующих в латеральном аппозиционном росте или восстановлении тканей [Ishimaru D. et al., 2016].

В совокупности вышеупомянутые исследования подтверждают тот факт, что большинство случаев МЭХД связано с гетерозиготными мутациями в генах *EXT* и чаще всего с мутациями в гене *EXT1*, независимо от конкретной популяции мира. Также весьма загадочным является тот факт, что вместо того, чтобы концентрироваться на горячих точках, мутации гена *EXT1* разбросаны по всей кодирующей области и продолжают расти, создавая еще больше вопросов касательно воздействия

каждой взятой мутации – и особенно миссенс-мутаций – на структуру и функцию белка, и как различные типы клеток и тканей будут реагировать на каждую мутацию. Также остается открытым вопрос о том, как та или иная мутация в генах *EXT* будь она врожденной или *de novo* будет взаимодействовать со «вторым» генетическим фактором, необходимым для запуска клеточной трансформации скелетогенных клеток и образования остеохондром. В зависимости от характера того «второго фактора», первичная мутация в генах *EXT* может предположительно давать разный исход с точки зрения характера течения и тяжести МЭХД, а также озлокачествления остеохондром. На сегодняшний день наиболее информативными являются исследования касательно ЛОН-потери гетерозиготности при остеохондромах человека [Bovee J.V. et al., 1999; Bernard M.A. et al., 2001; Nameetman L. et al., 2007; Reijnders C.M.A. et al., 2010], но исследования на мышах показали, что, как и *EXT*-нулевые мыши, компаунд гетерозиготные *EXT1*+/-; *EXT2*+/- мыши также развиваются остеохондромы и МЭХД-подобный фенотип [Zak B.M. et al., 2011]. Таким образом, следует вопрос: достаточно ли то, что имеется компаунд-гетерозиготность мутации в генах *EXT1* и *EXT2* для развития остеохондромы у пациентов или все же есть необходимость наличия еще дополнительных факторов, например, ЛОН-потери гетерозиготности? Важно отметить, что в целом ЛОН наблюдается достаточно часто в митотически активных тканях и, конечно, носит случайный характер [Knudson A.G., 1996; Joseph C.G. et al., 2014]. Могут клетки в тканях и органах, кроме зоны роста и надхрящницы, подвергаться потере гетерозиготности или иметь иной другой вторичный фактор воздействия у пациентов с МЭХД? Могут ли эти мутантные клетки вести себя аномально и вызывать другие симптомы и проявления болезни? В частности, японскими исследователями было показано, что гомозиготная абляция *EXT1* в постнатальных нейронах вызывает симптомы аутизма у мышей [Irie F. et al., 2012].

Были проведены популяционные исследования в разных регионах мира. Ишимару и др. проанализировали 112 пациентов в 71 семье с МЭХД в Японии с использованием ПЦР анализа [Ishimaru D. et al., 2016]. Авторы идентифицировали мутации в генах *EXT1* или *EXT2* только в 47 семьях (около 65% от общего числа),

в то время как у остальных семей не были обнаружены. Мутации в гене *EXT1* были более распространены, чем в гене *EXT2*, и 22 из 52 мутаций были новыми, ранее не описанными. Интересным был тот факт, что у нескольких семей (3/71) обнаружены гетерозиготные мутации как в гене *EXT1*, так и в гене *EXT2*, что подтверждает появление этого относительно редкого генотипа, что впервые было сообщено в предыдущих исследованиях [Jennes I. et al., 2009; Zuntini M. et al., 2010]. Наиболее распространенными были мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания, нон-сенс мутации и мутации сайта сплайсинга, в то время как около 40% были миссенс-мутациями.

В контексте существования дополнительного «фактора влияния» есть мнение, что не все выявленные мутации в генах *EXT* являются патогенными, а могут быть вариантами нормы. Одной из исследовательских групп были смоделированы *in silico* модели влияния некоторых миссенс-мутаций в гене *EXT1* на структуру белка и его функции и вклад в патогенез [Ciavarella M. et al., 2013], в данном исследовании были проанализированы (были рассмотрены именно данные от здоровых индивидов) Exome Aggregation Consortium (ExAC) [Lek M. et al., 2016], в котором хранится информация о всех последовательностях белок кодирующих участков генома от более чем 60 000 представителей различных народов Европы, Азии, африканских и латиноамериканских популяций. В результате данной работы было выявлено, что 6 миссенс-мутаций в гене *EXT1* и 4 миссенс-мутации в гене *EXT2* были ранее описаны у пациентов с МЭХД, предполагая, что эти варианты возможно были ошибочно классифицированы как патогенные мутации или недостаточно пенетрантны.

Сейчас становится понятен тот факт, что МЭХД – это не просто заболевание опорно-двигательного аппарата. Его повсеместный, прогрессивный и агрессивный характер и его воздействие на ряд тканей и процессов может иметь более негативные последствия для здоровья, благополучия, социальной адаптации больного, требующие раннего вмешательства при определенных симптомах до их ухудшения.

Исследования и идеи в этой области дадут целостное понимание того, как именно такие генетические изменения, за которыми следует падение уровня ГС,

нарушают фенотип скелетогенных клеток; какие белки ответственны за сигнальные пути в его формировании; какие дополнительные могут быть задействованы механизмы; почему пораженные гепарансульфат-дефицитные клетки теряют свои нормальные функции и потенциал дифференциации; и как они превращаются в опухолевые клетки, способные даже рекрутировать нормальные окружающие клетки в рост опухоли. И наконец, что важно, до сих пор неизвестно, можно ли образование остеохондромы затормозить, предотвратить или даже обратить, вследствие чего дефицит ГС может быть восполнен обратно.

Некоторые положительные события были продемонстрированы в недавних исследованиях на мышах [Matsumoto K. et al., 2010; Huegel J. et al., 2015]. В данной работе убедительно показали, что остеохондромы происходят из перихондриальных клеток и что, как правило, основная функция EXT1/ГС в надхрящнице предназначена для сдерживания и ограничения передачи сигналов BMP (костный морфогенетический белок), основного хондрогенного пути [Salazar V.S. et al., 2016]. Таким образом, аналогичная чрезмерная передача сигналов BMP может иметь место при МЭХД как следствие значительных локальных снижений экспрессии EXT и уровня гепарансульфата. Примечательно, что ГС ответственен также за передачу сигналов FGF (фактора роста фибробластов) и является основным антихондрогенным фактором, который экспрессируется в некоторых нехрящевых тканях, включая надхрящницы [Buckland R.A. et al., 1998; Yoon B.S. et al., 2006; Ornitz D.M., Marie P.J., 2015]. Таким образом, при повышении сигнализации BMP, дефицит гепарансульфата в МЭХД может ослабить сигнализацию FGF и тем самым воздействовать на фенотип перихондриальных клеток, вызывающих в свою очередь эктопический хондрогенез и, как следствие, развитие остеохондромы. Вмешательство на хондрогенез через воздействие на сигнализацию BMP или FGF может быть перспективным, так как он и является самым первым этапом в формировании остеохондромы. Формальные доказательства эффективности таких предполагаемых методов лечения в моделях МЭХД на животных по-прежнему не хватает, но, учитывая все достижения в этой области в скором времени какие-то способы уже будут находиться на стадии клинических испытаний.

1.2.6. Генотип-фенотипические исследования множественной экзостозной хондродисплазии в мировых популяциях

Несмотря на большое количество исследований, до сих пор не существует общепринятой системы оценки и классификации тяжести заболевания у больных с МЭХД [Alvarez C.M. et al., 2007], а также четкой и надежной корреляции генотип-фенотипа [Alvarez C. et al., 2006; Pedrini E. et al., 2011]. Такие трудности могут быть связаны с тем, что клинически МЭХД сильно варьирует даже у членов семьи, имеющих общую мутацию, и среди неродственных пациентов с одной и той же мутацией [Pedrini E. et al., 2011], что затрудняет оценку и установление тяжести и течения заболевания и повышается вероятность того, что генетическая предыстория и гетерогенная природа имеют большое влияние на развитие МЭХД.

Аналогичные исследования были проведены также в Испании. Было проанализировано 39 неродственных больных с клиническим диагнозом МЭХД. В данном исследовании мутации в генах *EXT1* или *EXT2* были в гетерозиготном состоянии в 95% случаев, и подавляющее большинство мутаций было в гене *EXT1* (74%), из которых 18 мутаций были новыми. Пять мутаций в гене *EXT1* были делециями, которые были идентифицированы методом MLPA. У двух пациентов одновременно были найдены мутации как в гене *EXT1*, так и в гене *EXT2*. Интересно, что у пациентов с миссенс-мутациями при поступлении наблюдалось меньшее количество остеохондром по сравнению с пациентами с другими типами мутаций, включая нонсенс и сдвиг рамки считывания, что говорит о том, что возможно миссенс-мутации менее патогенны. Дополнительным интересным открытием было то, что у пациентов с мутациями в гене *EXT2* фенотип был ярче выражен, чем у пациентов с мутациями в гене *EXT1*. Но тем не менее авторы отмечают, что эта разница, вероятно, была связана с небольшим числом обследованных пациентов [Sartion P. et al., 2013].

Также было проведено генотип-фенотип исследование у 46 китайских пациентов (33 мужчины, 13 женщин) с МЭХД, где использовали балльную систему для оценки тяжести клинического фенотипа, чем выше балл, тем тяжелее фенотип. В результате исследования обнаружили, что у пациентов с мутациями в гене *EXT1*

был низкий рост, чем у пациентов с мутациями в гене *EXT2*. Существенных различий между другими параметрами клинической картины не обнаружили. Однако пациенты с мутациями в гене *EXT1* имели более тяжелый клинический фенотип по сравнению с пациентами с мутациями в гене *EXT2* [Li Y. et al., 2017].

S. Kim соавторами исследовали 43 корейских пациента из 30 семей. Согласно балльной оценке, разработанной авторами, тяжесть фенотипа оценивали, как умеренную и тяжелую, в зависимости от деформации костей, количества экзостозов, с укорочениями и ограничениями подвижности конечностей. Ученые в своих исследованиях сообщают, что степень деформации костей является важным фактором в определении фенотипа у больных с МЭХД и обнаружили, что пациенты с мутациями в гене *EXT1* приводят к тяжелому клиническому фенотипу [Kim S. et al., 2022].

N. D. Clement, D. E. Porter сообщают в своем исследовании о 143 пациентах из 65 семей (76 женщин, 67 мужчин) с МЭХД, где распределили больных по количеству экзостозов в зависимости от локализации. Выявили мутации в гене *EXT1* у 71, в гене *EXT2* – 72. В результате обнаружили, что пациенты с генотипом в *EXT1* имели значительно больше экзостозов по сравнению с пациентами с генотипом *EXT2*, однако это отличалось только для 10 из 19 исследованных локализаций. Пациенты мужского пола с мутациями в гене *EXT1* имели значительно большее число экзостозов на кистях рук, лучевой кости, плечевой кости, лопатки и ребер по сравнению с пациентами женского пола с мутациями в гене *EXT1* и мужчин с мутациями в гене *EXT2*. Количество экзостозов во всех анатомических областях коррелирует с общим числом экзостозов, при этом кисти рук, лопатка, малоберцовая кость имели самый высокий коэффициент корреляции. Наибольшая доля экзостозов приходится на кисти рук [Clement N.D., Porter D.E., 2014].

Проведено исследование генотип-фенотип корреляции 529 пациентов с МЭХД из двух европейских центров. Фенотип пациентов оценивался как легкий при отсутствии деформаций и тяжелый при наличии деформаций и функциональных ограничений. Из 529 у 478 пациентов обнаружили мутации в гене *EXT1* (72%), в гене *EXT2* (28%). Большинство мутаций приводит к преждевременному усечению белка, как сообщалось выше, наиболее тяжелые клинические формы связывают с

мутациями в гене *EXT1*. У 51 (9,6%) пациента не выявлено мутации в генах *EXT1*, *EXT2* и фенотип у них был умеренный, легкий. Отсутствие мутаций в генах *EXT* объясняют тем, что может быть наличие мозаичных мутаций [Pedrini E. et al., 2011].

D. E. Porter и др. провели проспективное генотип-фенотип исследование у 172 пациентов (78 семей) с МЭХД с использованием молекулярного скрининга и клинической оценки с целью сравнить тяжесть заболевания и риск развития саркомы. Отмечали широкую вариабельность тяжести заболевания. У детей в возрасте до 10 лет было меньше экзостозов, тяжесть заболевания также различалась от пола пациента. Носители мутации в гене *EXT1* имели значительно тяжелую форму, но саркома развилась у одного пациента с мутацией в гене *EXT2*. Результаты исследования подтвердили пенетрантность заболевания в зависимости от возраста пациента [Porter D.E. et al., 2004].

При исследовании немецкими учеными генотип-фенотип корреляции 52 пациентов с МЭХД из 19 семей обнаружены мутации в гене *EXT1* у 19 пациентов, в гене *EXT2* – у 14. Распределение пациентов провели по возрасту и по тяжести клинических проявлений. Из общего числа экзостозов в 47,1% обнаружены в верхней части тела, 52,9% – на нижней, у 22 (42%) пациентов было выявлено до 10 экзостозов (легкая форма), у 30 (58%) – более 10 экзостозов (тяжелая форма). Установлено, что у пациентов старше 16 лет небольшой избыточный вес и у 77% больных экзостозы чаще локализуются на правой части тела. Также обнаружили значительное укорочение верхних конечностей. У всех 52 пациентов наблюдалось ограничение подвижности суставов, у 61,5% проведено оперативное вмешательство. Пациенты с мутациями в гене *EXT1* имели сравнительно низкий рост, чем пациенты с мутациями в гене *EXT2* [Jager M. et al., 2007].

Проспективно обследовано 79 пациентов с МЭХД из 39 семей (женщин – 39, мужчин – 40). Средний возраст на момент исследования составлял 23,7 года. Выявили мутации в генах *EXT1*, *EXT2* у 48 пациентов, 18 мутаций в гене *EXT1*, 30 в гене *EXT2*. В результате исследования обнаружили значительные различия в росте, как и в предыдущих исследованиях у пациентов с мутациями в гене *EXT1* рост был

ниже, чем у пациентов с мутациями в гене *EXT2*. Выраженную клиническую картину также, как и в предыдущих исследованиях, наблюдали у пациентов с генотипом *EXT1* [Alvarez C.M. et al., 2007].

По результатам анализа литературных данных, можно сделать заключение о том, что изучение генотип-фенотип корреляций при МЭХД остается актуальной задачей. Наиболее тяжелое течение МЭХД наблюдается при мутациях в гене *EXT1*. Авторы отмечают, что клинические проявления могут заметно отличаться даже внутри семей, например, у sibсов. Спектр клинических проявлений может варьировать от малого числа экзостозов небольшого размера до ограничения подвижности суставов и развития злокачественных новообразований. Обсуждаемые различия в степени проявления клинических симптомов в основном связывают с поражаемыми генами и половой принадлежностью больных. Несмотря на то, что тяжесть клинического течения МЭХД в настоящее время не имеет общепринятой системы оценки, многие авторы согласуются в использовании раннего (до 3-х лет) возраста манифестации, вывиха суставов, злокачественного перерождения экзостозов, деформации и укорочения костей в качестве признаков тяжёлого течения болезни.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования

Ретроспективное обсервационное исследование

1. Работа с данными Регистра наследственной и врожденной патологии МГЦ РБ №1-НЦМ.
2. Изучение генетических карт больных с МЭХД.
3. Анализ данных инструментальных исследований: рентгенологические снимки, УЗИ.
4. Отбор больных с клинически верифицированным диагнозом, анализ семейных случаев, составление генеалогических карт.



Исследование «случай-контроль»

1. Составление группы исследования («случай»):
 - а) больные с МЭХД, с клинически верифицированным диагнозом, подтвержденным результатами инструментальных исследований;
 - б) семейные случаи МЭХД.
2. Составление группы сравнения («контроль»):
 - а) здоровые родственники больных с МЭХД, с клинически исключенным диагнозом



Методы исследования

1. Молекулярно-генетические исследования образцов ДНК:
 - а) секвенирование клинического экзона;
 - б) секвенирование по Сэнгеру.
2. Клинико-генеалогический анализ семейных случаев заболевания.
3. Анализ генотип-фенотипических корреляций у больных с установленными молекулярно-генетическими причинами МЭХД (с патологическими вариантами генов *EXT1*, *EXT2*).
4. Статистический анализ данных: критерий χ^2 Пирсона, отношение шансов, бинарная логистическая регрессия.

2.2. Материалы исследования

Данные о больных получены из «Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии» МГЦ РБ №1-НЦМ. Основными критериями служили фенотипические признаки, наличие экзостозов и выставленный врачами клинический диагноз «экзостозная болезнь» [Козлова С.И. и др., 1996; <https://www.omim.org/> – OMIM].

Для эпидемиологического и клинико-генеалогического анализа в работе использована информация о 85 больных с МЭХД из 41 семьи. Для проведения молекулярно-генетических исследований были использованы образцы биоматериала пробандов из 31 семьи, в том числе 57 больных и 11 здоровых родственников (Таблица 3).

Таблица 3 – Характеристика и численность выборки включенных в клинико-генеалогический и молекулярно-генетический анализ

Группа	Количество человек	Количество ДНК
<i>Семей с МЭХД</i>	<i>41</i>	<i>31</i>
Больные с МЭХД	85	57
Здоровые родственники	11	11
Всего	96	68

Работа была одобрена локальным комитетом по биомедицинской этике Медицинского института ФГАОУ ВО «СВФУ им. М.К. Аммосова» (г. Якутск, протокол №8 от 11 ноября 2016 г.) (Приложение А).

2.3. Клинико-генеалогическая характеристика больных с множественной экзостозной хондродисплазией

Информация о больных с МЭХД была собрана из Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии РС (Я), на базе МГЦ РБ №1-НЦМ РС (Я). Дополнительные сведения получены в ходе экспедиционных выездов для обследования населения улусов.

В регистре на диспансерном учете состоят 85 больных с МЭХД из 41 семьи. Из них 70 больных из 33 якутских семей, 8 больных из 5 русских семей, 5 из 1 эвенкийской семьи и по 1 случаю из татарской и украинской семей. Заболевание зарегистрировано в 17 улусах и в г. Якутске из 35 административно-территориальных единиц РС (Я). Распространенность МЭХД была рассчитана как по Республике в целом, так и по отдельным улусам, и этническим группам, исходя из численности

населения по данным Всероссийской переписи 2010 г.
[<https://sakha.gks.ru/ofstatistics>].

Клиническое обследование пробандов и их родственников осуществлялось совместно с врачом-генетиком на базе МГЦ РБ №1-НЦМ и в ходе экспедиционных выездов в улусы. От всех исследуемых индивидов было получено информированное добровольное согласие (Приложение Б).

Обследование больных и их родственников начиналось с осмотра врача-генетика, где основными критериями диагностики служили фенотипические признаки, наличие множественных экзостозов, заполняли специально составленный нами протокол для каждого отдельного больного и его родственников (Приложение В), включающего анамнез заболевания, сроки проявления признаков заболевания, данные функциональных и инструментальных методов исследований, генеалогическую карту.

В клинко-генеалогическое исследование включены 85 больных и их родственников с МЭХД из 41 неродственной семьи. Составлены родословные 41 неродственной семьи, отягощенных МЭХД в 2–4 поколениях (Приложение Таблица Г.1). Генеалогические карты составлялись из данных медицинских карт и со слов больных и их родственников. На основании результатов клинического обследования врача-генетика были разработаны критерии, позволяющие условно разделить клиническую картину на 2 формы – выраженную и умеренную (Таблица 4).

Деление проводили в зависимости от степени клинических проявлений и исходов (см. раздел 1.2.6.) [Jager M. et al., 2007; Pedrini E. et al., 2011; Kim S. et al., 2022].

Таблица 4 – Оценка тяжести клинического течения (фенотипа)

Фенотип / Клиническая форма	Выраженная	Умеренная
Ограничение подвижности верхних конечностей	+	-
Ограничение подвижности нижних конечностей	+	-
Деформация конечностей	+	-
Укорочение конечностей	+	-
Хирургическое лечение	+	-
Трудности при ходьбе	+	-
Инвалидность	+	-

2.4. Молекулярно-генетические методы исследования

Молекулярно-генетическая часть работы выполнялась на базе МГЦ РБ №1-НЦМ и в научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная медицина и генетика человека» медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова».

Для верификации диагноза использовались молекулярно-генетические методы исследования с использованием массового параллельного секвенирования (МПС) и прямого секвенирования по Сэнгеру.

В совокупности были исследованы образцы геномной ДНК 68 индивидов, 57 из которых больные с МЭХД и 11 здоровых родственников.

В целях поиска возможных мутаций, приводящих к МЭХД, нами проанализированы образцы геномной ДНК, полученные из лейкоцитов, периферической крови. Забор периферической крови условно здоровых индивидов и больных множественной экзостозной хондродисплазией был осуществлен из локтевой вены в строго стерильных условиях. Забор периферической крови проводился в вакуумную пробирку VACUETTE (10 мл), содержащую в качестве антикоагулянта К3-EDTA («Greiner Bio-One», Австрия). Пробирки с кровью транспортировали в контейнерах со льдом и хранили в морозильнике при -20 °С. Все индивиды состоят на диспансерном учете в МГЦ РБ №1-НЦМ РС (Я).

2.4.1. Выделение геномной ДНК

Выделение ДНК из периферической крови было проведено стандартным методом из цельной крови методом фенол-хлороформной экстракции [Maniatis T. et al., 1982].

Метод фенол-хлороформной экстракции позволяет получать образцы ДНК больших концентраций, которые можно хранить в течение длительного времени в замороженном виде. В работе был использован следующий протокол выделения ДНК (в 3 этапа):

1) По 5 мл крови от каждого пациента помещаем в пробирки по 10 мл и смешиваем с сахарозным буфером (5 мл, состав буфера: 0,32М сахарозы, 5мМ $MgCl_2$,

0,01M Tris-HCl (гидроксиметиламинометан), pH 7,6). Добавляем сахарозный буфер с целью лизирования эритроцитов и клеточной мембраны лимфоцитов. Для осаждения лейкоцитов образец центрифугируем при 3000 об/мин при 4 °C в течении 20 мин. Раствор над осадком сливаем, еще раз добавляем 5 мл сахарозного буфера и центрифугируем при 3000 об/мин в течение 10 мин. Далее раствор над осадком сливаем и ресуспендируем осадок в 200-250 мкл буфера для протеиназы К (состав буфера: 10 mM Tris-HCl, pH 10,5, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA (этилендиаминтетраацетата натрия), pH 8,0). Затем осадок переносим в эппендорф объемом 0,5 мл и добавляем 20 мкл 10% SDS до конечной концентрации 0,5%. При добавлении SDS происходит лизис ядерной мембраны, ДНК выходит из ядра. Затем добавляем 20 мкл маточного раствора протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл, инкубируем в течении 12 ч при 37 °C.

2) После инкубации добавляем 500 мкл фенола водонасыщенного. Осторожно перемешиваем в течение 20 мин и центрифугируем 10 мин при 5000 об/мин. После разделения фаз ДНК находится в верхней водной фазе, РНК – фенольной фазе, белки на интерфазе. Верхнюю водную фазу переносим в другую чистую пробирку и добавляем по 250 мкл фенола и хлороформа. Перемешиваем в течение 20 мин и центрифугируем 10 мин при 5000 об/мин. Вторично верхнюю фазу переносим в другую пробирку и добавляем 500 мкл хлороформа. Перемешиваем в течение 5 мин и центрифугируем 10 мин при 5000 об/мин. Третий раз верхнюю фазу переносим в другую пробирку, и к ДНК добавляем по 50 мкл раствора ацетата натрия и охлажденного 98% этилового спирта. Осторожно перемешиваем, наблюдаем осаждение ДНК, и оставляем на ночь в морозильнике при -20 °C.

3) Пробирку с ДНК центрифугируем в течение 10 мин при 10000 об/мин, спирт сливаем – на дне пробирки останется осадок с ДНК. Для удаления солей промываем осадок 1 мл 70% этанола. Повторно центрифугируем при 10000 об/мин в течение 5 мин, сливаем спирт и высушиваем осадок при комнатной температуре, затем растворяем ДНК в деионизованной воде.

Концентрация и чистота выделения ДНК была определена измерением оптической плотности полученного раствора спектрофотометром Nanodrop ND-1000

(«Thermo Fisher Scientific», США). Для хорошо выделенного образца ДНК отношение ОП (260)/ОП (280) должно быть не менее 1,8–2,0. Более высокие значения указывают на наличие РНК, более низкие – на загрязнение белком.

Образцы выделенной ДНК были помещены в специальные криохранилища на -80 °С (низкотемпературные вертикальные морозильники Forma 900 от -50 °С до -86 °С, «Thermo Fisher Scientific», США).

2.4.2. Метод прямого секвенирования по Сэнгеру

На начальном этапе была проведена работа по дизайну праймеров для прямого секвенирования по Сэнгеру генов *EXT1*, *EXT2*. Референсная последовательность генов *EXT1*, *EXT2* была определена с использованием геномного браузера UCSC (Университет Санта-Круз, США). Номер геномной сборки: Genome Reference Consortium Human GRCh38 (GCA_000001405.15) Primer Designing Tool-2017. Последовательности праймеров к кодирующей последовательности генов *EXT1*, *EXT2* были подобраны с использованием программы NCBI/Primer-BLAST Primer Designing Tool-2017 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>]. Праймеры были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Москва) (Приложение Таблица Д.1, Д.2).

Прямое секвенирование по Сэнгеру генов *EXT1*, *EXT2* было проведено в несколько этапов.

Этап 1 (проведение полимеразной цепной реакции):

Фланкирующие интронные области подвергли ПЦР-амплификации. ПЦР проводили в амплификаторах S1000, C1000 («BioRad», США). Реакционная смесь в объеме 15 мкл содержала 0,4 мкМ Taq-ДНК полимеразы (Thermo Scientific, Taq DNA Polymerase), по 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров, 0,25 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 25 мМ MgCl₂, бетаин, деионизованную воду, 90–100 нг геномной ДНК. Реакционный буфер прилагался к ДНК-полимеразе и содержал 60 мМ Tris-HCl (pH 8,5 при 25°C), 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 0,1% Тритона X-100.

Режим термоциклирования зависел от состава праймеров и длины амплифицируемого фрагмента и рассчитывался с использованием программы «Primer Premier 5» («Premier Biosoft International», USA).

Условия термоциклирования ПЦР, следующие:

95° С – 3 мин.

95°С – 30 сек.

57°–70° С – 30 сек. } 34–40 циклов

72° С – 1 мин.

72° С – 5 мин.

4° С – ∞.

Этап 2 (проведение электрофореза в агарозном геле):

Продукты амплификации анализировали на электрофорезе в 2,5% агарозном геле (ООО «Медиген», Новосибирск), приготовленном на трис-ацетатном буфере (ТАЕ), при напряжении 150В, 250 ампер в течение 25 минут. Источник питания PowerPack Basic («BioRad», США). В качестве маркера молекулярного веса использовали гидролизат плазмиды pUC19, полученный при расщеплении рестриктазой Msp I (НПО «СибЭнзим»). Продукты амплификации визуализировали в ультрафиолетовом свете, молекулярный вес фрагментов оценивали с помощью системы идентификации образцов, содержащих биополимеры GelDoc XR PLUS («BioRad», США) (Рисунок 11).

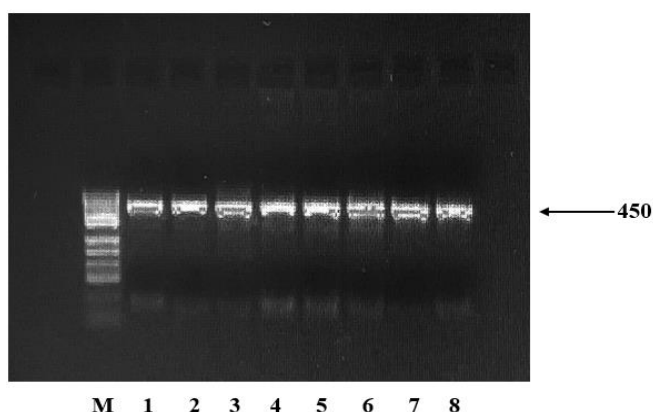


Рисунок 11 – Электрофоретические фрагменты ДНК амплификации кодирующего участка генов *EXT1*, *EXT2*. М – pUC19 ДНК/MspI маркер («Сибэнзим», Новосибирск), 1-8 – амплификат длиной 450 п.о.

Этап 3 (очистка продуктов амплификации):

Реакционная смесь в объеме 12,03 мкл содержала: термочувствительную щелочную фосфатазу FastAp (1 мкл), экзонуклеазу ExoI (0,05 мкл) («Thermo Scientific», США), бычий сывороточный альбумин BSA (0,23 мкл), деионизованную воду (0,75 мкл), амплификат (10 мкл).

Условия инкубирования были следующие:

37°C – 40 мин.

85° C – 20 мин.

Этап 4 (секвенирующая реакция):

Для проведения секвенирующей реакции были подготовлены 2 реакционные смеси в объеме 20 мкл, содержащие: очищенный амплификат (4 мкл), один из праймеров – прямой (F) или обратный (R) (2 мкл), 5-кратный буфер для секвенирования (3 мкл), смесь для секвенирования Big Dye (2 мкл) («Life Technologies», США), деионизованную воду (9 мкл). Программа термоциклирования соответствовала программе, представленной на этапе 1.

Этап 5 (очистка):

Очистку проводили коммерческим набором BigDye Terminator Purification Kit («Life Technologies», США). Реакционная смесь в объеме 65 мкл содержала раствор для очистки от не связавшихся компонентов и солей XTerminator (10 мкл), раствор SAM, повышающий производительность раствора XTerminator (45 мкл), амплификат (10 мкл). Смесь вортексировали в течение 30 мин, затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 2 мин.

Прямое секвенирование проводили с использованием программы Data Collection V.3.0 на генетических анализаторах Applied Biosystems 3130 и Applied Biosystems 3500 («Life Technologies», США). Анализ результатов секвенирования был проведен с использованием программы Sequencing Analysis 5.3.1.

2.4.3. Метод массового параллельного секвенирования

Перед подготовкой библиотек для секвенирования измерялась концентрация ДНК на Nano Photometer P330 (Implen, Germany) согласно протоколу производителя. В исследование были включены образцы с концентрацией 50–100 нг/мкл. Подготовка библиотек для секвенирования было проведено с помощью набора TruSight Rapid Capture kit (Illumina, США) по протоколу, рекомендованному производителем. После реакции амплификации концентрацию библиотек измеряли с помощью Qubit (ThermoFisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Размер готовых библиотек и возможное наличие димеров праймеров/адаптеров определяли с помощью электрофореза на агарозном геле. Оптимальная длина фрагментов с адаптерами составила 410–450 п.н.

Далее готовые библиотеки смешивали, после этого проводили гибридизацию с зондами панели Trusight One Sequencing Panel (Illumina, США) согласно протоколу производителя [<https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina> (дата обращения: 02.07.2021)].

Секвенирование пула обогащенных библиотек проводили на MiSeq (Illumina, США) с использованием парно-концевых чтений 2x300 п.н.

Среднее покрытие составило 100x, доля корректно картированных прочтений на референсную последовательность генома человека (hg19) – 99%, доля целевых регионов с покрытием 100x – 96,5%.

2.5. Биоинформатический анализ

Обработка «сырых» данных

Обработка данных секвенирования проведена согласно биоинформационному пайплайну GATK Best Practices (Broad Institute) для «Germline short variant discovery (SNPs + Indels)» с использованием набора программ GATK4.

Оценка качества прочтений осуществлялась с помощью программы FASTQC. Выравнивание прочтений на целевые последовательности генов (GRCh38/hg38) осуществлялось с помощью BWA. Для аннотирования использовалась программа Annovar [Рыжкова О.П. и др., 2018].

Определение клинической значимости генетических вариантов

Для определения клинически значимого варианта были использованы несколько критериев согласно протоколу «Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами МПС (редакция 2018, версия 2)» (О. П. Рыжкова с соавт, 2019), с использованием программного инструмента Variant Studio 3.0 [Рыжкова О.П. и др., 2018].

Базы данных и литературные источники

Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы базы данных OMIM [<https://www.omim.org/>], gnomAD [<https://gnomad.broadinstitute.org/>], ClinVar [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>], HGVS [<http://www.hgvs.org/>], LOVD [<https://www.lovd.nl/>], dbSNP [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>] и литературные данные [Рыжкова О.П. и др., 2018].

Компьютерные (in silico) предсказательные программы

Если вариант нуклеотидной последовательности не был описан ранее и не представлен ни в одной из баз данных или сведения о нем недостаточны, для проверки функциональной значимости были использованы программы предсказаний патогенности SIFT [<http://sift.jcvi.org>], PROVEAN [<http://provean.jcvi.org/index.php>], PolyPhen2 [<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>], MutationTaster [<https://www.mutationtaster.org/>], [Рыжкова О.П. и др., 2018].

Критерии для интерпретации вариантов нуклеотидной последовательности

Вариант нуклеотидной последовательности классифицируется со следующими 5 характеристиками:

- патогенный (pathogenic);
- вероятно патогенный (likely pathogenic);
- неопределенного значения (uncertain significance);
- вероятно доброкачественный (likely benign);
- доброкачественный (benign).

Варианты, описанные ранее в нескольких источниках как патогенные, являющиеся причиной развития МЭХД и подходящие под тип наследования, классифицируются как патогенные. Если в нескольких источниках описания патогенности варианта противоречили друг другу (вероятно-патогенный и доброкачественный), для классификации его патогенности были использованы критерии, представленные ниже (Таблица 5, 6) [Рыжкова О.П. и др., 2018]:

Таблица 5 – Критерии интерпретации вариантов нуклеотидной последовательности

Оценка патогенности	Комбинации критериев
Патогенный вариант	1. Один очень сильный (PVS1) в сочетании с одним и более сильным (PS1–PS4) или двумя и более средними (PM1–PM6) или одним средним (PM1–PM6) и одним вспомогательным (PP1–PP5) или двумя и более вспомогательными (PP1–PP5)
	2. Два и более сильных (PS1-PS4)
	3. Один сильный (PS1-PS4) в сочетании с тремя и более средними (PM1–PM6) или двумя средними (PM1–PM6) и двумя и более вспомогательными (PP1–PP5) или одним средним (PM1–PM6) и 4 и более вспомогательными (PP1–PP5)
Вероятно патогенный вариант	1. Один очень сильный (PVS1) и один средний (PM1–PM6)
	2. Один сильный (PS1-PS4) и 1–2 средний (PM1-PM6)
	3. Один сильный (PS1-PS4) и два и более вспомогательных (PP1–PP5)
	4. Три и более средних (PM1–PM6)
	5. Два средних (PM1–PM6) и два и более вспомогательных (PP1–PP5)

Окончание Таблицы 5

Оценка патогенности	Комбинации критериев
	6. Один средний (PM1–PM6) и четыре и более вспомогательных (PP1–PP5)
Вариант неопределенного значения	1. Вариант не соответствует ни одному критерию
	2. Критерии доброкачественности и патогенности противоречат друг другу

Таблица 6 – Характеристика критериев отнесения вариантов нуклеотидной последовательности

Сила	Описание
PVS1	LOF варианты (Loss of function)
PS1	Замена на ту же аминокислоту, как в известной мутации
PS2	De novo (нет у родителей)
PS3	Патогенность подтверждена функционально
PS4	«случай-контроль» > 5,0
PM1	Горячая точка или функциональный домен белка
PM2	Низкая частота
PM3	Транс положение
PM4	Инсерции/делеции в рамках считывания в неповторяющихся регионах; потеря стоп-кодона (замена на аминокислоту)
PM5	Миссенс мутация в положении, где описан патогенный вариант
PM6	De novo (отцовство и материнство не установлено)
PP1	Ген связан с фенотипом
PP2	$Z\text{-score} \geq 3$ (в базе данных Exac) $Z\text{-score}$ – отношение числа выявленных миссенс-вариантов к ожидаемому их количеству в гене
PP3	≥ 3 предсказательных программ
PP4	Высоко специфичный фенотип
PP5	Описан в источнике с хорошей репутацией, без независимой оценки

2.6. Методы статистического анализа

Данные проведенного исследования были подвергнуты статистическому анализу с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics v.22. Подготовку базы данных для статистического анализа проводили в среде электронных таблиц Microsoft Excel 2016.

Для количественных данных рассчитывали средние арифметические величины со стандартными отклонениями (SD). Качественные данные описывали с помощью абсолютных и относительных частот (проценты).

Для сравнения двух независимых групп количественных данных использовали U-критерий Манна-Уитни. Для оценки взаимосвязи между изучаемым фактором риска и исходом использовали критерий χ^2 Пирсона. При анализе четырехпольных таблиц сопряженности использовался точный критерий Фишера.

С целью количественной оценки эффекта при сравнении относительных показателей нами использовался показатель отношения шансов (ОШ), определяемый как отношение вероятности наступления события в группе, подвергнутой воздействию фактора риска, к вероятности наступления события в контрольной группе. Для проецирования полученных значений ОШ на генеральную совокупность нами рассчитывались границы 95% доверительного интервала (95% ДИ). При оценке взаимосвязи фактора и исхода эффект фактора считали статистически значимой в случаях, когда доверительный интервал не включал «1» (отсутствие эффекта).

За пороговый уровень статистической значимости принимали значение 0,05 (вероятность ошибки в математических методах оценки менее 5%). Данный уровень значимости считается приемлемым во всех медико-биологических исследованиях.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Эпидемиология множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии

РС (Я) расположена на севере азиатской части России, площадь составляет 3103,2 тыс. км². Протяженность территории Якутии с севера на юг – 2400 км, с запада на восток – 2300 км. Граничит на западе и юго-западе с Красноярским краем и Иркутской областью, на юге – с Читинской и Амурской областями, на юго-востоке и востоке Хабаровским краем, Магаданской областью и Чукотским автономным округом. Для Якутии характерен резко континентальный климат. Географическое положение и обширность территории создают трудности в развитии экономики, транспорта, социальной сферы, что также может оказывать влияние на генетическое разнообразие популяций.

В Якутии проживают представители 120 национальностей, представителей коренного и пришлого населения. Наибольшее количество по численности составляет коренное якутское население. По данным переписи населения 2010 года, в РС (Я) всего населения 958 528, национальный состав представлен: якуты – 466 492 человек, русские – 353 649, эвенки – 21 008, украинцы – 20 341, татары – 8 122 [<https://sakha.gks.ru/ofstatistics>].

В Республике отмечен достаточно высокий спектр наследственных болезней, и его анализ выявил наличие этнически приуроченных заболеваний, встречающихся с высокой частотой среди коренного якутского населения [Ноговицына А.Н., 2001; Сухомясова А.Л., 2005; Максимова Н.Р., 2009]. Груз аутосомно-доминантной патологии в Якутии выше, чем аутосомно-рецессивный [Данилова А.Л., 2009; Генетические исследования населения Якутии, 2014]. По данным Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии РС (Я), зарегистрированы 85 больных из 41 неродственных семей с диагнозом МЭХД.

3.1.1. Распространенность множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии

В Республиканском генетическом регистре наследственной и врожденной патологии МГЦ РБ №1-НЦМ учтено 85 больных с МЭХД из 41 неродственной семьи, из них 70 (82,3%) больных из 33 семей представители якутской этнической группы, 8 (9,4%) больных из 5 русских семей, 5 (5,9%) из 1 эвенкийской семьи и по одному (1,2%) случаю из татарской и украинской семей (Рисунок 12).

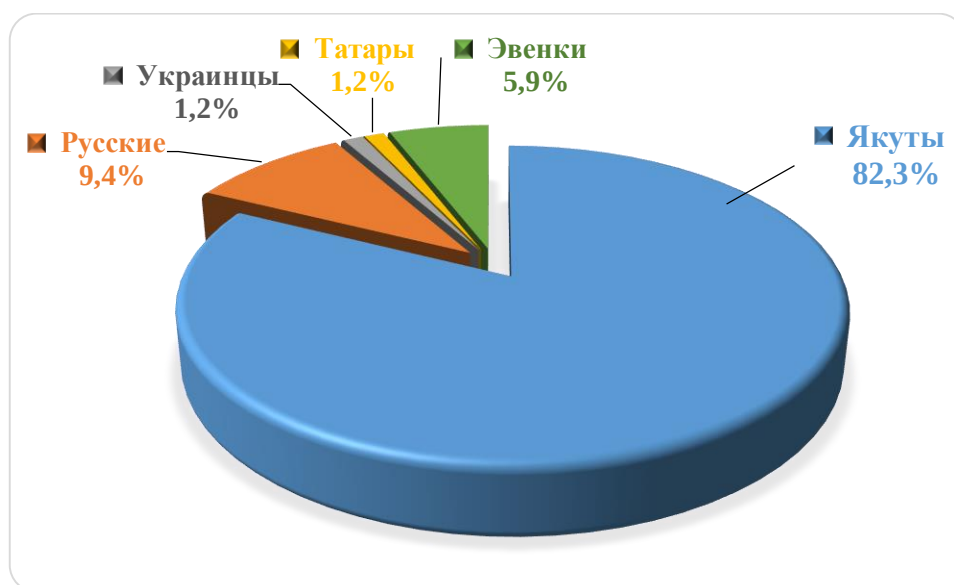


Рисунок 12 – Этнический состав больных с МЭХД

В РС (Я) МЭХД зарегистрирована в 17 улусах (административно-территориальные единицы) из 34 и г. Якутске [Яковлева А.Е. и др., 2016]. Диапазон распространенности по улусам составил от 2,3 до 116,4 на 100 тыс. населения, а в целом по РС (Я) – 8,9 на 100 тыс. населения (Таблица 7). 17 улусов и г. Якутск, в которых зарегистрированы больные с МЭХД, объединены в 5 территориальных групп (Центральная, Западная, Южная, Восточная, Арктическая). При распределении больных с МЭХД по месту жительства наибольшее количество из них зарегистрировано в Западной и Арктической группах улусов.

Таблица 7 – Распространенность МЭХД в РС (Я)

Территориальные группы улусов проживания больных МЭХД		Количество больных	Численность населения*	Частота встречаемости	Распространенность на 100 тыс. населения*
Западная	Верхневиллюйский	2	21661	1:10831	9,2
	Виллюйский	12	25222	1:2102	47,6
	Нюрбинский	2	25258	1:12629	7,9
	Сунтарский	16	25140	1:1571	63,6
	Мирнинский	3	75990	1:25330	3,9
Центральная	Горный	3	11706	1:3902	25,6
	Мегино-Кангаласский	2	31278	1:15639	6,4
	Усть-Алданский	1	22155	1:22155	4,5
	Чурапчинский	1	20387	1:20387	4,9
	Кобяйский	10	13680	1:1368	73,1
	Якутск	17	269601	1:15859	6,3
Южная	Олекминский	3	26785	1:8928	11,2
	Алданский	1	42632	1:42632	2,3
Арктическая	Абыйский	2	4425	1:2213	45,2
	Верхоянский	3	12815	1:4272	23,4
	Жиганский	5	4296	1:859	116,4

Окончание Таблицы 7

Территориальные группы улусов проживания больных МЭХД		Количество больных	Численность населения*	Частота встречаемости	Распространенность на 100 тыс. населения
	Момский	1	4452	1:4452	22,5
Восточная	Оймяконский	1	10109	1:10109	9,9
РС (Я)		85	958528	1:11277	8,9

Примечание: * - Для расчета были использованы показатели численности населения по данным Всероссийской переписи населения 2010 года

Ввиду того, что наибольшее число больных с МЭХД встречалось среди коренного якутского населения, нами был проведен приблизительный анализ частот и/или распространенности МЭХД среди якутов (Таблица 8).

Таблица 8 – Распространенность МЭХД среди якутов в РС (Я)

Улусы проживания больных МЭХД	Число больных	Численность якутов*	Частота	Распространен- ность на 100 тыс. населения
Абыйский	2	3541	1:1771	56,5
Верхневиллюйский	2	21128	1:10564	9,5
Верхоянский	3	9454	1:3151	31,7
Виллюйский	12	21294	1:1775	56,4
Горный	3	11241	1:3747	26,7
Кобяйский	9	9446	1:1050	95,3
Мегино- Кангаласский	2	28249	1:14125	7,1
Мирнинский	2	6686	1:3343	29,9
Момский	1	3015	1:3015	33,2
Нюрбинский	2	23896	1:11948	8,4
Оймяконский	1	2932	1:2932	34,1
Сунтарский	16	24400	1:1525	65,6
Усть-Алданский	1	21787	1:21787	4,6
Чурапчинский	1	19970	1: 19970	5,0
Якутск	13	140272	1:10790	9,3
Всего по РС (Я)	70	466492	1:6664	15,0

Примечание: * - Рассчитано по данным Всероссийской переписи населения 2010 года

Распространенность МЭХД в якутской популяции в целом по Республике составила 15,0 на 100 тыс. населения, что значительно выше, чем в других популяциях РФ и в мире, где распространенность в среднем составляет от 0,04 у русских Костромской области до 4,8 у татар на 100 тыс., населения [Бочков Н.П., 2012; Зинченко Р.А. и др. 2014], также выше от общеевропейской популяции, где распространенность МЭХД от 1,3 до 2,0 на 100 тыс. населения [Wuyts W. et al., 1996; Wang X. et al., 2012] (Рисунок 13). Но ниже, чем в популяциях острова Гуам (1:1000) и индейцев Поингасси (1:77). Возможно такие высокие показатели частоты показаны за счет малочисленности в данных популяциях, так в острове Гуам численность населения всего 32 тыс., а индейцев Поингасси 0,583 тыс. населения [Krooth R. et al., 1961; Kang Q. et al., 2013].

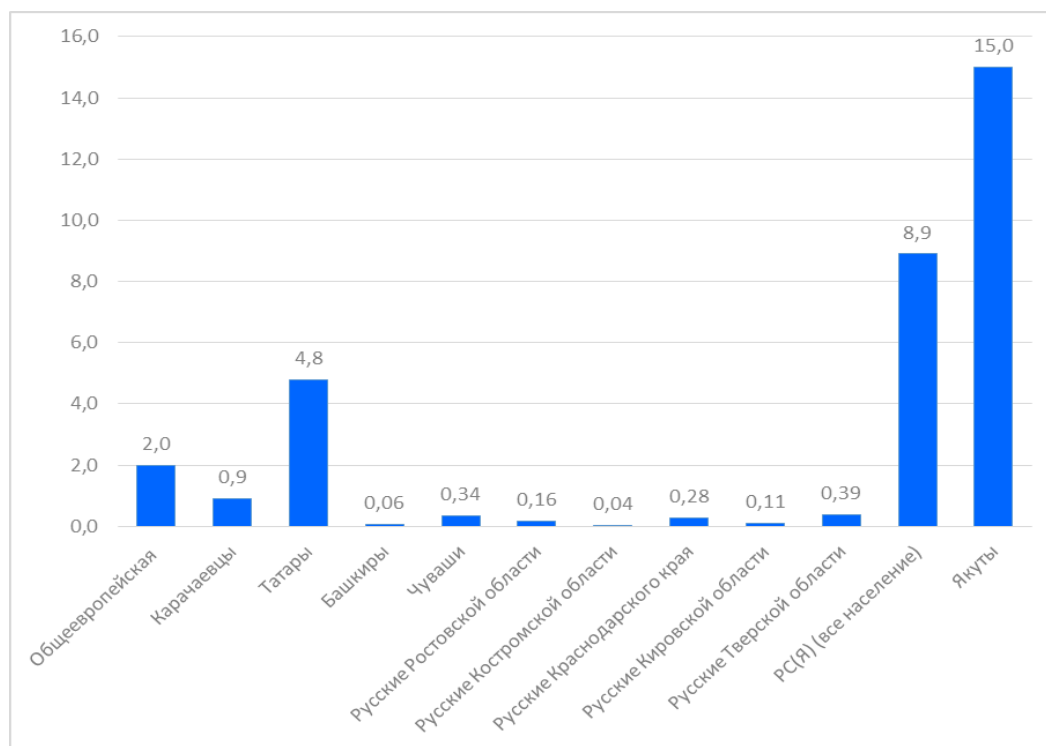


Рисунок 13 – Распространенность МЭХД в обследованных регионах РФ и в общеевропейской популяции (на 100 тыс. населения)

По половой принадлежности наблюдается незначительное преобладание числа больных мужского пола 44 (51,8%) по сравнению с женщинами – 41 (48,2%), что характерно и для других популяций в мире, где соотношение мужчин и женщин

среди больных составляет 1,5:1 [Legeai-Mallet L. et al., 1997; Santos S.C.L. et al., 2018].

Таким образом, распространенность МЭХД для всего населения Якутии составила 8,9 на 100 тыс. населения. Установлено, что в РС (Я) заболевание в основном встречается среди коренного якутского населения с частотой 15,0 на 100 тыс. якутов с накоплением в отдельных улусах (Абыйский (1:1771), Кобяйский (1:1050), Вилуйский (1:1775) и Сунтарский (1:1525)), что в 2 и более раза выше, чем в общеевропейской популяции и регионов России (см. раздел 1.2.2.). Причины накопления больных с МЭХД у якутов можно объяснить изолированностью, эффектом основателя и расширенным характером воспроизводства. Для якутов все еще сохраняется высокая рождаемость, так по официальным данным, по коэффициенту рождаемости РС (Я) занимает первое место по Дальневосточному федеральному округу [Мостахова Т.С., 2015].

3.2. Клинико-генеалогический анализ больных с множественной экзостозной хондродисплазией в Якутии

Нами была проведена работа по клинико-генеалогическому анализу пробандов и их родственников. Составлены родословные в 2–4 поколениях 41 семьи (Приложение Таблица Г.1). Для проведения подробного анализа проявлений заболевания использованы генетические карты 85 больных с МЭХД. Включены больные, которые имеют два или более экзостозов.

Возраст манифестации заболевания составлял от рождения до 14 лет, средний возраст манифестации равнялся 4–5 годам. При этом не все пациенты могли точно сказать возраст манифестации, так как клиническая картина имеет внутрисемейный клинический полиморфизм и зависит от числа, величины, локализации экзостозов и обусловленных ими деформаций. По некоторым литературным данным, МЭХД диагностируются в возрасте до 12 лет [Legeai-Mallet L. et al., 1997; Liang Ch. et al., 2020].

Фенотипические проявления у обследованных нами больных выражены в виде экзостозов разных размеров, локализующихся в области затылочной кости у

1 (1,2%) больного, позвоночного столба – у 4 (4,7%), лопатки – у 21 (24,7%), в области грудины – у 7 (8,2%), ребер – у 22 (25,9%), плечевых костей – у 50 (58,8%), локтевых суставов – у 16 (18,8%), лучезапястных суставов – у 21 (24,7%), кистей рук – у 21 (24,7%), тазовых костей – у 1 (1,2%), тазобедренных суставов – у 3 (3,5%), бедренных костей – у 28 (32,9%), коленных суставов – у 44 (51,8%), большеберцовых костей – у 41 (48,2%), малоберцовых костей – у 38 (44,7%), голеностопных суставов – у 10 (11,8%), костей стоп – у 3 (3,5%). В периоды активного роста скелета наблюдалось ограничение подвижности верхних конечностей – у 17 (20,0%) больных, ограничение подвижности нижних конечностей – у 13 (15,3%), трудности при ходьбе наблюдались – у 6 (7,1%), укорочение конечностей выявлялось – у 19 (22,4%), деформация костей – у 21 (24,7%) больного. Проведено всего 60 (70,5%) операций у 31 (36,5%), инвалидность оформлена у 15 (17,6%) больных.

Всех больных с МЭХД условно распределили на 2 группы с выраженной и умеренной формами болезни (см. раздел 1.2.6.) [Jager M. et al., 2007; Pedrini E. et al., 2011; Kim S. et al., 2022]. В группу с выраженной формой включили больных со следующими клиническими проявлениями: ограничение подвижности верхних и нижних конечностей, трудности при ходьбе, укорочение конечности, деформация костей, хирургическое лечение и инвалидизация. В группу с умеренной формой вошли больные без выше указанных клинических проявлений МЭХД (Приложение Таблица Е.1, Таблица 9).

Таблица 9 – Клинические данные больных с МЭХД

Формы МЭХД						
Количество больных	Выраженная		Умеренная		Итого	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
	45	52,9	40	47,1	85	100,0
Число экзостозов						
Общее количество	223	68,4	103	31,6	326	100,0

В таблице 10 представлено распределение больных по клиническим симптомам. В группу больных с выраженной формой МЭХД вошли 45 (52,9%) пациентов,

с умеренной формой 40 (47,1%) пациентов. Установлено, что 31 (36,5%) больной получили хирургическое лечение. При этом деформация костей и укорочение конечностей наблюдалось у 21 (24,7%) больного. Ограничение подвижности верхних конечностей у 17 (20,0%), нижних конечностей – у 13 (15,3%), трудности при ходьбе – у 6 (7,1%). Инвалидность по заболеванию оформили 15 (17,6%) больных (Таблица 10).

Таблица 10 – Частота клинических проявлений при выраженной форме и исходов при МЭХД

Клинические симптомы	Абс.	%
Верхние конечности, ограничение подвижности	17	13,8
Нижние конечности, ограничение подвижности	13	10,5
Трудности при ходьбе	6	4,8
Укорочение конечности	21	16,9
Деформация костей	21	16,9
Хирургическое лечение	31	25,0
Инвалидность	15	12,1
Всего	124	100,0

Далее нами проведен подсчет количества экзостозов у больных. В среднем обнаруживается по $3,8 \pm 2,5$ экзостозов, а у больных с выраженной формой заболевания – $4,9 \pm 2,6$ (Таблица 11).

Таблица 11 – Среднее число экзостозов при сравниваемых формах МЭХД

N	Среднее значение	Стандартное отклонение	95% ДИ ¹
	Все больные		
85	3,8	2,5	3,3-4,4
	«Выраженная» форма		
45	4,9	2,6	4,2-5,7*
	«Умеренная» форма		
40	2,6	1,8	2,0-3,1*

¹ - 95% доверительные интервалы для средних значений

* - $p=0,000$; критерий Манна-Уитни

В таблице 12 приведена средняя встречаемость числа экзостозов у больных с разными клиническими формами. Больше экзостозов встречается на верхних и нижних конечностях (Таблица 12). На верхних конечностях у больных с выраженной формой число экзостозов наблюдается в 2-3 раза больше, чем у больных с умеренной формой, статистически значимые различия есть (при сравнении использован критерий χ^2 Пирсона поправкой на правдоподобие). Статистически значимые различия по частоте встречаемости экзостозов у больных с умеренной и выраженной формой выявлены на нижних конечностях (при сравнении использован χ^2 Пирсона поправкой на правдоподобие). Так, у половины больных с умеренной формой встречается по одному экзостозу. У больных с выраженной формой обнаруживается больше экзостозов, выявляется от 3 до 10 экзостозов на одного больного.

При сравнении локализации экзостозов и клинических проявлений с данными из 7 других стран мира результаты оказались сопоставимы (Таблица 13) [Alvarez C.M. et al., 2007; Ciavarella M. et al., 2013; Фохтин В.В. и др., 2014; Medek K. et al., 2017; Fusco C. et al., 2019; Wang Y. et al., 2020; Al-Zayed Z. et al., 2021]. По локализации экзостозов значительных различий у наших пациентов по сравнению с пациентами из других стран не наблюдается. Можно отметить лишь, что в нашем исследовании у одного больного (1,2%) была локализация экзостозов на затылке, а у итальянских (Сан-Джованни Ротондо) и китайских (Гуанчжоу) пациентов экзостозы локализуются на костях ключицы 4,4% и 5,0% (Таблица 13).

Так, клинические проявления экзостозной хондродисплазии зависят от месторасположения, величины, взаимоотношения с окружающими структурами.

Таблица 12 – Клиническая характеристика больных с МЭХД (локализация экзостозов)

Локализация экзостозов у больных	Клиническая форма	Число экзостозов														p
		0		1		2		3		4		5		6		
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
На голове	«Умеренная»	40	100,0	0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,529 ¹
	«Выражен-ная»	45	97,8	1	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Всего	85	98,8%	1	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
На туловище	«Умеренная»	28	70,0	7	17,5	4	10,0	1	2,5	-	-	-	-	-	-	0,235 ²
	«Выражен-ная»	22	48,9	14	31,1	6	13,3	3	6,7	-	-	-	-	-	-	
	Всего	50	58,8	21	24,7	10	11,8	4	4,7	-	-	-	-	-	-	
На верхних конечностях	«Умеренная»	19	47,5	15	37,5	3	7,5	3	7,5	0	0,0	-	-	-	-	0,002 ²
	«Выражен-ная»	8	17,8	15	33,3	10	22,2	7	15,6	5	11,1	-	-	-	-	
	Всего	27	31,8	30	35,3	13	15,3	10	11,8	5	5,8	-	-	-	-	
На нижних конечностях	«Умеренная»	8	20,0	19	47,5	7	17,5	4	10,0	1	2,5	0	0,0	1	2,5	0,001 ²
	«Выражен-ная»	7	15,6	6	13,3	7	15,6	12	26,7	11	24,4	1	2,2	1	2,2	
	Всего	15	17,6	25	29,4	14	16,5	16	18,8	12	14,1	1	1,2	2	2,4	

Примечание: ¹ - Точный критерий Фишера; ² - критерий χ^2 Пирсона поправкой на правдоподобие

Таблица 13 – Сравнительная характеристика локализации экзостозов у больных с МЭХД в РФ и в мире

Локализация экзостозов	Количество больных (%)							
	РС (Я) Якутия 85 больных из 41 семьи	РФ Москва 147 больных	Италия (Аквила), 158 больных из 114 семей	Канада (Британская Колумбия), 79 больных из 39 семей	Италия (Сан- Джованни Ротондо), 90 больных	Китай (Гуанчжоу), 60 больных из 22 семей	Чешская Республика (Прага), 14 больных из 9 семей	Саудовская Аравия, 22 больных из 17 семей
1	2	3	4	5	6	7	8	9
- затылок	1 (1,2)	-	-	-	-	-	-	-
- позвоночный столб	3 (4,7)	-	2 (1,3)	-	1 (1,1)	5 (8,3)	-	-
- грудина	7 (8,2)	-	4 (2,5)	-	1 (1,1)	1 (1,7)	-	-
- ребра	22 (25,9)	2 (1,4)	14 (8,9)	-	5 (5,6)	6 (10,0)	-	1 (4,5)
- лопатка	21 (24,7)	2 (1,4)	18 (11,4)	-	8 (8,9)	6 (10,0)	-	-
- плечевая кость	50 (58,8)	35 (23,8)	41 (25,9)	-	16 (17,8)	11 (18,3)	13 (92,8)	2 (9,1)
- ключица	-	-	-	-	4 (4,4)	3 (5,0)	-	-
- локтевая кость	-	-	26 (16,5)	-	7 (7,8)	19 (31,7)	5 (35,7)	-
- локтевой сустав	16 (18,8)	25 (17,0)	-	31 (39,2)	1 (1,1)	2 (3,3)	-	-
- лучевая кость	-	-	22 (13,9)	-	9 (10,0)	16 (26,7)	13 (92,8)	2 (9,1)
- лучезапястный сустав	21 (24,7)	-	-	-	7 (7,8)	4 (6,7)	-	-
- кисть руки	21 (24,7)	-	17 (10,8)	-	12 (13,3)	2 (3,3)	-	-
- тазовая кость	1 (1,2)	3 (2,0)	2 (1,3)	-	8 (8,9)	4 (6,7)	-	1 (4,5)
- тазобедренный сустав	3 (3,5)	-	-	-	-	1 (1,7)	1 (7,1)	2 (9,1)
- бедренная кость	28 (32,9)	42 (28,6)	42 (26,6)	-	18 (20,0)	32 (53,3)	13 (92,8)	2 (9,1)
- колено	44 (51,8)	-	20 (12,7)	-	16 (17,8)	-	-	-
- коленный сустав	22 (25,9)	-	-	-	-	1 (1,7)	-	5 (22,7)
- большеберцовая кость	41 (48,2)	27 (18,4)	39 (24,7)	18 (22,8)	17 (18,9)	27 (45,0)	13 (92,8)	3 (13,6)
- малоберцовая кость	38 (44,7)	12 (8,2)	30 (18,9)	23 (29,1)	22 (24,4)	24 (40,0)	1 (7,1)	3 (13,6)

Окончание Таблицы 13

Локализация экзостозов	Количество экзостозов (%)							
	РС (Я) Якутия, 85 больных из 41 семьи	РФ Москва, 147 больных	Италия (Аквила), 158 больных из 114 семей	Канада (Бри- танская Колумбия), 79 больных из 39 семей	Италия (Сан- Джованни Ротондо), 90 больных	Китай (Гуанчжоу), 60 больных из 22 семей	Чешская Республика (Прага), 14 больных из 9 семей	Саудовская Аравия, 22 больных из 17 семей
1	2	3	4	5	6	7	8	9
- голеностопный сустав	10 (11,8)	-	-	29 (36,7)	-	-	-	-
- стопа	3 (3,5)	-	11 (6,9)	-	7 (7,8)	-	5 (35,7)	-
Клинические проявления	Число больных с клиническими проявлениями (%)							
Деформация костей	21 (24,7)	-	-	30 (37,9)	-	8 (13,3)	1 (7,1)	1 (4,5)
Ограничение подвижности (верхние конечности)	17 (20,0)	-	-	6 (7,6)	-	4 (6,7)	5 (35,7)	-
Ограничение подвижности (нижние конечности)	13 (15,3)	-	-	-	-	3 (5,0)	-	2 (9,1)
Укорочение конечности	21 (24,7)	-	-	33 (41,8)	-	1 (1,7)	6 (42,8)	-
Трудности при ходьбе	6 (7,1)	-	-	-	-	-	-	-
Оперативное лечение	31 (36,5)	-	-	-	-	12 (20,0)	13 (92,8)	-
Литература	Наши данные	Фохтин В.В. и др., 2014	Fusco C. et al., 2019	Alvarez C.M. et al., 2007	Ciavarella M. et al., 2013	Wang Y. et al., 2020	Medek K. et al., 2017	Al-Zayed Z. et al., 2021

3.3. Идентификация вариантов нуклеотидной последовательности множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии

3.3.1. Поиск мутаций множественной экзостозной хондродисплазии в генах *EXT1* и *EXT2*

Для молекулярно-генетического исследования были отобраны 57 образцов ДНК больных с МЭХД и 11 образцов ДНК здоровых родственников из 31 семьи.

На первом этапе исследования проведен поиск молекулярно-генетической причины МЭХД с применением массового параллельного секвенирования. Для первого запуска МПС был отобран 1 пробанд с наиболее характерной фенотипической картиной МЭХД для проведения экзомного секвенирования, включающего 4800 генов-кандидатов с известным клиническим значением, включающие мутации в генах *EXT1* и *EXT2*. По результатам секвенирования был найден патогенный вариант с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2*. Далее был проведён поиск данного варианта методом секвенирования по Сэнгеру в общей выборке, состоящей из 57 больных, включая пробанда. По результатам поиска данный вариант был обнаружен у 18 больных из 4 неродственных семей, включая семью первого пробанда. В 3 других семьях МПС не проводилось в связи с выявлением причины заболевания. В остальных 27 неродственных семьях проведено МПС. Результаты исследования позволили идентифицировать патологические варианты в генах *EXT1* и *EXT2* у 21 пробанда. В том числе в гене *EXT1* найдено 8 вариантов (с.854dupA (p.His285Glnfs*4), с.970delT (p.Tyr324Phefs*35), с.1003delC (p.Leu335Trpfs*24), с.1019G>A (p.Arg340His), с.1171delT (p.Ser391Leufs*12), с.1703_1713delCGGTGCTTTCA (p.Thr568Asnfs*16), с.1883+2T>A (в сайте сплайсинга), с.2101C>T (p.Arg701*)), а в гене *EXT2* – 1 (с.310delA (p.Ile104fs*8)). У 6 пробандов мутацию установить не удалось. Следующим этапом была валидация результатов методом секвенирования по Сэнгеру (Рисунок 14).

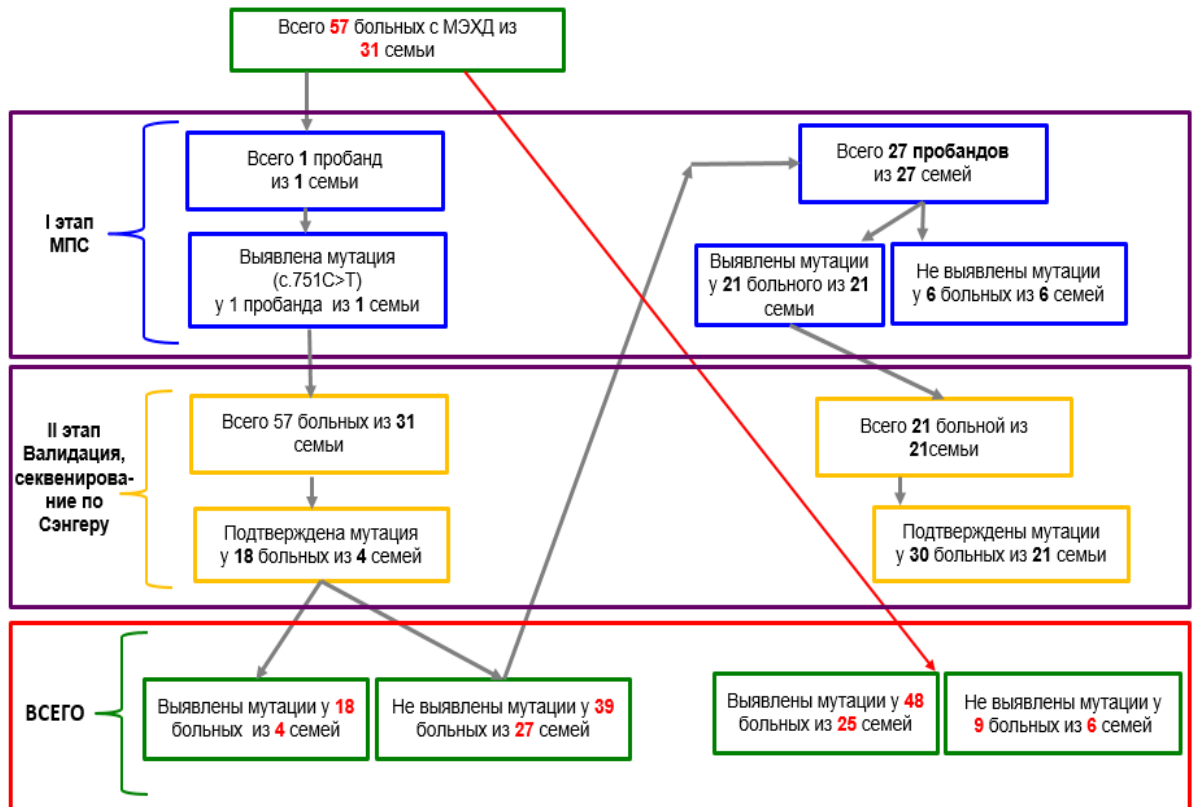


Рисунок 14 – Схема проведения этапов исследования

Для подтверждения выявленных мутаций проведено секвенирование по Сэнгеру. Спектр найденных мутаций у больных и родственников представлен в таблице 14.

Таблица 14 – Спектр выявленных мутаций в генах *EXT1*, *EXT2* у больных с МЭХД

№	Ген	Экзон	Мутация	АК замена	Количество семей	Количество больных
1	<i>EXT1</i>	1	c.854dupA	p.His285Glnfs*4	1	1
2	<i>EXT1</i>	2	c.970delT	p.Tyr324Phefs*35	1	1
3	<i>EXT1</i>	2	c.1003delC	p.Leu335Trpfs*24	1	1
4	<i>EXT1</i>	2	c.1019G>A	p.Arg340His	2	4
5	<i>EXT1</i>	4	c.1171delT	p.Ser391Leufs*12	1	1
6	<i>EXT1</i>	8	c.1703_1713del CGGTGCTTTCA	p.Thr568Asnfs*16	1	1

Окончание Таблицы 14

№	Ген	Экзон	Мутация	АК замена	Количество семей	Количество больных
7	<i>EXT1</i>	9	c.1883+2T>A	в сайте сплайсинга	1	3
8	<i>EXT1</i>	11	c.2101C>T	p.Arg701*	1	1
9	<i>EXT2</i>	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	12	17
10	<i>EXT2</i>	5	c.751C>T	p.Gln251*	4	18
Всего		-	10	-	25	48
Не обнаружено			больные		6	9

3.3.2. Спектр выявленных вариантов при массовом параллельном секвенировании

Выявленные варианты нуклеотидной последовательности в гене EXT1

Спектр обнаруженных вариантов в гене *EXT1* оказался разнообразным: мутации сдвига рамки считывания (5), нонсенс-мутации (1), миссенс-мутации (2), а также встречается мутация в сайте сплайсинга (1) (Рисунок 15). При этом (3) из выявленных мутаций в гене *EXT1* – новые, ранее не описанные (Рисунок 16).



Рисунок 15 – Спектр вариантов нуклеотидной последовательности в гене *EXT1*

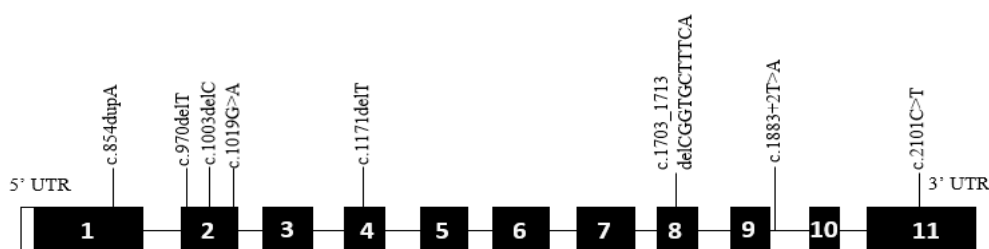


Рисунок 16 – Выявленные мутации в гене *EXT1* у больных с МЭХД

Обнаружен вариант c.854dupA (p.His285Glnfs*4) в 1 экзоне гена *EXT1* у 1 пациента из русской семьи. Вследствие дупликации нуклеотида А (аденин) в гене происходит сдвиг рамки считывания при транскрипции мРНК, в следствие чего происходит замена аминокислоты His (гистидин) на Gln (глутамин) в 285-й позиции белка, и возникает преждевременный стоп-кодон в положении 4 новой рамки считывания. Предполагается, что этот вариант вызывает потерю нормальной функции белка *EXT1* из-за усечения, либо из-за нонсенс-опосредованного распада мРНК. Данный вариант не был описан в литературе у больных с МЭХД, а также не встречается в популяционных базах данных ExAC, GnomAD, однако ClinVar содержит запись об этом варианте без клинического описания [Nykamp K. et al., 2017] без клинического описания. Программа предсказания Poly-Phen2, SIFT, MutationTaster классифицирует данный вариант как патогенный. Основываясь на критериях PM2, PVS1, PP3 из руководства по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования (MPS), вариант c.854dupA (p.His285Glnfs*4) можно классифицировать как «патогенный», что указывает на высокую вероятность вызвать или способствовать развитию МЭХД.

Второй обнаруженный вариант c.970delT (p.Tyr324Phefs*35) находится во 2 экзоне гена *EXT1* у 1 пациента из русской семьи. Вследствие делеции нуклеотида Т (тимин) в гене происходит сдвиг рамки считывания при транскрипции мРНК, в следствие чего происходит замена аминокислоты Tyr (тирозин) на Phe (фенилаланин) в 324-й позиции белка, и возникает преждевременный стоп-кодон в положении 35 новой рамки считывания. Предполагается, что этот вариант вызывает по-

терю нормальной функции белка EXT1 из-за усечения, либо из-за нонсенс-опосредованного распада мРНК. Вариант отсутствует в базах данных и в литературе, т. е. впервые обнаружен в настоящем исследовании. Вариант с.970delT (p.Tyr324Phefs*35) соответствует критериям (PVS1, PM2, PP3) и интерпретируется как «патогенный» согласно руководству по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования (MPS), что доказывает связь с МЭХД.

Следующий вариант с.1003delC (p.Leu335Trpfs*24) во 2 экзоне гена *EXT1* у 1 пациента из якутской семьи. При делеции нуклеотида С (цитозин) происходит сдвиг рамки считывания при транскрипции мРНК, в следствие чего происходит замена аминокислоты Leu (лейцин) на Trp (триптофан) в 335 кодоне, и возникает преждевременный стоп-кодон в положении 24 новой рамки считывания. Имеется также ранее описанный как «патогенный» вариант, приводящий к замене той же аминокислоты в том же положении с.1003delC (p.Leu335Trpfs*24). Предполагается, что этот вариант вызывает укорочение белка EXT1. Вариант отсутствует в базах данных и в литературе, описывается в настоящем исследовании впервые. Основываясь на критериях PM2, PVS1, PS1, PP3 из руководства по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования (MPS), вариант с.1003delC (p.Leu335Trpfs*24) можно классифицировать как «патогенный», что указывает на высокую вероятность вызвать или способствовать развитию МЭХД.

Выявлен ранее описанный как «патогенный» вариант с.1019G>A (p.Arg340His) во 2 экзоне гена *EXT1* у 2 пациентов из 2 неродственных якутских семей. Замена нуклеотида G (гуанин) на A (аргинин) в гене приводит к замене аминокислоты Arg (аргинин) на His (гистидин) в 340 кодоне белка EXT1. Данный вариант присутствует в популяционной базе данных (rs119103287, ExAC 0,002%). Это один из наиболее часто встречающихся вариантов в гене *EXT1* у больных с МЭХД [Jennes I. et al 2009]. В литературе сообщалось о нескольких семейных случаях МЭХД с данным вариантом [Raskind W.H. et al. 1998; Dobson-Stone C. et al., 2000; Cheung P.K. et al., 2001; Jennes I. et al., 2009; Sarrion P. et al., 2013; Jamsheer A.

et al., 2014; Mooij H.L. et al., 2014; Bozzola M. et al., 2015; Ishimaru D. et al., 2016; Nykamp K. et al., 2017; Fusco C. et al., 2019], кроме этого, de novo случай [Raskind W.H. et al. 1998]. А также в экспериментальных исследованиях было показано, что данный миссенс-вариант нарушает функцию белка EXT1 в культуре клеток [Cheung P.K. et al., 2001].

Следующий выявленный вариант c.1171delT (p.Ser391Leufs*12) в гене *EXT1*, расположен в 4 экзоне, обнаружен у 1 пациента из 1 якутской семьи. Делеция нуклеотида Т (тимин) в гене приводит к сдвигу рамки считывания при транскрипции мРНК, в следствие чего происходит замена аминокислоты Ser (серин) на Leu (лейцин) в 391-й позиции белка EXT1, и возникает преждевременный стоп-кодон в положении 12 новой рамки считывания. Этот вариант отсутствует в базах данных, но описан в литературе как «вероятно патогенный» [Signori E. et al., 2007]. Данный вариант c.1171delT (p.Ser391Leufs*12) соответствует критериям PVS1, PM2, PP3 и был классифицирован нами как «патогенный».

Далее обнаружен вариант c.1703_1713delCGGTGCTTTCA (p.Thr568Asnfs*16) в 8 экзоне у 1 пациента из 1 украинской семьи. Делеция длиной 11 п.н. в 8 экзоне гена *EXT1* приводит к сдвигу рамки считывания при транскрипции мРНК, далее происходит замена аминокислоты Thr (треонин) на Asn (аспарагин) в 568-м кодоне, и возникает преждевременный стоп-кодон в положении 16 новой рамки считывания. Вариант c.1703_1713delCGGTGCTTTCA (p.Thr568Asnfs*16) соответствует критериям PVS1, PM2, PP3 и интерпретируется как патогенный.

Обнаружен вариант c.1883+2T>A у 1 пациента из 1 якутской семьи. Замена нуклеотида в донорном сайте (5'-конец 9 интрона) нарушает нормальный сплайсинг 9 экзона с 10. Это изменение последовательности влияет на донорский сайт сплайсинга в интроне 9 гена *EXT1*. Ожидается, что это нарушит сплайсинг РНК и, вероятно, приведет к отсутствию или повреждению белкового продукта. Этот вариант отсутствует в популяционной базе данных. Нарушение данного сайта сплайсинга наблюдалось у больных с МЭХД [Seki H. et al., 2001; Pei Y. et al., 2010]. Ал-

горитмы, разработанные для прогнозирования влияния изменений последовательности на сплайсинг РНК, предполагают, что этот вариант может нарушить консенсусный сайт сплайсинга, но это предсказание не было подтверждено опубликованными исследованиями транскрипции. Варианты донорного и акцепторного сайтов сплайсинга обычно приводят к потере функции белка [Baralle D., Baralle M., 2005], а варианты с потерей функции белка EXT1, как известно, являются патогенными [Wuyts W., Van Hul W., 2000; Cheung P.K. et al., 2001; Jennes I. et al., 2009]. По данным критериям PVS1, PM2, PP3 вариант с.1883+2T>A классифицируется как патогенный.

Выявлен известный ранее вариант с.2101C>T (p.Arg701*) в 11 экзоне у 1 пациента из 1 русской семьи. Данная замена нуклеотида С (цитозин) на Т (тимин) приводит к возникновению преждевременного стоп-кодона в 701 позиции белка EXT1. Этот вариант отсутствует в популяционной базе данных, но описан в литературе у лиц, страдающих МЭХД. В базе данных ClinVar присутствует клиническое описание данного варианта [Seki H. et al., 2001; Tanteles G.A. et al., 2015]. По критериям PVS1, PM2, PP3 вариант с.2101C>T (p.Arg701*) был классифицирован как патогенный.

Выявленные варианты нуклеотидной последовательности в гене EXT2

В гене *EXT2* были обнаружены мутации сдвига рамки считывания (12) и нонсенс-мутация (1) (Рисунок 17). Верифицированные мутации в гене *EXT2* оказались мажорными среди больных якутской этнической группы (Рисунок 18).

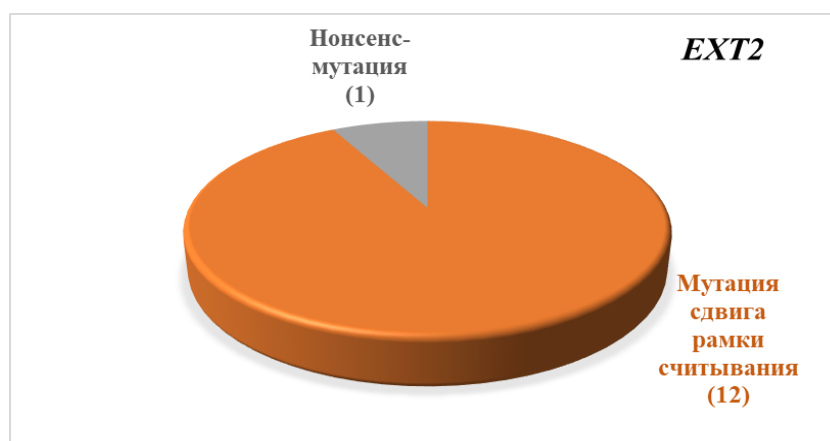


Рисунок 17 – Спектр вариантов нуклеотидной последовательности в гене *EXT2*

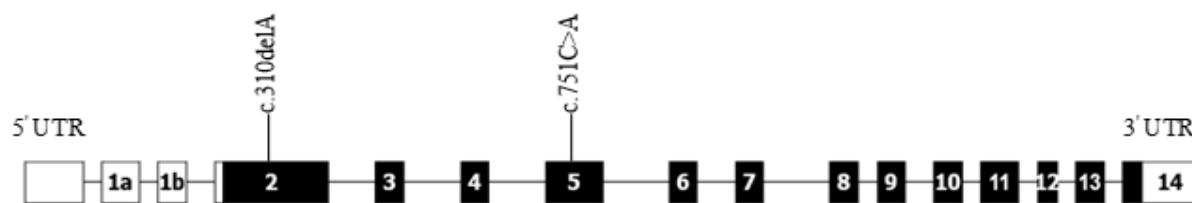


Рисунок 18 – Выявленные мутации в гене *EXT2* у больных с МЭХД

Во 2 экзоне *EXT2* выявлен вариант, приводящий к сдвигу рамки считывания c.310delA (p.Ile104fs*8). Делеция нуклеотида А (аденин) приводит к замене аминокислоты Ile (изолейцин) на Ser (серин) в 104 кодоне белка *EXT2*, и возникает преждевременный стоп-кодон в положении 8 новой рамки считывания. Предполагается, что этот вариант вызовет потерю нормальной функции белка *EXT2* из-за усечения, либо из-за нонсенс-опосредованного распада мРНК. Данный вариант ранее был обнаружен у польских пациентов с МЭХД, где был подтвержден семейный случай заболевания [Jamsheer A. et al., 2014]. Согласно критериям PM2, PVS1, PP3, PP4 из руководства по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования (МПС), мутация c.310delA (p.Ile104fs*8) в гене *EXT2* является «патогенной». Данный вариант обнаружен у 12 пациентов из 12 якутских семей.

Вторая мажорная известная нонсенс-мутация c.751C>T (p.Gln251*) обнаружена на 5 экзоне в гене *EXT2*, создает сигнал преждевременной терминации трансляции в 251 аминокислотной позиции белка *EXT2*, в следствие чего происходит стоп-кодон. По сравнению с нормальным белком *EXT2*, в мутантном белке *EXT2* не хватает 467 аминокислот на С-конце, включая часть функционального домена экзостозина и весь функциональный домен гликозилтрансферазы 64, что приводит к серьезным функциональным нарушениям. Данная мутация обнаружена у 1 пациента из 1 якутской семьи. По данным базы LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/EXT2>) из литературных источников известно, что данная мутация была обнаружена в 2 семьях из Италии и Австрии в результате скрининговых исследований генов *EXT1* и *EXT2* у больных с МЭХД, проведенных в Италии и Канаде в 2005–2009 гг. [Pedrini E. et al. 2005; Alvarez C.M. et al. 2007].

В результате молекулярно-генетического анализа с использованием МПС в исследуемых образцах у 22 пробандов обнаружено 10 гетерозиготных мутаций в генах *EXT1*, *EXT2*. В гене *EXT1* – 8 мутаций, 3 мутации из которых новые ранее не описанные, в гене *EXT2* – 2 ранее известные мутации. У 6 пробандов мутацию установить не удалось, возможно, молекулярно-генетические причины не могут быть идентифицированы с помощью анализа клинического экзозома.

3.3.3. Валидация результатов МПС методом прямого секвенирования по Сэнгеру

Следующим этапом было подтверждение выявленных вариантов в генах *EXT1*, *EXT2* путем прямого секвенирования по Сэнгеру. А также дополнительно для новых мутаций было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белка у различных видов позвоночных, с целью выяснения функциональной значимости мутаций.

В исследование включили образцы ДНК 57 пациентов с МЭХД из 31 неродственной семьи, проживающей в РС (Я). Из них количество мужского пола составило 29 (53,03 %), женского – 28 (46,97 %). Этнический состав больных и их родственников: якуты – 47 (84,84 %), русские – 6 (9,09 %), эвенки – 2 (3,03 %), украинец – 1 (1,52 %), татарин – 1 (1,52 %).

При валидации подтверждено 10 вариантов нуклеотидной последовательности в генах *EXT1*, *EXT2* у 48 (84,2%) больных из 25 семей.

Среди всех выявленных вариантов наибольшую долю составили мутации сдвига рамки считывания (46%), нонсенс-мутации (40%), реже выявлены миссенс-мутации (8%), мутации в сайте сплайсинга (6%) (Рисунок 19).

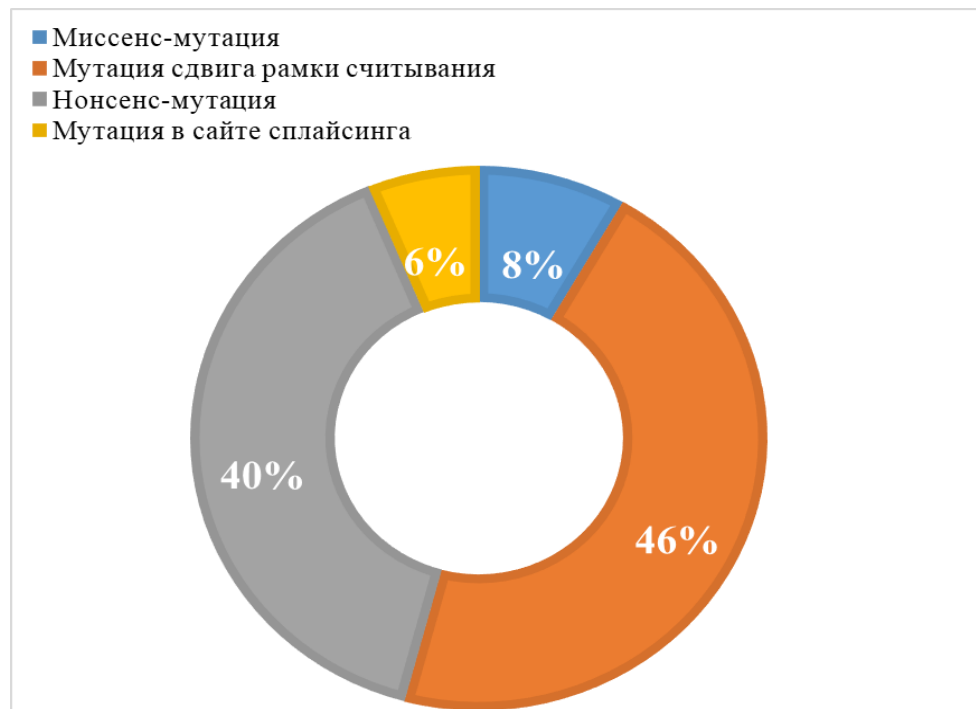


Рисунок 19 – Типы выявленных вариантов нуклеотидной последовательности ДНК в локусах генов *EXT1*, *EXT2*

В таблице 15 представлены результаты молекулярно-генетического исследования 57 больных с МЭХД из 31 семьи (Таблица 15).

Таблица 15 – Спектр выявленных вариантов при МПС и методом прямого секвенирования

№	№ Семьи	Член семьи	№ ДНК пациента	Национальность	Ген-кандидат	Геномная координата (GRCh37/hg19)	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Тип мутации	Ссылка	Методы исследования
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	Пробанд	AA5124	Русская	<i>EXT1</i>	chr8:118849432 TA>T	2	c.970delT	p.Tyr324 Phefs*35	Мутация сдвига рамки считывания	Новый	МПС, секвенирование по Сэнгеру
2	2	Пробанд	AA6280	Якут	<i>EXT2</i>	chr11: 44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс-мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвенирование по Сэнгеру
3	2	Сибс	B8642	Якут	<i>EXT2</i>	chr11: 44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс-мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвенирование по Сэнгеру
4	2	Мать	B8643	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11: 44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс-мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвенирование по Сэнгеру
5	5	Пробанд	AA1774	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104 fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	МПС, секвенирование по Сэнгеру
6	6	Пробанд	AA3874	Якутка	<i>EXT1</i>	chr8:118842581 GA>G	4	c.1171delT	p.Ser391 Leufs*12	Мутация сдвига рамки считывания	Signori E. et al., 2007	МПС, секвенирование по Сэнгеру
7	7	Пробанд	AA2283	Якут	<i>EXT1</i>	chr8:117837160 AG>A	2	c.1003delC	p.Leu335 Trpfs*24	Мутация сдвига рамки считывания	Новый	МПС, секвенирование по Сэнгеру

Продолжение Таблицы 15

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
8	8	Пробанд	AA5498	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44108018C A>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	МПС, секвенирование по Сэнгеру
9	9	Пробанд	934	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44108018C A>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	МПС, секвенирование по Сэнгеру
10	10	Пробанд	AA3	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44108018C A>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	МПС, секвенирование по Сэнгеру
11	10	Отец	AA4	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44108018C A>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	Секвенирование по Сэнгеру
12	11	Пробанд	686	Русская	<i>EXT1</i>	chr8:119122431G >GT	1	c.854dupA	p.His285 Glnfs*4	Мутация сдвига рамки считывания	Nykamp K. et al., 2017	МПС, секвенирование по Сэнгеру
13	12	Пробанд	AA8907	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс-мутация	Pedrini E. et al., 2005	МПС, секвенирование по Сэнгеру
14	12	Мать	AA8908	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс-мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвенирование по Сэнгеру
15	12	Двоюродный	AA4063	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс-мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвенирование по Сэнгеру

Продолжение Таблицы 15

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
16	12	Дядя	B3766	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс- мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвениро- вание по Сэнгеру
17	12	Тетя	B5872	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс- мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвениро- вание по Сэнгеру
18	12	Двою- родная	B5873	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс- мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвениро- вание по Сэнгеру
19	12	Двою- род- ный	B5874	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс- мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвениро- вание по Сэнгеру
20	13	Про- банд	AA4741/ B5923	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс- мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвениро- вание по Сэнгеру
21	13	Отец	B5922	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс- мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвениро- вание по Сэнгеру
22	13	Дядя	AA3757	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс- мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвениро- вание по Сэнгеру
23	13	Тетя	AB3118/ B6092	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс- мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвениро- вание по Сэнгеру
24	13	Дядя	B6932	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс- мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвениро- вание по Сэнгеру
25	13	Тетя	B6093	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс- мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвениро- вание по Сэнгеру

Продолжение Таблицы 15

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
26	14	Пробанд	658/1121	Якутка	<i>EXT1</i>	chr8:117837145 C>T	2	c.1019G>A	p.Arg340His	Миссенс-мутация	Raskind W.H. et al., 1998	МПС, секвенирование по Сэнгеру
27	14	Мать	657/1120	Якутка	<i>EXT1</i>	chr8:117837145 C>T	2	c.1019G>A	p.Arg340His	Миссенс-мутация	Raskind W.H. et al., 1998	Секвенирование по Сэнгеру
28	14	Двоюродный	2506/ АБ3438	Якут	<i>EXT1</i>	chr8:117837145 C>T	2	c.1019G>A	p.Arg340His	Миссенс-мутация	Raskind W.H. et al., 1998	Секвенирование по Сэнгеру
29	16	Пробанд	АБ4706	Украинец	<i>EXT1</i>	chr8:118825119 TTGAAAGCA CCG>T	8	c.1703_171 3delCGGT GCTTTCA	p.Thr568 Asnfs*16	Мутация сдвига рамки считывания	Новый	МПС, секвенирование по Сэнгеру
30	17	Пробанд	АБ9198	Якут	-		-	-	-	Не обнаружено	-	МПС
31	19	Пробанд	АА1685	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	МПС, секвенирование по Сэнгеру
32	20	Пробанд	АА3748	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	МПС, секвенирование по Сэнгеру
33	21	Пробанд	1612/ АА701	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	МПС, секвенирование по Сэнгеру
34	21	Мать	1613/ АА702	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	Секвенирование по Сэнгеру

Продолжение Таблицы 15

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
35	22	Пробанд	AA8148	Русский	<i>EXT1</i>	chr8:118812091 G>A	11	c.2101C>T	p.Arg701*	Нонсенс-мутация	Seki H. et al., 2001	МПС, секвенирование по Сэнгеру
36	23	Пробанд	AA7374	Якутка	<i>EXT1</i>	chr8:118819454 A>T	3' UTR	c.1883+2T>A		Мутация в сайте сплайсинга	Seki H. et al., 2001	МПС, секвенирование по Сэнгеру
37	23	Мать	AA7375	Якутка	<i>EXT1</i>	chr8:118819454 A>T	3' UTR	c.1883+2T>A		Мутация в сайте сплайсинга	Seki H. et al., 2001	Секвенирование по Сэнгеру
38	23	Сибс	AA7461	Якутка	<i>EXT1</i>	chr8:118819454 A>T	3' UTR	c.1883+2T>A		Мутация в сайте сплайсинга	Seki H. et al., 2001	Секвенирование по Сэнгеру
39	24	Пробанд	AB3695	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	МПС, секвенирование по Сэнгеру
40	27	Племянница	AA8214	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	Секвенирование по Сэнгеру
41	27	Племянница	AA8215/3077	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	Секвенирование по Сэнгеру
42	27	Пробанд	AA8280	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	МПС, секвенирование по Сэнгеру
43	27	Двоюродный	530	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	Секвенирование по Сэнгеру

Продолжение Таблицы 15

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
44	28	Пробанд	149	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс-мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвенирование по Сэнгеру
45	28	Сын	B5901	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44146346 C>T	5	c.751C>T	p.Gln251*	Нонсенс-мутация	Pedrini E. et al., 2005	Секвенирование по Сэнгеру
46	30	Пробанд	1116	Русская	-	-	-	-	-	Не обнаружено	-	МПС
47	30	Сибс	1117	Русская	-	-	-	-	-	Не обнаружено	-	-
48	30	Отец	1115	Русский	-	-	-	-	-	Не обнаружено	-	-
49	31	Пробанд	AA749	Якут	-	-	-	-	-	Не обнаружено	-	МПС
50	32	Пробанд	AA2108	Якут	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	МПС, секвенирование по Сэнгеру
51	34	Пробанд	AB4017	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	МПС, секвенирование по Сэнгеру
52	35	Пробанд	AB403	Якутка	<i>EXT2</i>	chr11:44108018 CA>C	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Мутация сдвига рамки считывания	Jamsheer A. et al., 2014	МПС, секвенирование по Сэнгеру
53	37	Пробанд	AA4363	Татарин	-	-	-	-	-	Не обнаружено	-	МПС
54	38	Пробанд	AB2007	Эвенк	-	-	-	-	-	Не обнаружено	-	МПС
55	38	Сибс	AB2008	Эвенкийка	-	-	-	-	-	Не обнаружено	-	-

Окончание Таблицы 15

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
56	40	Пробанд	B7322	Якутка	<i>EXT1</i>	chr8:117837145 C>T	2	c.1019G>A	p.Arg340His	Миссенс-мутация	Raskind W.H. et al., 1998	МПС, секвенирование по Сэнгеру
57	41	Пробанд	B6271	Якутка	-	-	-	-	-	Не обнаружено	-	МПС

3.3.4. Результаты валидации выявленных вариантов нуклеотидной последовательности в гене *EXT1*

В гене *EXT1* выявлены 8 мутаций, у 1 больного из украинской семьи, 3 русских, 5 якутских неродственных семей (Таблица 16).

Таблица 16 – Спектр выявленных вариантов в гене *EXT1*

Ген	Экзон	Мутация	АК замена	Этнический состав	Количество семей	Количество больных
<i>EXT1</i>	1	c.854dupA	p.His285Glnfs*4	Русская	1	1
<i>EXT1</i>	2	c.970delT	p.Tyr324Phefs*35	Русская	1	1
<i>EXT1</i>	2	c.1003delC	p.Leu335Trpfs*24	Якут	1	1
<i>EXT1</i>	2	c.1019G>A	p.Arg340His	Якуты	2	4
<i>EXT1</i>	4	c.1171delT	p.Ser391Leufs*12	Якутка	1	1
<i>EXT1</i>	8	c.1703_1713del CGGTGCTTTCA	p.Thr568Asnfs*16	Украинец	1	1
<i>EXT1</i>	9	c.1883+2T>A	в сайте сплайсинга	Якуты	1	3
<i>EXT1</i>	11	c.2101C>T	p.Arg701*	Русский	1	1
Всего		8		9		13

Семья № 1 (ДНК № АА 5124) – пациент из русской семьи, подтвержден вариант сдвига рамки считывания c.970delT (p.Tyr324Phefs*35) во 2 экзоне (Рисунок 20). У больного были опухлевидные образования неправильной формы на бедренных костях. Также экзостозы отмечались на плечевой кости и на малоберцовых костях. Наблюдалось онемение пальцев руки, боли в ногах, прогрессирующее течение заболевания, позже экзостозы появились на руках и на ногах, оперативное лечение было проведено 3 раза.

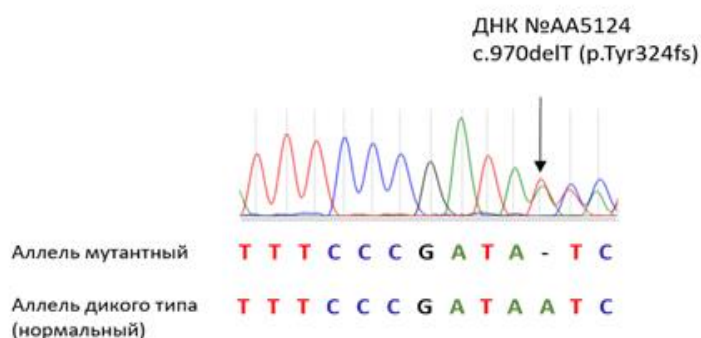


Рисунок 20 – Результат секвенирования по Сэнгеру пациента (ДНК №AA5124)

Семья № 6 (ДНК № AA3874) – пациент из якутской семьи, валидирована мутация сдвига рамки считывания c.1171delT (p.Ser391Leufs*12) в 4 экзоне (Рисунок 21). У пациента имеются множественные экзостозы на кисти рук с укорочением диафизов, подвывих средней фаланги. Ограничение движений в обеих лучезапястных костях, деформация кистей рук, укорочение левой руки. Множественные костно-хрящевые экзостозы отмечаются на костях предплечья с обеих сторон, с деформацией локтевых костей. Экзостозы также на бедренных костях, множество экзостозов визуализируется на большеберцовых и малоберцовых костях. Жалобы на боли в руках и ногах, в динамике размеры экзостозов увеличивались. Оперативное лечение проведено 3 раза по поводу удаления экзостозов. Инвалид по заболеванию.

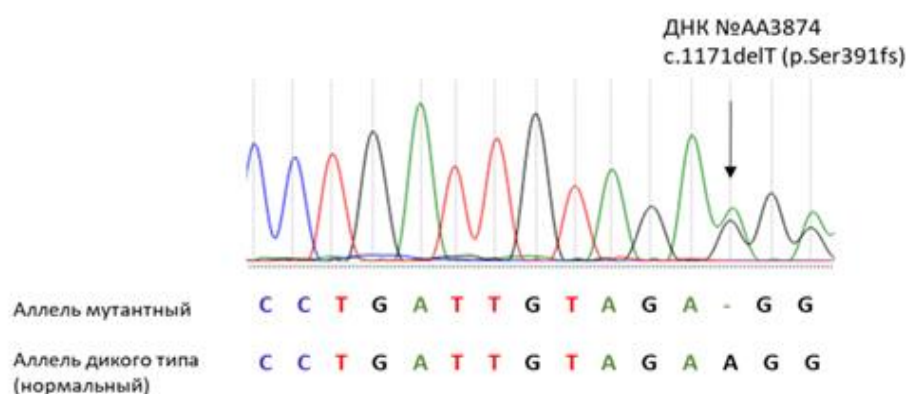


Рисунок 21 – А. Результат секвенирования по Сэнгеру пациента (ДНК №AA3874)

Семья № 7 (ДНК № AA2283) – пациент из 1 якутской семьи, множественные разрастания были на руках и на ногах. В 5 лет экзостоз появился на лопатке, который самостоятельно исчез. Костные множественные разрастания были на плечевой кости с обеих сторон, на ребрах, в коленном и голеностопном суставах. Ограничение подвижности наблюдалось в верхних конечностях и тыльном сгибании левого голеностопного сустава. Также экзостозы наблюдались в метафизах большеберцовых и малоберцовых костей, метафизы деформированы, имеется сращение берцовых костей. На инвалидности по заболеванию с 5 лет. Подтверждена секвенированием по Сэнгеру новая гетерозиготная мутация сдвига рамки считывания c.1003delC (p.Leu335Trpfs*24) в гене *EXT1*, расположенная во 2 экзоне (Рисунок 22).

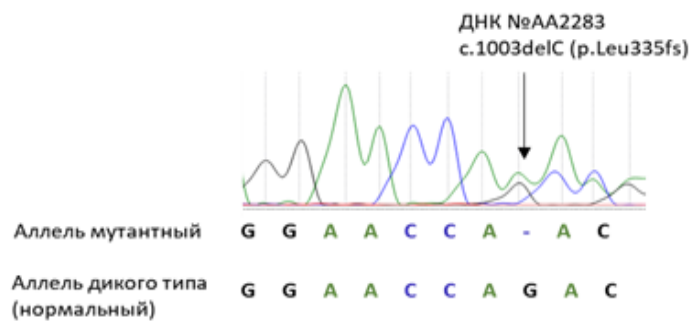


Рисунок 22 – Результат секвенирования по Сэнгеру пациента (ДНК №AA2283)

Семья № 11 (ДНК № 686) – пациент из русской семьи, экзостозы были на лопатке, груди, на ребрах, на кистях рук размерами от 0,5 до 2 см, отмечалась деформация левой плечевой кости, где располагался болезненный экзостоз размером 4х3х5 см, укорочение руки на 2–3 см. У больного подтвержден вариант в гене *EXT1* c.854dupA (p.His285Glnfs*4) в 1-м экзоне (Рисунок 23).

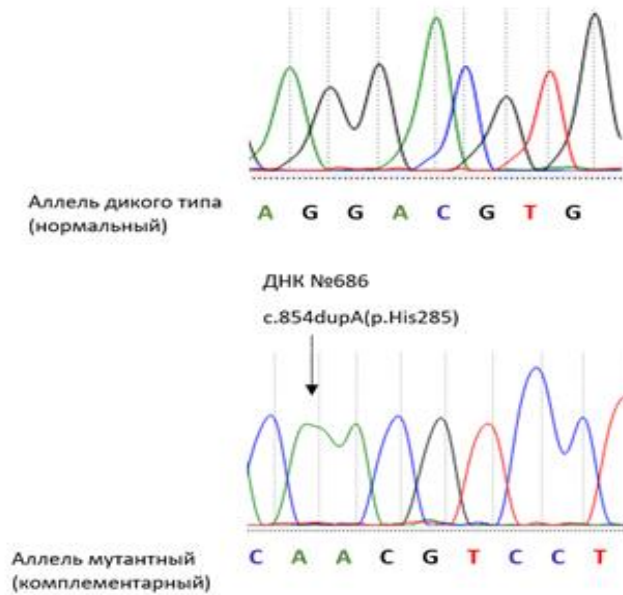


Рисунок 23 – А. Результат секвенирования по Сэнгеру пациента (ДНК №686) нормальный/мутантный

Была валидирована известная миссенс-мутация c.1019G>A (p.Arg340His) во 2 экзоне в гене *EXT1* (рисунок 24, Б) и обнаружена у 4 пациентов из 2 неродственных якутских семей. Семья № 14 – у пробанда (ДНК № 658/1121) имелись холмовидные экзостозы на руках и ногах, груди, на ребрах размерами 1,5x1,3x1 см (образование вогнуто в полость грудной клетки на 1,5 см), на лопатке, деформация плечевой кости, имеется экзостоз размером 4x2 см, болезненное движение в суставах, оперирован 3 раза. Инвалид по заболеванию. Такая же мутация была выявлена у матери пробанда (ДНК № 657/1120), экзостозы имеются в плечевой кости размером 2,0x0,9 см, отмечалась деформация плечевой кости, экзостозы также были в области тазовой кости, на ногах экзостозы были больших размеров, (ДНК № 2506/АБ3438) у двоюродного родственника костно-хрящевые экзостозы были на руках и на ногах, на ребрах, на лопатках. Укорочение правой руки, ограничение подвижности в локтевых суставах, деформация в коленных суставах слева. Инвалид III группы. Ввиду отсутствия образца ДНК у сибса III (3) из семьи №14 не был проведен молекулярно-генетический анализ (рисунок 24, А). Множественное вы-

равнивание аминокислотных последовательностей белка EXT1 у разных видов позвоночных показало, что p.Arg340His находится в высококонсервативном участке, что говорит об его высокой функциональной значимости (Рисунок 24, В). Сегрегационный анализ, сопоставление с фенотипом пациентов свидетельствуют в пользу связи выявленного варианта с МЭХД и позволяют предположить, что для данной семьи выявленная мутация с.1019G>A (p.Arg340His) является причиной заболевания.

Следующий больной с данной мутацией из неродственной семьи № 40 (ДНК № В7322), экзостозы были на ребрах, на плечевой кости слева, в области колен с обеих сторон, на бедренных костях, на большеберцовых костях.

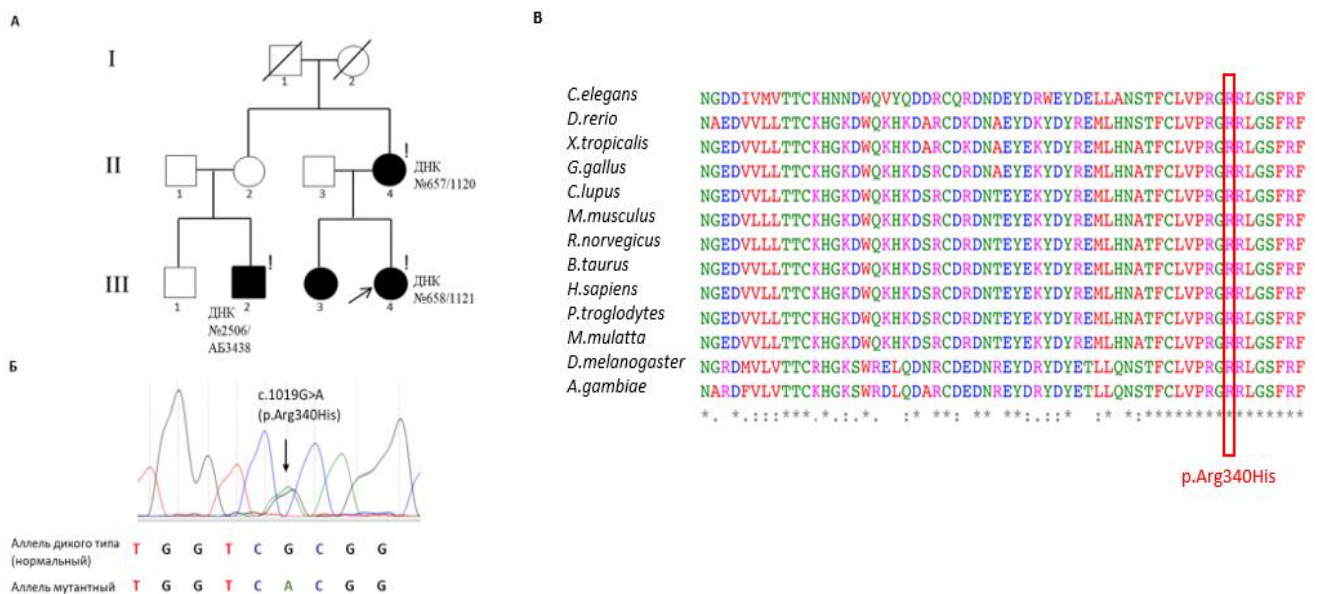


Рисунок 24 – А. Родословная семьи №14; Б. Результат секвенирования по Сэнгеру идентифицированной мутации с.1019G>A (p.Arg340His); В. Результат множественного выравнивания аминокислотных последовательностей белка EXT1 у различных видов позвоночных, где p.Arg340His – высококонсервативный

В результате секвенирования по Сэнгеру у больного из украинской семьи № 16 (ДНК № АБ4706) была обнаружена делеция длиной 11 п.н. в 8 экзоне в гене *EXT1* с.1703_1713delCGGTGCTTTCA (p.Thr568Asnfs*16) в гетерозиготном состо-

янии (Рисунок 25). Экзостозы были на ребрах, на лопатке, на руках и на ногах. Левая рука была деформирована, искривлена. Ограничение движения в плечевом суставе слева, локтевом незначительно, на кистях рук ограничение движения в межфаланговых суставах. Экзостозы на лучевой кости, в лучезапястном суставе, рука левая короче правой на 2 см, правая рука ограничена в разгибании $<170^\circ$ в локтевом суставе. Правая нога короче левой на 1,5 см, костные выступы в области голеностопного сустава, вальгусная деформация голеней. Оперативное лечение проведено 3 раза. Инвалид по заболеванию.

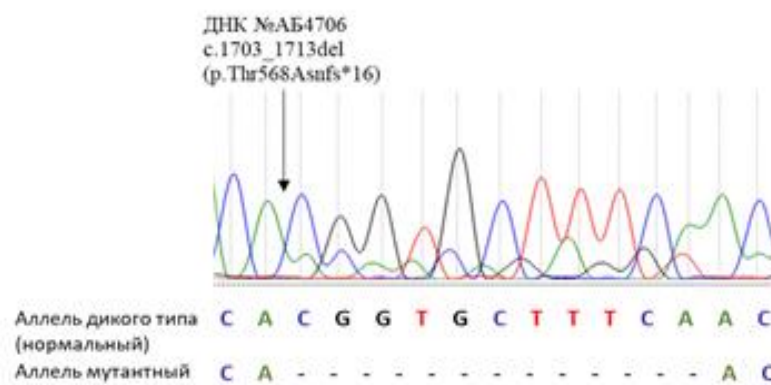


Рисунок 25 – А. Результат секвенирования по Сэнгеру пациента (ДНК №ААБ4706)

Следующая точечная мутация подтверждена у 1 больного из русской семьи №22 (ДНК № АА8148), в гене *EXT1* с.2101C>T (p.Arg701*) в гетерозиготном состоянии (Рисунок 26).

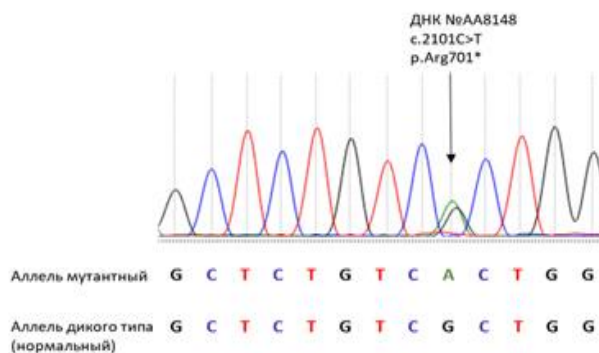


Рисунок 26 – Результат секвенирования по Сэнгеру пациента (ДНК №АА8148)

У больного было образование в шейном отделе позвонка, исходящее из дорсальной дужки С3 позвонка с грубой компрессией спинного мозга, похожее на остеому.

Валидирована мутация в сайте сплайсинга с.1883+2Т>А в гене *EXT1* у 3 пациентов с МЭХД из 1 якутской семьи №23. У пробанда (№АА7374) костные наросты в области правой кисти, крупный экзостоз на 5 ребре слева размером 3х0,4х1,1 см, множественные мелкие экзостозы на 3, 4, 7, 9 ребрах слева, на 10 ребре экзостоз диаметром 0,5 см, справа на 3 и на 5 ребрах. Также экзостозы на лучезапястном суставе справа, на нижней трети малоберцовой кости. Боли в местах образований, подвывих левой руки. Сибс (ДНК №АА7461) – плотные наросты на правой плечевой кости экзостоз с шириной основания 4 см и высотой 2 см, боли в межфаланговых суставах пальцев обеих кистей рук, в области коленных суставов, умеренная болезненность, ограничение движения в руках, оперирован по удалению экзостозов. Отягощенность по линии матери. У матери (ДНК №7375) экзостоз был в коленном суставе (Рисунок 27, А, Б). Замена нуклеотида в донорном сайте (5'-конец 9 интрона) нарушает нормальный сплайсинг 9 экзона с 10.

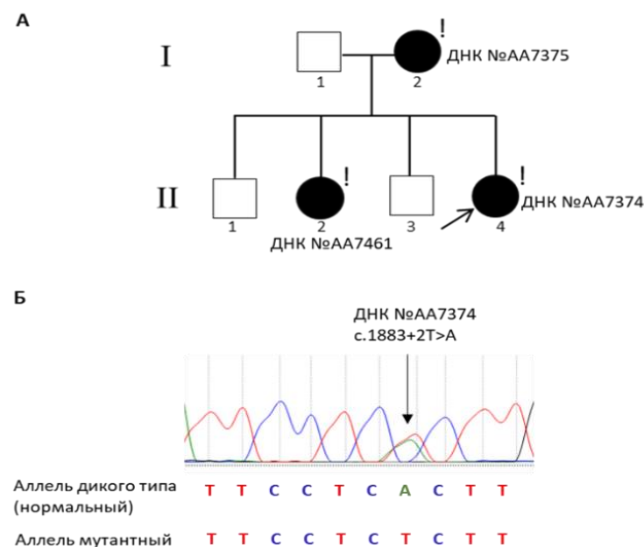


Рисунок 27 – А. Родословная семьи №14; Б. Результат секвенирования по Сэнгеру идентифицированного варианта с.1883+2Т>А

3.3.5. Результаты валидации выявленных вариантов нуклеотидной последовательности в гене *EXT2*

В гене *EXT2* выявлены 2 мутации, которые оказались мажорными и характерны только для якутских семей (Таблица 17).

Таблица 17 – Спектр выявленных вариантов в гене *EXT2*

Ген	Экзон	Мутация	АК замена	Этнический состав	Количество семей	Количество больных
<i>EXT2</i>	2	c.310delA	p.Ile104fs*8	Якуты	12	17
<i>EXT2</i>	5	c.751C>T	p.Gln251*	Якуты	4	18
Всего		2		2	16	35

Валидирована известная мутация сдвига рамки считывания c.310delA (p.Ile104fs*8) во 2 экзоне в гене *EXT2*. Данная мутация обнаружена у 17 пациентов из 12 неродственных семей якутской этнической группы (Рисунок 28, Б).

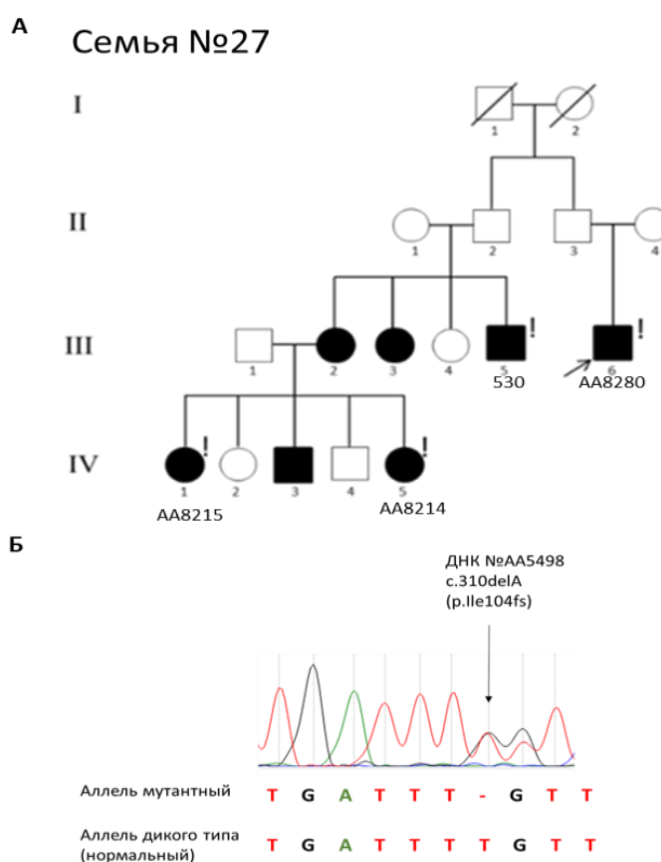


Рисунок 28 – А. Родословная семьи №27; Б. Результат секвенирования по Сэнгеру идентифицированного варианта c.310delA (p.Ile104fs*8)

У пациента из семьи № 5 – (ДНК №АА1774) множественные костные выросты на правой плечевой кости, укорочение правого предплечья на 3 см, левого на 2 см, локтевая кость также укорочена, лучезапястный сустав деформирован, костно-хрящевые экзостозы имеются на бедренных костях, обеих голених, деформированы, утолщены, укорочение левой голени на 2,5 см (хромает). Ограничение движения верхних и нижних конечностей. Перенес 5 оперативных вмешательств по поводу удаления экзостозов. Инвалид по заболеванию.

У пациента из семьи № 8 – (ДНК №АА5498) экзостозы на груди, на ребрах, на плечевой кости, на кистях рук, на бедренных, большеберцовых костях, в коленном и голеностопном суставах, имеются различной формы экзостозы размерами до 3 см, вальгусная деформация левого коленного сустава, в левой малоберцовой кости – 1,8 см, укорочение правой ноги на 2 см, трудности при ходьбе. Оперирован 2 раза по удалению экзостозов в области костей голени. Инвалид по заболеванию.

У пациента их семьи № 9 – (ДНК №934) в области правой плечевой кости имеется экзостоз размером 2,5х0,8 см, в левой плечевой кости экзостоз размером 0,4 см, на ребрах, на кистях рук. В коленном суставе экзостозы размерами 1,3–2,5 см, в большеберцовой 3,5–2 см, в малоберцовой 2–0,8 см, по задней поверхности метафиза бедренной кости 1,5–0,8 см и 2,5–1,3 см, по заднелатеральной поверхности большеберцовой кости 3–2 см. Ограничение подвижности верхних и нижних конечностей. Оперативное лечение по поводу удаления экзостозов. Инвалид по заболеванию.

У пробанда из семьи № 10 – (ДНК №АА3) на правой плечевой кости экзостозы с линейным наростом, в коленном суставе множественные холмовидные экзостозы, на голени, на правом бедре, большеберцовой, малоберцовой костях. Оперирован 2 раза. (ДНК № АА4) у отца – экзостоз в коленном суставе.

У пациента из семьи № 19 – (ДНК №АА1685) экзостозы на бедренных костях, большеберцовой, малоберцовой, укорочение конечностей, деформация костей. Оперирован по поводу заболевания. Инвалид III группы.

У пациента из семьи № 20 – (ДНК №АА3748) экзостозы на ребрах, на плечевой кости справа, на передней поверхности экзостоз размером 1,2 см, на внутренней два экзостоза размерами 4–5 мм, слева два экзостоза размерами 7 мм, на бедренных, большеберцовых, малоберцовых костях, в коленном суставе, ограничение подвижности верхних и нижних конечностей. Оперативное лечение 3 раза, инвалид по заболеванию.

У пробанда из семьи № 21 – (ДНК 1612/АА701) – в шейном отделе позвоночника образование плотной консистенции размером 8х5 см, экзостозы в области большеберцовой кости справа и в метафизе бедренных костей. Оперирован 2 раза по поводу удаления образования в области шейного позвонка. (ДНК № 1613/АА702) мать – экзостоз в коленном суставе.

У пациента из семьи № 24 – (ДНК АБ3695) экзостозы на левой лопатке, в локтевом суставе, в левом лучезапястном суставе, в правой лучевой кости, в обеих бедренных костях, в правой большеберцовой кости, в малоберцовой кости. В семье 3 детей, у всех экзостозная болезнь (ДНК отсутствует), отягощенность по материнской линии.

У пробанда из семьи № 27 – (ДНК №АА8280) (рисунок 28 А) – экзостозы на плечевой кости, деформация костей предплечья справа (дугообразная), экзостозы в большеберцовых, малоберцовых костях, вальгусная деформация большеберцовой кости справа, сращение берцовых костей. (ДНК №530) экзостозы на ребрах, на кисти рук, в области голеней, в локтевом суставе, справа отмечается искривление, укорочение локтевой кости, в большеберцовой кости, в малоберцовой кости, в коленном суставе. (ДНК №АА8214) костное образование в области грудины, на ребрах, на плечевой кости, в области лопатки справа, в коленном суставе, в голеностопном суставе. (ДНК №АА8215) экзостозы в большеберцовой кости, малоберцовой кости, в коленном суставе, трудности при ходьбе (не могла ходить).

У пациента из семьи № 32 – (ДНК №АА2108) костно-хрящевые экзостозы обеих плечевых костей, большеберцовых костей, малоберцовых костей, укорочение правой ноги, деформация костей. Инвалид по заболеванию.

У пациента из семьи № 34 – (ДНК №АБ4017) экзостозы на ребрах, на лопатке, на бедренных костях, на большеберцовых, малоберцовых костях, в коленном суставе, в голеностопном суставе. Оперативное лечение 3 раза по поводу удаления экзостозов.

У пациента из семьи № 35 – (ДНК №АБ403) экзостозы на плечевой кости, в бедренных костях, на большеберцовой кости, тазобедренном суставе, ограничение подвижности верхних и нижних конечностей, трудности при ходьбе, укорочение конечности, деформация костей.

Подтверждена известная нонсенс-мутация с.751C>T (p.Gln251*) на 5 экзоне в гене *EXT2*. Выявленный вариант обнаружен у 18 пациентов из 4 неродственных семей якутской этнической группы (Рисунок 29 Б).

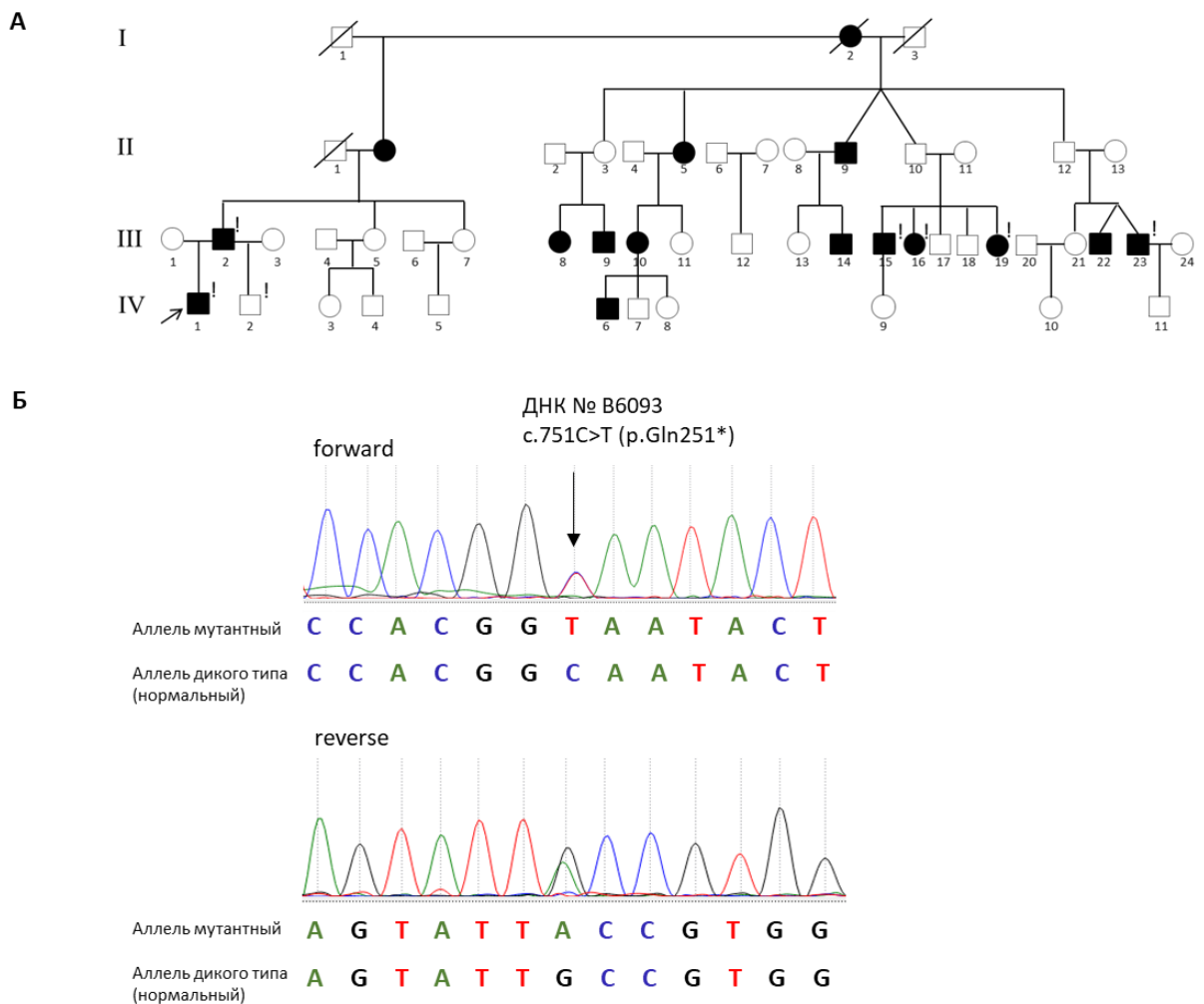


Рисунок 29 – А. Родословная семьи № 13; Б. Результат секвенирования по Сэнгеру идентифицированной мутации с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2*

У пациента из семьи № 2 – подтвердили у 3 больных из этой семьи. Пробанд (ДНК №6280) – имеется плотное образование в верхней части правой плечевой кости диаметром 3 см, в верхней части правой голени образование диаметром 1,5 см, отмечаются небольшие множественные наросты по нижнему краю 4, 6, 7 ребер, множественные костно-хрящевые экзостозы в дистальных и проксимальных метафизах бедренных и костей голени с обеих сторон. У сибса (ДНК №B8642) – экзостозы на лопатке, на кистях рук, в коленном суставе, на ребрах. У матери (ДНК №B8643) – на плечевой кости, коленном суставе.

У пациента из семьи № 12 – для подтверждения того, что выявленная мутация является причиной заболевания, мы провели секвенирование 5 экзона гена *EXT2* у 11 членов данной семьи, из них мутация с.751C>T (p.Gln251*) выявлена у 7 членов, у остальных 4 членов без фенотипа данная мутация не идентифицирована.

Пробанд (ДНК №AA8907) на плечевой кости на обеих руках имелись экзостозы размерами: слева 5х6 см, справа 2х3 см. Левая рука была укорочена из-за наличия экзостозов в области локтевой и лучевой костей. На правой ноге экзостозы располагались в области костей голени и на тыльной поверхности стопы. Справа в проксимальном метафизе плечевой кости по задней наружной поверхности имеется холмовидный экзостоз размером 3х1 см. Слева в верхней и средней трети диафиза по задней внутренней поверхности – холмовидный экзостоз размером 7х1,5 см и шиловидный по наружной поверхности размером 1х0,3 см. Также искривление костей предплечья, ульнарная девиация кистей, укорочение левой руки, ограничение пронации справа. Пробанд имела инвалидность III группы. От оперативного лечения отказалась. При повторном осмотре через несколько лет размеры экзостозов увеличились, на уровне средней трети диафиза, по наружной поверхности левой плечевой кости костно-хрящевой нарост на широком основании неоднородной структуры, неправильной формы, размером 9,7х4 см. На уровне средней трети диафиза лучевой кости по внутренней поверхности выявляется костный нарост с ровными, четкими контурами размером 2,9х1,2 см. У матери (ДНК №8908) – экзостоз в плечевой кости.

Родственники – (ДНК № 4063) экзостозы на левой плечевой кости, лучевой кости, кисть отклонена в тыльную сторону, косорукость справа, укорочение костей правого предплечья, подвывих головки правой лучевой кости. В дистальных метафизах бедренных костей с обеих сторон и проксимальных метафизах большеберцовой и малоберцовой костей имеются холмовидные и линейные экзостозы. Оперативное лечение проведено 2 раза. Инвалид по заболеванию. (ДНК №B3766) – экзостоз в коленном суставе. (ДНК №5873) – экзостозы на плечевой кости, в локтевом суставе, в лучезапястном суставе, на кистях рук, в коленном суставе, ограничение верхних конечностей, укорочение левой руки, деформация костей. (ДНК №B5874) – экзостозы в плечевой кости, локтевом суставе, лучезапястном суставе, на ногах в большеберцовой кости, коленном суставе. (ДНК №B5872) – экзостоз имеется в коленном суставе.

Сегрегационный анализ, сопоставление с фенотипом пациентов позволяют предположить, что для данной семьи выявленная мутация с.751C>T (p.Gln251*) является причиной заболевания.

У пациента из семьи № 13 – подтверждена мутация с.751C>T (p.Gln251*) у 5 членов семьи (Рисунок 29, А). Пробанд (ДНК № АА4741) – экзостозы имеются на плечевой кости, на бедренной, большеберцовой, малоберцовой костях. Оперативное лечение проведено 2 раза. У отца (ДНК № В5922) экзостоз в коленном суставе.

Родственники – (ДНК № АА3757) – экзостозы на плечевой кости и в коленном суставе. (ДНК № АБ3118) – экзостоз на бедренной кости, укорочение правой ноги (хромает), оперирована по поводу костно-хрящевого экзостоза дистального метафиза правой бедренной кости. Инвалид по заболеванию. (ДНК № В6932) – экзостоз в коленном суставе. (ДНК № В6093) экзостозы на плечевой кости и в коленном суставе.

У пробанда из семьи № 28 – подтвержден данный вариант. Пробанд (ДНК №149) – опухлевидное образование на затылке размером 0,5 см. Экзостозы также имеются на плечевой кости (аномалия костей предплечья с обеих сторон), локтевые кости укорочены, дугообразной формы, лучевые кости искривлены, подвывих лу-

чевой кости, локтевые суставы деформированы, в лучезапястном суставе, укороченная пятая пястная кость левой кисти, слабость в руках, онемение, ограничение движения правой кисти рук, крючковидные отростки на позвонке. Хирургическое лечение по поводу хондромы на коленных суставах. Сын (ДНК № B5901) – экзостозы на плечевой кости, в коленном суставе.

Таким образом, были проанализированы образцы геномной ДНК $n=68$ индивидов, из которых 57 – больные с МЭХД, 11 – здоровые родственники.

Нами идентифицировано 10 вариантов нуклеотидной последовательности в генах *EXT1*, *EXT2* у 48 (84,2%) больных из 25 неродственных семей, 3 мутации (с.970delT (p.Tyr324Phefs*35), с.1003delC (p.Leu335Trpfs*24), с.1703_1713delCGGTGCTTTCA (p.Thr568Asnfs*16) в гене *EXT1* были новыми, что расширило спектр мутаций в генах *EXT1* и *EXT2*. При этом мутация с.310delA (p.Ile104fs*8) в гене *EXT2* обнаружена в 12 неродственных семьях, а мутация с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2* – в 4 семьях. Наблюдаемая частота семей с одной и той же мутацией в условиях компактной этнической группы указывает на возможный эффект основателя. У 9 больных из 6 неродственных семей в генах *EXT1* и *EXT2* мутация не установлена. Возможно, молекулярно-генетические причины не могут быть идентифицированы с помощью анализа клинического экзоза.

По нашим данным у населения Якутии, в отличие от других популяций, высокая частота мутаций отмечается в гене *EXT2*. Так частота мутаций в гене *EXT1* составила 27,1%, а в гене *EXT2* – 72,9%. Результаты исследования свидетельствуют в пользу строгой ассоциации выявленных вариантов генов с клинической картиной больных с МЭХД. В контрольной группе здоровых родственников больных идентифицированные нами мутации не выявлены.

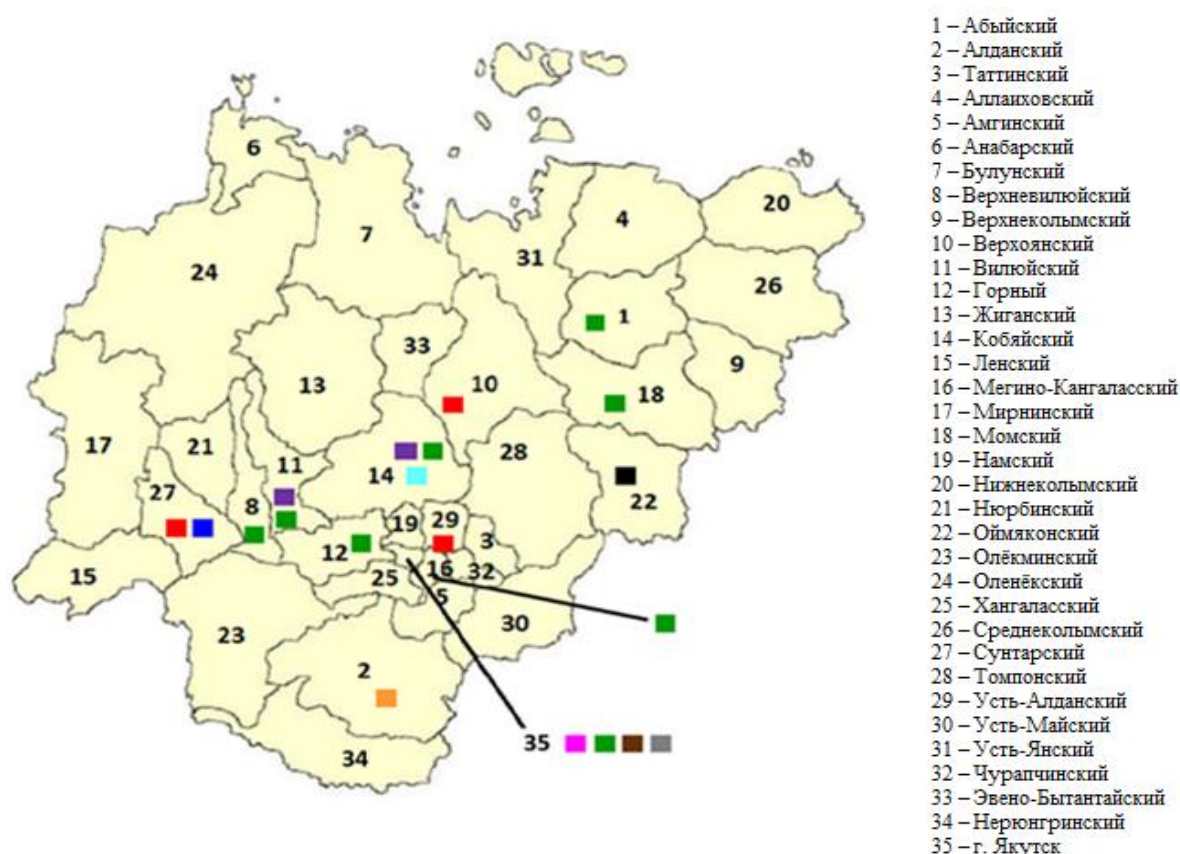
3.4. Распределение выявленных мутаций в генах

***EXT1/EXT2* по районам (улусам) РС (Я)**

Распределение выявленных 10 мутаций (48 больных с МЭХД) в генах *EXT1* и *EXT2* по улусам РС (Я) представлено на рисунке 30. Больные проживали в следу-

ющих улусах: Абыйский, Алданский, Верхневиллюйский, Верхоянский, Виллюйский, Горный, Кобяйский, Мегино-Кангаласский, Момский, Оймяконский, Сунтарский, Усть-Алданский и г. Якутск (Рисунок 30).

Районы (улусы) и городской округ Республики Саха (Якутия)



■ - с.854dupA*	■ - с.970delT*	■ - с.1003delC*	■ - с.1019G>A*
■ - с.1171delT*	■ - с.1703_1713delCGGTGCTTTCA*	■ - с.1883+2T>A*	
■ - с.2101C>T*	■ - с.310delA**	■ - с.751C>T**	

Примечание: * мутации в гене *EXT1*; ** мутации в гене *EXT2*

Рисунок 30– Распределение мутаций в генах *EXT1* и *EXT2* по районам (улусам) и городского округа г. Якутска

Из общего числа найденных мутаций наиболее распространенными являются 2 мутации (с.310delA (p.Ile104fs*8), с.751C>T (p.Gln251*)) в гене *EXT2*. Мутация

с.310delA (p.Ile104fs*8) в гене *EXT2* обнаружена у больных в 7 улусах и 1 городском округе: Абыйском, Верхневилуйском, Вилуйском, Горном, Кобяйском, Мегино-Кангаласском, Момском и г. Якутске. Вторая мутация с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2* выявлена у больных в 3 улусах: Верхоянском, Сунтарском и Усть-Алданском.

Наиболее широкий спектр мутаций зарегистрирован в г. Якутске и Кобяйском улусе, а более узкий спектр – в Вилуйском и Сунтарском улусах.

В г. Якутске выявлены 3 мутации в гене *EXT1*: с.854dupA (p.His285Glnfs*4) – 1 больной, с.1883+2T>A – 3 больных, с.2101C>T (p.Arg701*) – 1 больной; 1 мутация в гене *EXT2*: с.310delA (p.Ile104fs*8) – 4 больных. В Кобяйском улусе выявлены 2 мутации в гене *EXT1*: с.1703_1713delCGGTGCTTTCA (p.Thr568Asnfs*16) – 1 больной, с.1019G>A (p.Arg340His) – 1 больной; 1 мутация в гене *EXT2*: с.310delA (p.Ile104fs*8) – 4 больных.

В Вилуйском улусе обнаружены 1 мутация в гене *EXT1*: с.1019G>A (p.Arg340His) – 3 больных; 1 мутация в гене *EXT2*: с.310delA (p.Ile104fs*8) – 5 больных. В Сунтарском улусе выявлена 1 мутация в гене *EXT1*: с.1171delT (p.Ser391Leufs*12) – 1 больной; 1 мутация в гене *EXT2*: с.751C>T (p.Gln251*) – 14 больных. В остальных улусах зарегистрированы единичные случаи.

3.5. Гено-фенотипический анализ больных с мутациями в генах *EXT1/EXT2*

Выборку для гено-фенотипического анализа составили 48 больных с МЭХД. Результаты сравнительного анализа частоты экзостозов по изученным локализациям и частоты клинической характеристики больных с МЭХД в зависимости от исследованных генов показали, что статистически значимые различия отсутствуют (Таблица 18, 19).

Результаты исследования локализации экзостозов при мутациях в гене *EXT1* показали, что при мутации с.854dupA (p.His285Glnfs*4) локализация экзостозов чаще встречается на груди, лопатке, кистях рук. Для данной мутации характерно

укорочение конечностей. Экзостозы на кистях рук часто встречаются и при мутации с.970delT (p.Tyr324Phefs*35).

Носители этой мутации чаще обращаются за хирургической помощью. С мутацией с.1003delC (p.Leu335Trpfs*24) ассоциируется ограничение подвижности нижних конечностей.

Таблица 18 – Сравнительная характеристика локализации экзостозов при мутациях в генах *EXT1* и *EXT2*

№	Локализация экзостозов	<i>EXT1</i>		<i>EXT2</i>		χ^2	<i>p</i>
		Частота	%	Частота	%		
1	Затылок	0	0,00	1	0,65	26,64	0,094
2	Позвоночный столб	1	1,47	2	1,30		
3	Грудина	2	2,94	2	1,30		
4	Ребра	14	20,59	10	6,49		
5	Лопатка	5	7,35	4	2,60		
6	Плечевая кость	12	17,65	30	19,48		
7	Локтевой сустав	3	4,41	7	4,55		
8	Лучевая кость	1	1,47	4	2,60		
9	Лучезапястный сустав	2	2,94	5	3,25		
10	Кисти рук	7	10,29	6	3,90		
11	Тазовая кость	1	1,47	0	0,00		
12	Тазобедренный сустав	0	0,00	1	0,65		
13	Бедренная кость	3	4,41	17	11,04		
14	Большеберцовая кость	4	5,88	22	14,29		
15	Малоберцовая кость	4	5,88	18	11,69		
16	Коленный сустав	7	10,29	21	13,64		
17	Голеностопный сустав	2	2,94	3	1,95		
18	Стопа	0	0,00	1	0,65		
Всего		68	100	154	100		

При этом экзостозы чаще встречаются на голеностопном суставе и на лопатке. Больные с данной мутацией значительно реже обращаются к хирургу. При мутации с.1019G>A (p.Arg340His) экзостозы чаще локализуются на грудине, лопатке, тазовой кости, коленном суставе и реже могут встречаться на кистях рук и малоберцовой кости.

Мутация с.1171delT (p.Ser391Leufs*12) характеризуется экзостозами на локтевом суставе. Для мутации с.1703_1713delCGGTGCTTTCA (p.Thr568Asnfs*16) характерно появление экзостозов на лучевой кости, лучезапястном суставе, голеностопном суставе. Особенностью мутации с.1883+2T>A является появление экзостозов на ребрах и на кистях рук с последующим ограничением подвижности верхних конечностей. При данной мутации экзостозы редко встречаются на бедренных костях и большеберцовой кости. Экзостозы на позвоночном столбе встречались только у носителей мутации с.2101C>T (p.Arg701*).

Таблица 19 – Сравнительный анализ клинической характеристики больных с МЭХД при мутациях в генах *EXT1* и *EXT2*

№	Клинические симптомы	<i>EXT1</i>		<i>EXT2</i>		χ^2	<i>p</i>
		Частота	%	Частота	%		
1	Укорочение конечностей	6	12,00	16	19,05	7,36	0,288
2	Деформация костей	15	30,00	20	23,81		
3	Ограничение подвижности верхних конечностей	10	20,00	7	8,33		
4	Ограничение подвижности нижних конечностей	1	2,00	4	4,76		
5	Трудности при ходьбе	0	0,00	3	3,57		
6	Оперативное лечение	13	26,00	25	29,76		
7	Наличие инвалидности	5	10,00	9	10,72		
Всего		50	100	84	100		

Аналогичные результаты исследования локализации экзостозов при мутациях в гене *EXT2* показали, что при мутации с.310delA (p.Ile104fs*8) экзостозы чаще локализуются на бедренной, большеберцовой и малоберцовой костях с возникновением ограничений подвижности нижних конечностей и трудности при ходьбе. У носителей данной мутации экзостозы редко появляются на ребрах, локтевом суставе и, как правило, не возникает ограничений подвижности верхних конечностей. При мутации с.751C>T (p.Gln251*) экзостозы чаще локализуются на затылке, на локтевом, лучевом и коленном суставах и сопровождаются укорочением

конечностей, и при этом реже всего экзостозы встречаются на ребрах и голеностопном суставе.

Проведена оценка вклада изученных мутаций в вероятность развития клинических проявлений с помощью вычисления отношения шансов с 95% доверительными интервалами (Таблица 20, 21). Результатами исследования установлено, что при мутации в гене *EXT1* с.854dupA (p.His285Glnfs*4) вероятность укорочения конечностей может возрастать в среднем в 5,29 раз (0,69–40,4) по сравнению с носительством других мутаций. Ограничение подвижности нижних конечностей статистически значимо ассоциируется с мутацией с.1003delC (p.Leu335Trpfs*24), при этом вероятность развития данного клинического проявления в среднем в 7,8 раза (1,02–59,61) выше, чем у носителей других мутаций. Мутация с.1883+2T>A также значимо повышает вероятность возникновения ограничения подвижности верхних конечностей в 7,66 раза (1,003-58,47). Мутации в гене *EXT2* с.310delA (p.Ile104fs*8) и с.751C>T (p.Gln251*) могут ассоциироваться с укорочением конечностей и ограничением подвижности нижних конечностей – отношение шансов 2,02 (0,26-15,41) и 5,92 (0,77-45,18), соответственно.

Таблица 20 – Локализация экзостозов в зависимости от мутации в генах *EXT1*, *EXT2*

№	Локализация экзостозов	Мутации в гене <i>EXT1</i>															
		с.854dupA		с.970delT		с.1003delC		с.1019G>A		с.1171delT		с.1703_1713del CGGTGCTTTCA		с.1883+2TA		с.2101C>T	
		Час- тота	%	Час- тота	%	Час- тота	%	Час- тота	%	Час- тота	%	Ча- стота	%	Час- тота	%	Час- тота	%
1	Затылок	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
2	Позвоночный столб	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	100,00
3	Грудина	1	20,00	0	0,00	0	0,00	1	5,56	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
4	Ребра	1	20,00	0	0,00	1	12,50	3	16,67	0	0,00	1	12,50	8	50,00	0	0,00
5	Лопатка	1	20,00	0	0,00	1	12,50	2	11,11	0	0,00	1	12,50	0	0,00	0	0,00
6	Плечевая кость	1	20,00	1	20,00	2	25,00	4	22,22	2	28,57	1	12,50	1	6,25	0	0,00
7	Локтевой сустав	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	5,56	1	14,29	1	12,50	0	0,00	0	0,00
8	Лучевая кость	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	12,50	0	0,00	0	0,00
9	Лучезапястный сустав	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	12,50	1	6,25	0	0,00
10	Кисти рук	1	20,00	1	20,00	0	0,00	0	0,00	1	14,29	1	12,50	3	18,75	0	0,00
11	Тазовая кость	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	5,56	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
12	Тазобедренный сустав	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
13	Бедренная кость	0	0,00	1	20,00	0	0,00	1	5,56	1	14,29	0	0,00	0	0,00	0	0,00
14	Большеберцовая кость	0	0,00	1	20,00	1	12,50	1	5,56	1	14,29	0	0,00	0	0,00	0	0,00
15	Малоберцовая кость	0	0,00	1	20,00	1	12,50	0	0,00	1	14,29	0	0,00	1	6,25	0	0,00
16	Коленный сустав	0	0,00	0	0,00	1	12,50	4	22,22	0	0,00	0	0,00	2	12,50	0	0,00
17	Голеностопный сустав	0	0,00	0	0,00	1	12,50	0	0,00	0	0,00	1	12,50	0	0,00	0	0,00
18	Стопа	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Всего		5	100	5	100	8	100	18	100	7	100	8	100	16	100	1	100

Окончание Таблицы 20

№	Локализация экзостозов	Мутации в гене <i>EXT2</i>			
		с.310delA		с.751C>T	
		Частота	%	Частота	%
1	Затылок	0	0,00	1	1,56
2	Позвоночный столб	1	1,11	1	1,56
3	Грудина	2	2,22	0	0,00
4	Ребра	6	6,67	4	6,25
5	Лопатка	3	3,33	1	1,56
6	Плечевая кость	15	16,67	15	23,44
7	Локтевой сустав	2	2,22	5	7,81
8	Лучевая кость	1	1,11	3	4,69
9	Лучезапястный сустав	2	2,22	3	4,69
10	Кисти рук	3	3,33	3	4,69
11	Тазовая кость	0	0,00	0	0,00
12	Тазобедренный сустав	1	1,11	0	0,00
13	Бедренная кость	12	13,33	5	7,81
14	Большеберцовая кость	16	17,78	6	9,38
15	Малоберцовая кость	13	14,44	5	7,81
16	Коленный сустав	10	11,11	11	17,19
17	Голеностопный сустав	3	3,33	0	0,00
18	Стопа	0	0,00	1	1,56
Всего		90	100	64	100

Таблица 21 – Клиническая характеристика больных с МЭХД в зависимости от мутации в генах *EXT1*, *EXT2*

№	Клинические проявления и исход при МЭХД	Мутации в гене <i>EXT1</i>															
		с.854dupA		с.970delT		с.1003delC		с.1019G>A		с.1171delT		с.1703_1713del CGGTGCTTTCA		с.1883+2T>A		с.2101C>T	
		Час- тота	%	Час- тота	%	Час- тота	%	Час- тота	%	Час- тота	%	Частота	%	Час- тота	%	Час- тота	%
1	Укорочение конечностей	1	50,00	0	0,00	0	0,00	1	8,33	2	18,18	2	16,67	0	0,00	0	0,00
2	Деформация костей	1	50,00	0	0,00	2	40,00	4	33,33	3	27,27	3	25,00	1	25,00	1	100,00
3	Ограничение подвижности верхних конечностей	0	0,00	0	0,00	1	20,00	2	16,67	2	18,18	3	25,00	2	50,00	0	0,00
4	Ограничение подвижности нижних конечностей	0	0,00	0	0,00	1	20,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
5	Трудности при ходьбе	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
6	Оперативное лечение	0	0,00	3	100,00	0	0,00	3	25,00	3	27,27	3	25,00	1	25,00	0	0,00
7	Наличие инвалидности	0	0,00	0	0,00	1	20,00	2	16,67	1	9,09	1	8,33	0	0,00		0,00
Всего		2	100	3	100	5	100	12	100	11	100	12	100	4	100	1	100

Окончание Таблицы 21

№	Клиническая характеристика при МЭХД	Мутации в гене <i>EXT2</i>			
		с.310delA		с.751C>T	
		Частота	%	Частота	%
1	Укорочение конечностей	9	16,07	7	25,00
2	Деформация костей	11	19,64	9	32,14
3	Ограничение подвижности верхних конечностей	4	7,14	3	10,71
4	Ограничение подвижности нижних конечностей	4	7,14	0	0,00
5	Трудности при ходьбе	3	5,36		0,00
6	Оперативное лечение	19	33,93	6	21,43
7	Наличие инвалидности	6	10,71	3	10,71
Всего		56	100	28	100

Таким образом, в результате гено-фенотипического анализа частоты экзостозов по изученным локализациям и частоты клинической характеристики больных с МЭХД в зависимости от исследованных генов *EXT1*, *EXT2* показали, что статистически значимых различий нет. А при сравнении отдельно по мутациям ограничение подвижности нижних конечностей статистически значимо ассоциируется с мутацией с.1003delC (p.Leu335Trpfs*24) в гене *EXT1*, при этом вероятность развития данного клинического проявления в среднем в 7,8 раза (1,02–59,61) выше, чем у носителей других мутаций. И при мутации с.1883+2T>A в гене *EXT1* также значимо повышается вероятность возникновения ограничения подвижности верхних конечностей в 7,66 раза (1,003–58,47).

Локализация экзостозов с мутацией в гене *EXT1* встречается больше на туловище и верхних конечностях, в гене *EXT2* на верхних и нижних конечностях. Хирургическое лечение проведено больше у больных с мутацией в гене *EXT2*.

3.6. Медико-генетическая помощь семьям с множественной экзостозной хондродисплазией (на примере одной семьи)

Медико-генетическое консультирование при МЭХД осуществляется по обращению пациента. Большая часть больных является жителями районов Республики (81,2 %). Сложность заключается в значительной отдаленности районов, где

проживают больные, отсутствием круглогодичного автотранспортного сообщения, водного сообщения. Для улучшения оказания медико-генетической помощи больным с МЭХД необходимо использование современных методов диагностики с внедрением высокотехнологичных методик.

В исследование было включено 4 поколения одной якутской семьи, проживающей в сельской местности РС (Я) (Рисунок 33). Из анамнеза известно, что 9 членов семьи имели клинические проявления МЭХД, состояли на учете и наблюдались в МГЦ РБ №1-НЦМ [Яковлева А.Е. и др., 2019].

Для диагностики МЭХД использовали комплекс методов обследования: генеалогический анализ, ортопедический осмотр, рентгенологическое исследование и современные методы ДНК-диагностики (прямое секвенирование по Сэнгеру, МПС).

Секвенирование экзона пробанда (IV.9) проведено на секвенаторе MiSeq (Illumina, USA) со средним покрытием 70–100х с использованием панели TruSight One Sequencing panel (Illumina, USA), включающей 4800 генов-кандидатов с известным клиническим значением.

Все этапы пробоподготовки для парно-концевых библиотек ДНК (paired-end library) и непосредственного секвенирования проведены согласно инструкции производителя, Illumina [TruSight One Sequencing Panel Series. Reference Guide. 2018 <https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina>].

Первичная обработка результатов секвенирования (определение нуклеотидных оснований, демультиплексирование, генерация FASTQ-файлов) проведена с использованием автоматизированного алгоритма во встроенной программе системы MiSeq. Вторичный анализ был выполнен с использованием программного обеспечения Sophia DDM v4 (Sophia Genetics, Switzerland). Полученные чтения были выровнены на референсную последовательность генома человека GRCh37 (hg19). Для аннотации (описания свойств) выявленных вариантов был использован транскрипт гена *EXT2*: NM_001178083. Для клинической интерпретации и поиска потенциально патогенных вариантов руководствовались рекомендациями Амери-

канской ассоциации медицинских генетиков [Richards S., 2015], а также руководством по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (МПС) [Рыжкова О.П. и др., 2018].

Для названия выявленных вариантов использовалась номенклатура, представленная на сайте <https://varnomen.hgvs.org/recommendations/DNA/>.

Для предсказания функциональной значимости найденных вариантов нуклеотидной последовательности была использована компьютерная программа MutationTaster [<http://www.mutationtaster.org/>]. Для подтверждения результатов полноэкзонного секвенирования проведено прямое секвенирование по Сэнгеру на генетическом анализаторе ABI 3500 (Life Technologies, USA), с использованием олигонуклеотидных праймеров. Данный участок гена был исследован у 11 здоровых членов семьи (II.4, III.2, III.3, III.5, III.8, III.9, IV.6, IV.7, IV.8, IV.9, IV.10). Результаты были аннотированы с использованием программного пакета SeqScape 3.0 Software (Applied Biosystems, USA).

Клинический осмотр был проведен 11 членам семьи в возрасте от 20–89 лет. Семи членам семьи (III.5, III.8, III.9, IV.6, IV.7, IV.8, IV.9) был поставлен предполагаемый клинический диагноз МЭХД. Клинические проявления всех больных членов семьи были однотипными. Экзостозы начинали появляться в первом десятилетии жизни и продолжали прогрессировать до закрытия зон роста костей в 18–20 лет.

Пробанд – девушка, родители пробанда впервые обратились к врачу-генетику, когда ей было 10 лет с жалобами на опухолевидные образования в области костей правых конечностей. Ребенок от первой беременности, протекавшей со слов матери без особенностей, роды в срок. Вес при рождении 3388 г., длина 50 см. Оценка по шкале Апгар 7–8 баллов. Профилактические прививки получала по возрасту. Самостоятельно стала ходить в 1 год. Перенесенные заболевания: ОРВИ, острый бронхит, аллергический дерматит, ветряная оспа. На естественном вскармливании была до 2-х лет. Экзостозы начали появляться с 5 месяцев.

При осмотре в 2009 г. ребенок был пропорционального телосложения, масса тела 30,5 кг, рост 132 см, голова округлой формы, отмечалось умеренная асимметрия лица, слух не нарушен, грудная клетка сформирована правильно. На плечевой кости на обеих руках имелись экзостозы размерами: слева 5х6 см, справа 2х3 см. Левая рука была укорочена из-за наличия экзостозов в области локтевой и лучевой костей. На правой ноге экзостозы располагались в области костей голени и на тыльной поверхности стопы.

По данным рентгенограммы плеча и предплечий в 2-х проекциях соотношения в суставах не были нарушены. Справа в проксимальном метафизе плечевой кости по задней наружной поверхности имеется холмовидный экзостоз размером 3,0х1,0 см. Слева в верхней и средней третях диафиза по задней внутренней поверхности – холмовидный экзостоз размером 7,0х1,5 см и шиловидный по наружной поверхности размером 1,0х0,3 см.

На основании всех проведенных обследований ортопед поставил диагноз МЭХД, косорукость слева. Пациентке было рекомендовано оперативное лечение. Также наблюдались искривление костей предплечья, ульнарная девиация кистей, укорочение левой руки, ограничение пронации справа. Пробанд имела инвалидность III группы.

Клинический осмотр пробанда в возрасте 20 лет показал диспластическое телосложение, наличие экзостозов больших размеров на верхних конечностях слева и на нижних конечностях справа (Рисунок 31).

Рентгенографическое исследование плечевой кости, предплечья слева в 2-х проекциях показало, что взаимоотношение костей в суставах не было изменено. Суставные щели не сужены, замыкательные пластинки ровные, четкие. На уровне средней трети диафиза, по наружной поверхности левой плечевой кости отмечается костно-хрящевой нарост на широком основании, неоднородной структуры, неправильной формы, размером 9,7х4 см (Рисунок 32, А; Б).



Рисунок 31 – Фотография пробанда (IV.9), экзостозы плечевой и бедренных костей (фото автора)

На уровне средней трети диафиза лучевой кости по внутренней поверхности выявляется костный нарост с ровными, четкими контурами размером 2,9x1,2 см (Рисунок 32, В).

На следующем этапе для установления молекулярно-генетической причины МЭХД пробанду было проведено секвенирование клинического экзоза. В результате была выявлена нонсенс-мутация с.751C>Т (p.Gln251*) в экзоне 5 гена *EXT2* в гетерозиготном состоянии. Проведена валидация этой мутации секвенированием по Сэнгеру, в результате которого наличие мутации было подтверждено.

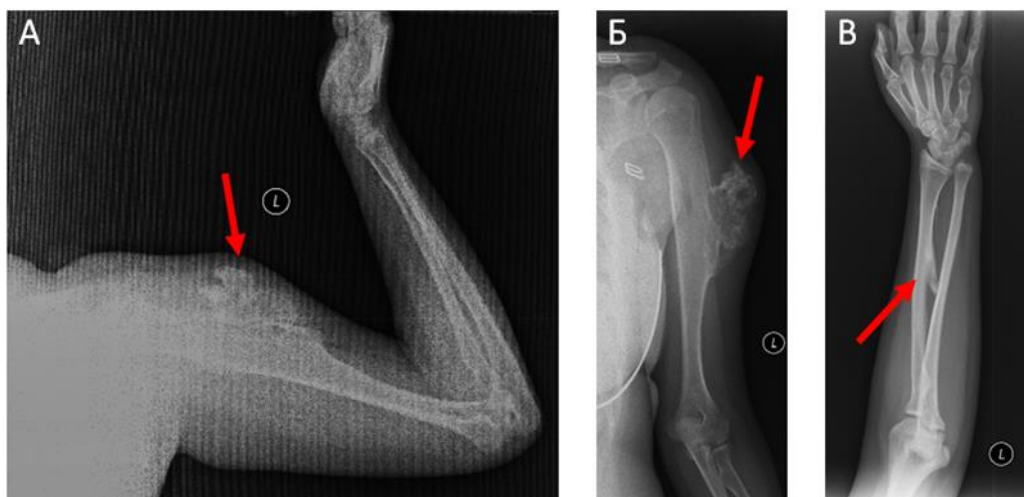


Рисунок 32 – Рентгенограмма пробанда (IV.9) 2019 г. характерные экзостозные разрастания в плечевой кости – А; Б и в лучевой кости левой руки – В (фото автора)

Данный вариант нуклеотидной последовательности отсутствовал в базах данных ClinVar [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>], OMIM [<https://www.omim.org>], в контрольных выборках Exome Aggregation Consortium [<http://exac.broadinstitute.org/>], dbSNP build 153 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>] dbVar [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/>], Exome Variant Server [<https://evs.gs.washington.edu/EVS/>] , но была обнаружена в Leiden Open Variation Database system [<https://databases.lovd.nl/shared/genes/EXT2>].

В описанных в этой базе данных исследованиях [Pedrini E. et. al., 2005; Alvarez C.M. et. al., 2006, 2007; Jennes I. et. al., 2009] был проведен скрининг больных МЭХД, в результате которого была обнаружена данная мутация вместе с остальными значимыми вариантами. Отдельного описания клинического случая с этой мутацией нет, а также не проведен анализ патогенной значимости этой мутации как экспериментально, так и *in silico*. Поэтому для выяснения функциональной значимости нами были проведены дальнейшие исследования. Согласно руководству по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами МПС, в первую очередь принимались во внимание варианты, блокирующие процесс синтеза белка, т. е. преимущественно варианты со сдвигом рамки считывания или нонсенс-варианты.

Нонсенс-мутация с.751C>T (p.Gln251*) приводит к преждевременной термации трансляции в 251 аминокислотной позиции белка EXT2, т. е. возникает стоп-кодон. По сравнению с нормальным белком EXT2, в мутантном белке EXT2 не хватает 467 аминокислот на С-конце, включая часть функционального домена экзостозина и весь функциональный домен гликозилтрансферазы 64, что приводит к серьезным функциональным нарушениям. Кроме этого, программа предсказания патогенности MutationTaster расценивает данную мутацию с.751C>T (p.Gln251*) как вероятно патогенную.

Еще одной возможностью определения патогенного значения является анализ семейного анамнеза заболевания и поиск данного варианта у кровных родственников пациента. На основании тщательного клинико-генеалогического ана-

лиза родословной семьи нами было установлено, чтоотягощенность МЭХД наследуется по аутосомно-доминантному типу по материнской линии (Рисунок 33). Клинический диагноз МЭХД был поставлен 7 членам этой семьи, включая пробанда.

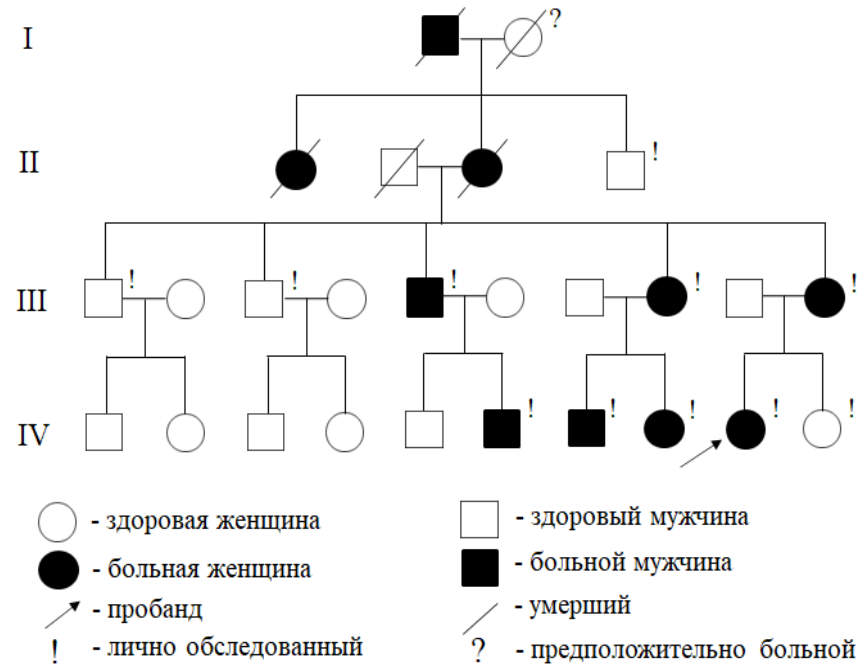
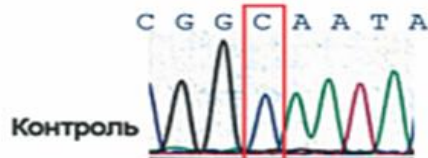


Рисунок 33 – Родословная семьи, отягощенной МЭХД

Всего было исследовано 11 образцов ДНК членов этой семьи. В результате проведения секвенирования по Сэнгеру у 7 членов семьи с клиническим диагнозом МЭХД была выявлена мутация $c.751C>T$ (p.Gln251*) в экзоне 5 гена *EXT2* в гетерозиготном состоянии, что говорит о полной (100%) пенетрантности данного мутантного аллеля (Рисунок 34).

Итак, согласно полученным в результате этого исследования данным, можно считать, что вариант нуклеотидной последовательности $c.751C>T$ (p.Gln251*) в гене *EXT2* имеет патогенное значение.

А



Б

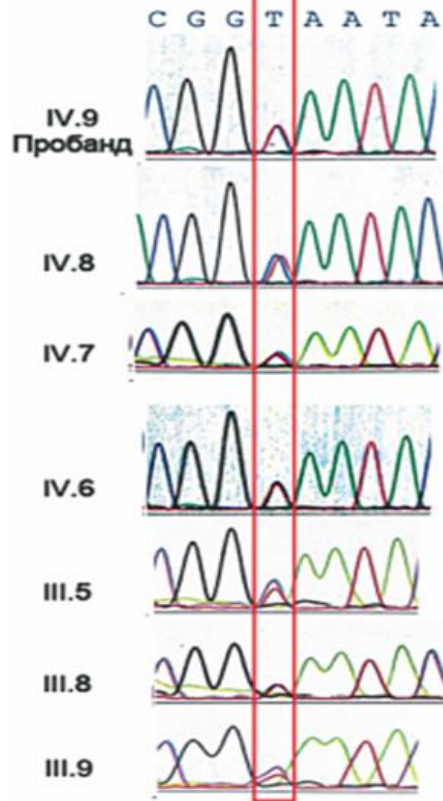


Рисунок 34 – Результат прямого секвенирования по Сэнгеру идентифицированной мутации с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2* (А – контроль (здоровый); Б – больные с МЭХД)

Таким образом, можно отметить, что молекулярно-генетическая идентификация мутации с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2* была успешно апробирована и внедрена в практику медико-генетического консультирования. Ранняя медицинская помощь пациентам с диагнозом МЭХД может дать возможность установить скоординированное многопрофильное наблюдение пациента, сосредоточить внимание на ортопедических проблемах еще в детстве.

3.6.1. Алгоритм диагностики множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии

На основе проведенного исследования впервые разработан алгоритм диагностики МЭХД с использованием молекулярно-генетических методов, включающий идентификацию 2 мажорных мутаций в гене *EXT2* с.310delA (p.Ile104fs*8), с.751C>T (p.Gln251*), включающий в себя обязательное обследование родственников пробанда, осмотр специалистов (врач-генетик, ортопед, невролог), клинико-генеалогический анализ, лабораторные и функциональные методы исследования и молекулярно-генетический анализ (ДНК-диагностика). Планируется провести молекулярную диагностику в группе больных с клиническими проявлениями МЭХД.

Выявленные две мажорные мутации в гене *EXT2* с.310delA (p.Ile104fs*8), с.751C>T (p.Gln251*) встречаются в 16 (64,0%) неродственных семьях из якутской этнической группы.

У якутов наблюдается высокая частота редких наследственных заболеваний, молекулярно-генетическими причинами которых являются мажорные мутации. Их высокий уровень накопления в якутской популяции может быть объяснен «эффектом основателя» (см. раздел 1.1.1.) [Генетические исследования населения Якутии, 2014].

На рисунке 35 представлен разработанный нами алгоритм диагностики МЭХД в Республике Саха (Якутия) с применением молекулярно-генетических методов диагностики. Алгоритм был внедрен в работу МГЦ ГАУ РС(Я) РБ №1-НЦМ (Приложение Ж, 3) и может быть использован для рутинной молекулярно-генетической диагностики при медико-генетическом консультировании больных с МЭХД (Рисунок 35).

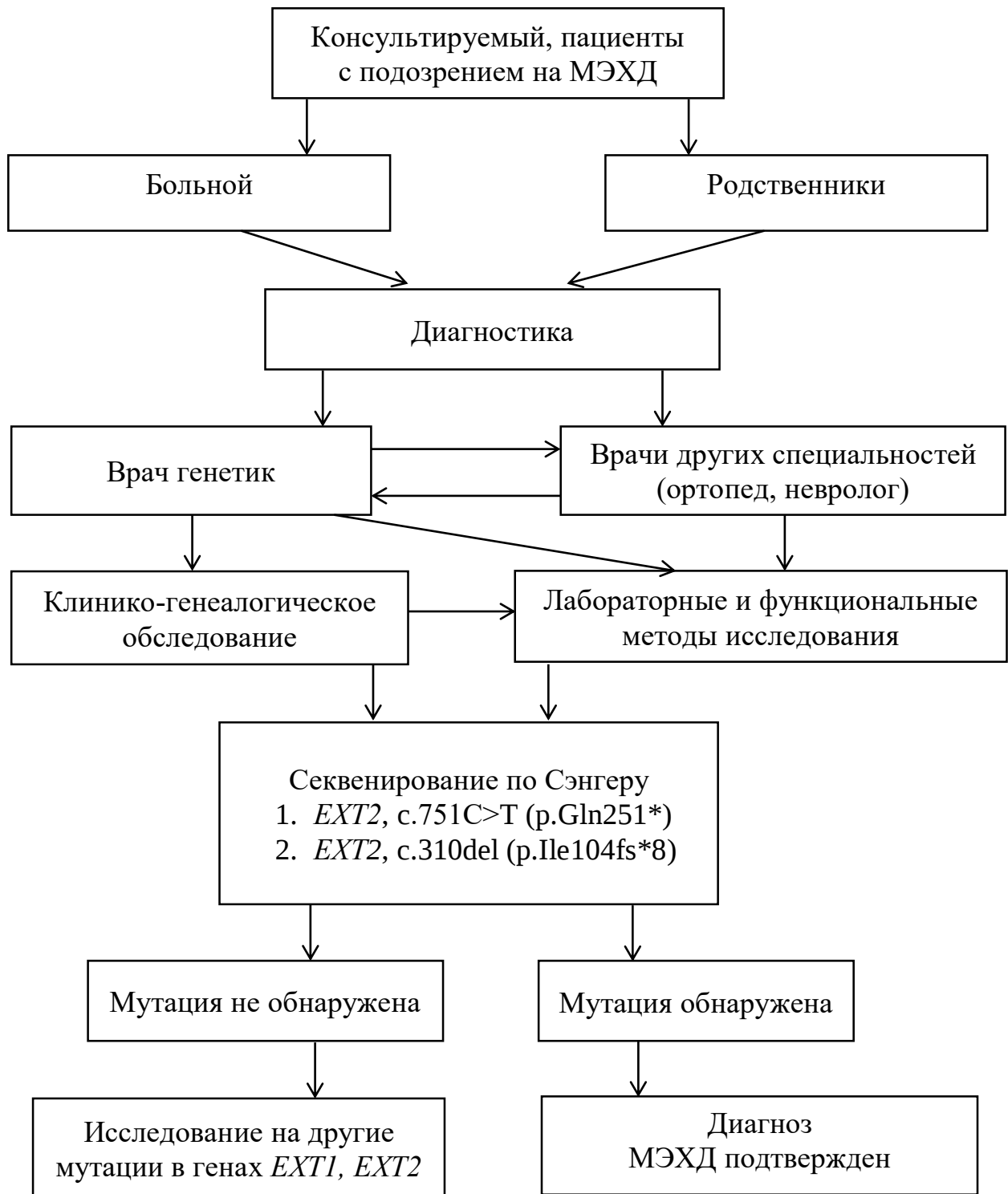


Рисунок 35 – Алгоритм диагностики множественной экзостозной хондродисплазии

3.7. Прогноз развития клинических форм у больных с множественной экзостозной хондродисплазией в якутской популяции в зависимости от молекулярно-генетических причин

Прогнозирование клинического течения данного наследственного заболевания может способствовать предупреждению осложнений, приводящих к инвалидизации больных, снижению качества их жизни.

При построении математических моделей в качестве целевого признака использовали выраженную форму болезни. В группу выраженной формы включили больных со следующими клиническими проявлениями данного заболевания – ограничение подвижности верхних и нижних конечностей, трудности при ходьбе, укорочение конечности, деформация костей, хирургическое лечение и инвалидизация. Во вторую группу входят больные без выше указанных клинических проявлений МЭХД. Анализ ассоциации локализации экзостозов с клиническими формами проводили методом логистической регрессии с вычислением отношения шансов развития заболевания с выраженной клинической картиной. Также у 57 больных с результатами молекулярно-генетических исследований аналогичным методом проведена оценка ассоциации развития клинических форм заболевания с мутациями в генах *EXT1* и *EXT2*. Построены прогностические математические модели развития заболевания в зависимости от клинических проявлений и молекулярно-генетических причин.

По результатам статистического анализа было установлено, что клинические проявления (локализации экзостозов) при множественной экзостозной хондродисплазии в основном зависели от конкретной мутации, а не от гена (*EXT1* или *EXT2*) в целом [Яковлева А.Е. и др., 2022].

С целью уточнения характера клинического течения исследуемого наследственного заболевания в зависимости от локализации экзостозов, нами была построена прогностическая математическая модель. В качестве модели было выбрано уравнение бинарной логистической регрессии. Результатирующими исходами послужили клинические формы МЭХД – выраженная и умеренная, а предикторами – разные локализации экзостозов. Выборка исследования составила 85 больных, из их

числа у 45 (52,9%) больных была установлена выраженная форма МЭХД, а у 40 (47,1%) – умеренная. Для построения уравнения был выбран алгоритм пошагового исключения незначимых предикторов по методу Вальда. Прогнозируемое состояние – выраженная форма МЭХД.

Полученное уравнение логистической регрессии является статистически значимым и объясняет 25-34% вариабельности развития изучаемых клинических форм МЭХД (Таблица 22).

Таблица 22 – Общие характеристики регрессионной модели

Хи-квадрат	25,089
Степени свободы	2
Уровень статистической значимости	0,0001
R ² Кокса и Снелла	0,2556
R ² Нэйджелкерка	0,3412

В конечное уравнение вошли два важных предиктора – локализации экзостозов на большеберцовой и плечевой костях. Оба предиктора имеют максимальный уровень статистической значимости и влияют на клиническое течение МЭХД (Таблица 23).

Таблица 23 – Коэффициенты уравнения логистической регрессии

Предикторы	Коэффициент	Стд. ош.	Статистика Вальда	p
Большеберцовая кость	1,60430	0,51455	9,7211	0,0018
Плечевая кость	1,70712	0,52157	10,7126	0,0011
Константа уравнения	-1,6333			

При построении уравнения были исключены 17 локализаций экзостозов, не имеющих статистически значимых ассоциаций с клиническим течением заболевания.

Для оценки величины вклада каждого фактора (локализации экзостозов) в развитие клинического течения МЭХД были вычислены отношения шансов с 95% доверительными интервалами (Таблица 24).

Таблица 24 – Отношения шансов и 95% доверительные интервалы

Предикторы	Отношения шансов	95% доверительные интервалы
Большеберцовая кость	4,97	1,81-13,64
Плечевая кость	5,51	1,98-15,32

Наличие экзостозов на большеберцовой кости в среднем в 4,97 раза повышает вероятность развития выраженной формы множественной экзостозной хондродисплазии, а экзостозы на плечевой кости – в 5,51 раза. Доверительные интервалы не включают 1, что свидетельствует о статистической значимости полученных отношений шансов. Следовательно, указанное сочетание локализации экзостозов имеет клиническую значимость.

Таблица 25 – Классификация предсказанных клинических форм МЭХД на основании регрессионного уравнения

Наблюдаемые группы	Предсказанные группы		Доля корректных классификаций
	Умеренная форма	Выраженная форма	
Умеренная форма	25	15	62,50%
Выраженная форма	10	35	77,78%
Доля корректно классифицированных случаев			70,59%

Полученное нами уравнение логистической регрессии позволяет корректно предсказывать развитие выраженной формы МЭХД в 70,59% случаев. При этом обладает достаточно высокой специфичностью в 77,78% (Таблица 25). Полученный уровень точности прогноза считаем достаточно высоким и, возможно, при увеличении объёма выборки исследования точность прогноза будет ещё повышаться.

Дополнительно для оценки прогностической ценности модели мы провели ROC-анализ результатов классификации, проведённой с помощью исследуемой модели (Таблица 26).

На основании результатов ROC-анализа можем сделать вывод о том, что площадь под кривой статистически значимо превышает область «неопределённости», равную 0,5. Таким образом, исследуемая математическая модель обладает прогностической ценностью и может быть полезной при оценке развития клинических

форм МЭХД на основании сочетания локализации экзостозов на большеберцовой и плечевой костях больных.

Таблица 26 – Анализ ROC-кривой

Площадь под ROC-кривой (AUC)	0,78
Стандартная ошибка	0,05
95% доверительный интервал AUC	0,68-0,86

В якутской популяции установлены 2 частые мутации в гене *EXT2* – с.310delA (p.Ile104fs*8) и с.751C>T (p.Gln251*) [Yakovleva et al., 2021]. Для изучения молекулярно-генетических причин сочетанного развития экзостозов на большеберцовой и плечевой костях провели анализ ассоциации данных локализаций с мажорными мутациями у больных (Таблица 27).

Таблица 27 – Ассоциация экзостозов на большеберцовой и плечевой костях с мутациями

Мутации	Сочетание экзостозов на большеберцовой и плечевой костях				Точный критерий Фишера
	Есть		Нет		
	Частоты	%	Частоты	%	
с.310delA	14	82,35	3	17,65	0,019
Другие мутации*	19	47,50	21	52,50	

Примечание: * - с.854dupA, с.970delT, с.1003delC, с.1019G>A, с.1171delT, с.1703_1713delCGGTGCTTTCA, с.1883+2T>A, с.2101C>T в гене *EXT1*.

По результатам анализа таблиц сопряжённости установили, что сочетание локализации экзостозов на большеберцовой и плечевой костях статистически значимо ассоциируется с мутацией с.310delA (p.Ile104fs*8).

Таким образом, мы можем прийти к заключению о том, что, если молекулярно-генетической причиной МЭХД является мутация с.310delA (p.Ile104fs*8), то в большинстве случаев можем ожидать развития выраженной формы заболевания.

В то же время при построении уравнения логистической регрессии по аналогичному алгоритму установлено, что мутация с.751C>T (p.Gln251*) ассоциируется

с развитием умеренной клинической формы МЭХД (Таблица 28). В отличие от первой модели в данном случае в качестве целевого исхода использовали умеренную клиническую форму МЭХД.

Таблица 28 – Общие характеристики регрессионной модели

Хи-квадрат	5,57
Степени свободы	1
Уровень статистической значимости	0,02
R ² Кокса и Снелла	0,09
R ² Нэйджелкерка	0,13

Полученная регрессионная модель статистически значима, хоть и объясняет только до 12,6% вариабельности результирующих исходов.

Таблица 29 – Коэффициенты уравнения логистической регрессии

Предикторы	Коэффициенты	Стд. ош.	Статистика Вальда	p
с.751C>T	1,38629	0,60	5,33	0,02
Константа	-0,9343			

При оценке коэффициентов уравнения установили, что исследуемая мутация является статистически значимым предиктором развития умеренного течения МЭХД (Таблица 29).

Таблица 30 – Отношение шансов и 95% доверительные интервалы

Предиктор	Отношение шансов	95% доверительный интервал
с.751C>T	4,00	1,23-12,97

Путём вычисления отношения шансов установили, что в случаях, когда молекулярно-генетической причиной МЭХД является мутация с.751C>T (p.Gln251*), то вероятность развития умеренной клинической формы в среднем в 4 раза выше, чем при других мутациях (Таблица 30).

Таблица 31 – Классификация предсказанных клинических форм МЭХД на основании регрессионного уравнения

Наблюдаемые группы	Предсказанные группы		Доля корректных классификаций
	Умеренная форма	Выраженная форма	
Умеренная форма	11	11	50,0%
Выраженная форма	7	28	80,0%
Доля корректно классифицированных случаев			68,42%

Общая точность прогнозирования с помощью регрессионного уравнения составила 68,42%, но в то же время специфичность равняется только 50% (Таблица 31).

Таблица 32 – Анализ ROC-кривой

Площадь под ROC-кривой (AUC)	0,65
Стандартная ошибка	0,08
95% доверительный интервал AUC	0,51-0,77

Результаты анализа площади под ROC-кривой показали, что регрессионное уравнение также обладает прогностической ценностью, так как площадь под кривой статистически значимо превышает область «неопределённости» (0,5) (Таблица 32).

Таблица 33 – Ассоциация мутации с.751C>T (p.Gln251*) с локализациями экзостозов

Экзостозы на большеберцовой кости					
Мутации	нет		есть		Точный критерий Фишера
	Частота	%	Частота	%	
с.751C>T	12	66,67	6	33,33	0,019
Другие мутации*	12	30,77	27	69,23	
Экзостозы на голеностопном суставе					
с.751C>T	18	100,0	0	0,0	0,046
Другие мутации*	31	79,49	8	20,51	
Экзостозы на малоберцовой кости					
с.751C>T	13	72,22	6	27,78	0,023
Другие мутации*	15	38,46	24	61,54	

Примечание: * - с.854dupA, с.970delT, с.1003delC, с.1019G>A, с.1171delT, с.1703_1713delCGGTGCTTTCA, с.1883+2T>A, с.2101C>T в гене *EXT1*.

По результатам анализа ассоциации мутации с.751C>T (p.Gln251*) с локализациями экзостозов установили, что при данной мутации значительно реже встречаются экзостозы на большеберцовой и малоберцовой костях, а также на голеностопном суставе (Таблица 33).

Установлено, что в зависимости от клинического течения средний возраст первичного обращения больных к врачу статистически значимо отличается. При выраженном течении средний возраст первого обращения к специалисту составляет 11–17 лет, а при умеренном – 19–29. Учитывая то, что средний возраст манифестации заболевания равняется 4–5 годам, при выраженном течении больные за медицинской помощью начинают обращаться с шестого года с момента манифестации МЭХД. При умеренном течении этот интервал составляет более тринадцати лет (Рисунок 36).

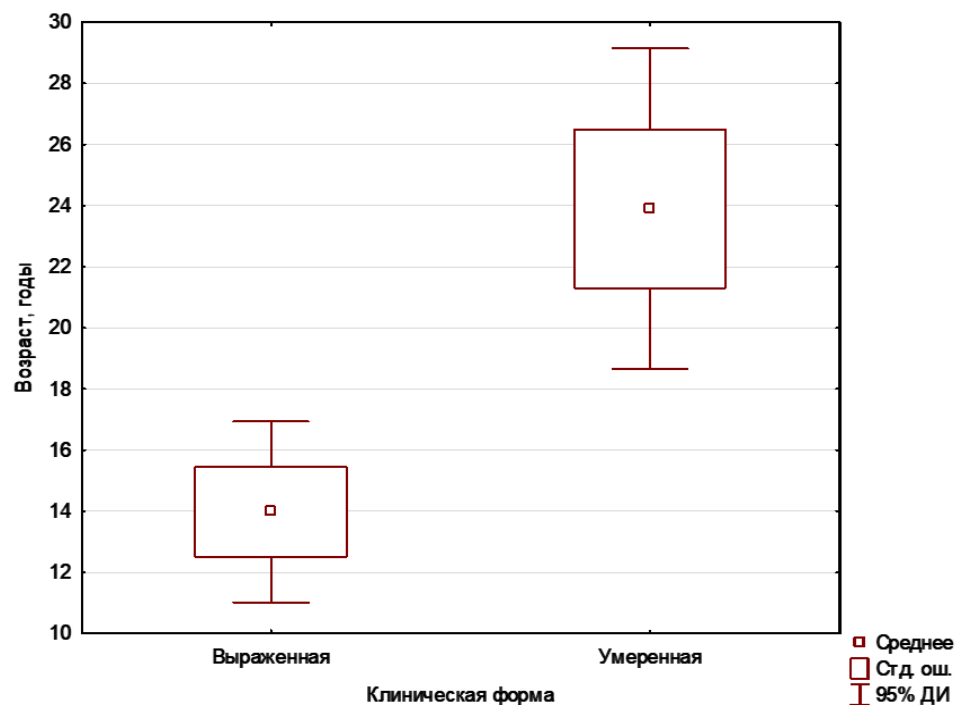


Рисунок 36 – Возраст обращения больных с разным клиническим течением МЭХД

Таким образом, на основании результатов статистического анализа мы приходим к заключению о том, что мажорные мутации с.310delA (p.Ile104fs*8) и

c.751C>T (p.Gln251*), наиболее часто встречающиеся в якутской популяции, определяют выраженность клинических проявлений наследственного заболевания множественной экзостозной хондродисплазии. Изученные мутации, являющиеся молекулярно-генетической причиной МЭХД, ассоциируются с разными клиническими формами МЭХД: c.310delA (p.Ile104fs*8) – с выраженной, а c.751C>T (p.Gln251*) – с умеренной. Наличие устойчивых гено-фенотипических ассоциаций даёт возможность прогнозирования дальнейшего клинического течения множественной экзостозной хондродисплазии у якутских больных с момента молекулярно-генетической диагностики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения научно-исследовательской работы впервые проведено эпидемиологическое, молекулярно-генетическое и клинико-генеалогическое изучение МЭХД в Якутии. В РС (Я) по данным Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии на диспансерном учете состоят 85 представителей разных этнических групп с установленным клиническим диагнозом МЭХД.

Исследовано 85 больных с МЭХД из 41 неродственной семьи, из них 70 (82,3%) больных из 33 семей – представители якутской этнической группы, 8 (9,4%) больных из 5 русских семей, 5 (5,9%) из 1 эвенкийской семьи и по одному (1,2%) случаю из татарской и украинской семей.

При анализе географической распространенности выявлено, что заболевание зарегистрировано в 17 улусах (административно-территориальные единицы) из 34 и г. Якутске. Показатели распространенности по улусам составили от 2,3 до 116,4 на 100 тыс. населения, а в целом по РС (Я) – 8,9 на 100 тыс. населения. 17 улусов и г. Якутск, в которых зарегистрированы больные с МЭХД, объединены в 5 территориальных групп (Центральная, Западная, Южная, Восточная, Арктическая). При распределении больных с МЭХД по месту жительства наибольшее количество зарегистрировано в Западной и Арктической группах улусов.

Установлено, что в РС (Я) заболевание в основном встречается среди якутского населения с частотой 15,0 на 100 тыс. якутов с накоплением в отдельных улусах (Абыйский (1:1771), Кобяйский (1:1050), Вилуйский (1:1775) и Сунтарский (1:1525)), что в 2 и более раза выше, чем в общеевропейской популяции и регионах России.

По данным ранее проведенных молекулярно-генетических исследований наследственных для якутской популяции характерно накопление наследственных заболеваний с доказанным «эффектом основателя». Причиной данных заболеваний являются мажорные мутации, например, окулофарингеальная миодистрофия, нейросенсорная глухота 1А типа, наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия 1 типа, 3-М синдром, SOPH синдром и др. [Пузырев В.П., Максимова Н.Р.,

2008; Генетические исследования населения Якутии, 2014; Степанова С.К., 2015 и др.]. МЭХД также можно отнести к частым наследственным заболеваниям, характерным для якутской этнической группы.

В результате проведенного клинико-генеалогического анализа возраст манифестации заболевания составлял от рождения до 14 лет, средний возраст манифестации равнялся 4–5 годам. Клиническая картина имеет внутрисемейный клинический полиморфизм и зависит от числа, величины, локализации экзостозов и обусловленных ими деформаций. По половой принадлежности наблюдается незначительное преобладание числа больных мужского пола 44 (51,8%) по сравнению с женщинами – 41 (48,2%).

Всех больных с МЭХД условно распределили на 2 группы – с выраженной и умеренной формами болезни. В группу с выраженной формой включили больных со следующими клиническими проявлениями: ограничение подвижности верхних и нижних конечностей, трудности при ходьбе, укорочение конечности, деформация костей, хирургическое лечение и инвалидизация. В группу с умеренной формой вошли больные без выше указанных клинических проявлений МЭХД.

Анализ клинических проявлений у обследованных больных показал, что в среднем на одного больного обнаруживается $3,8 \pm 2,5$ экзостозов, а у больных с выраженной формой заболевания – $4,9 \pm 2,6$. Так, у половины больных с умеренной формой встречается по 1 экзостозу. У больных с выраженной формой обнаруживается больше экзостозов, выявляется от 3 до 10 экзостозов на одного больного. Экзостозы больше встречаются на верхних и нижних конечностях. При этом деформацию костей и укорочение конечности имели 21 (24,7%) больной. Ограничение подвижности верхних конечностей было у 17 (20,0%), нижних конечностей – у 13 (15,3%), трудности при ходьбе имелись у 6 (7,1%), хирургическое лечение прошли 31 (36,5%) больных. Инвалидность по заболеванию оформили 15 (17,6%). Оценка клинических проявлений, обследованных больных свидетельствует в пользу умеренного течения болезни без злокачественной трансформации экзостозов.

Для молекулярно-генетического исследования были доступные 57 образцов ДНК больных с МЭХД и 11 образцов ДНК здоровых родственников из 31 семьи, в

результате анализа 48 больным из 25 семей выставлен точный диагноз МЭХД. Исследование проведено с помощью современных методов ДНК диагностики с применением технологии массового параллельного секвенирования (МПС) и секвенирования по Сэнгеру. Молекулярно-генетической причиной МЭХД явились 10 мутаций в генах *EXT1*, *EXT2*, (3 новые), обнаруженные в 25 (80,6%) семьях. В 16 (64,0%) семьях с МЭХД выявлены 2 мажорные мутации с.310delA (p.Ile104Serfs*8), с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2*.

В гене *EXT1* обнаружено 8 мутаций – с.854dupA (p.His285Glnfs*4), с.970delT (p.Tyr324Phefs*35), с.1003delC (p.Leu335Trpfs*24), с.1019G>A (p.Arg340His), с.1171delT (p.Ser391Leufs*12), с.1703_1713delCGGTGCTTTCA (p.Thr568Asnfs*16), с.1883+2T>A, с.2101C>T (p.Arg701*). В гене *EXT2* выявленные 2 мутации оказались частыми среди больных якутской этнической группы – с.310delA (p.Ile104Serfs*8), с.751C>T (p.Gln251*). При этом мутация с.310delA (p.Ile104Serfs*8) в гене *EXT2* обнаружена в 12 семьях, а мутация с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2* – в 4 семьях. Наблюдаемая частота семей с одной и той же мутацией в условиях этнической группы указывает на возможный эффект основателя и вероятнее всего возникли в результате дрейфа генов. У 9 больных из 6 неродственных семей в генах *EXT1* и *EXT2* мутация не установлена. Продолжается поиск патологических вариантов генов, ответственных за развитие заболевания.

В результате гено-фенотипического анализа частоты экзостозов по изученным локализациям и частоты клинической характеристики больных с МЭХД в зависимости от исследованных генов *EXT1/EXT2* показали, что статистически значимых различий нет. А при сравнении отдельно по мутациям ограничение подвижности нижних конечностей статистически значимо ассоциируется с мутацией с.1003delC (p.Leu335Trpfs*24) в гене *EXT1*, при этом вероятность развития данного клинического проявления в среднем в 7,8 раза (1,02–59,61) выше, чем у носителей других мутаций. И при мутации с.1883+2T>A в гене *EXT1* также значимо повышается вероятность возникновения ограничения подвижности верхних конечностей в 7,66 раза (1,003–58,47). Локализация экзостозов с мутацией в гене *EXT1* встречается больше на туловище и верхних конечностях, в гене *EXT2* на верхних и нижних

конечностях. Хирургическое лечение проведено больше у больных с мутацией в гене *EXT2*.

При распределении выявленных мутаций в генах *EXT1/EXT2* по улусам РС (Я) больные проживали в следующих улусах: Абыйский, Алданский, Верхневилуйский, Верхоянский, Вилуйский, Горный, Кобяйский, Мегино-Кангаласский, Момский, Оймяконский, Сунтарский, Усть-Алданский и г. Якутск.

Из общего числа найденных мутаций наиболее распространенными являются 2 мутации (с.310delA (p.Ile104fs*8), с.751C>T (p.Gln251*)) в гене *EXT2*. Мутация с.310delA (p.Ile104fs*8) в гене *EXT2* обнаружена у больных в 7 улусах и 1 городском округе: Абыйском, Верхневилуйском, Вилуйском, Горном, Кобяйском, Мегино-Кангаласском, Момском и г. Якутске. Вторая мутация с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2* выявлена у больных в 3 улусах: Верхоянском, Сунтарском и Усть-Алданском. Наиболее широкий спектр мутаций зарегистрирован в г. Якутске и Кобяйском улусе, а более узкий спектр – в Вилуйском и Сунтарском улусах.

На основании результатов статистического анализа мажорные мутации в гене *EXT2* с.310delA (p.Ile104fs*8) и с.751C>T (p.Gln251*), наиболее часто встречающиеся в якутской популяции, определяют выраженность клинических проявлений наследственного заболевания множественной экзостозной хондродисплазии, являющиеся молекулярно-генетической причиной МЭХД. Мутация с.310delA (p.Ile104fs*8) в гене *EXT2* ассоциируется с выраженной клинической формой, а с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2* – с умеренной. Наличие устойчивых гено-фенотипических ассоциаций даёт возможность прогнозирования дальнейшего клинического течения МЭХД у якутских больных с момента молекулярно-генетической диагностики.

Таким образом, МЭХД является частой наследственной патологией в Якутии, наиболее распространённой в якутской этнической группе. Молекулярно-генетические причины данной патологии отличаются широким спектром мутаций, в том числе выявляются ранее не описанные варианты нуклеотидных последовательностей. Идентифицировано 10 вариантов нуклеотидной последовательности в 25 (80,6%) семьях из обследованной 31 семьи. У якутов в 16 (64,0%) из 25 семей с

установленными молекулярно-генетическими причинами выявлены 2 мажорные мутации в гене *EXT2*: с.310delA (p.Ile104fs*8) – в 12 (48,0%) семьях и с.751C>T (p.Gln251*) – в 4 (16,0%) семьях. Также мажорные мутации были ранее найдены и при других наследственных заболеваниях в якутской популяции (3-м синдром, SOPH-синдром, нейросенсорная глухота 1 типа, ОФМД и др.). Причины накопления больных с МЭХД у якутов можно объяснить изолированностью, эффектом основателя и расширенным характером воспроизводства.

МЭХД обладает клиническим полиморфизмом, обусловленным разным клиническим течением болезни. Клиническая картина больных заметно отличается выраженностью. В свою очередь выраженность клинических проявлений ассоциируется с мажорными мутациями в гене *EXT2*. Наличие устойчивых гено-фенотипических ассоциаций может дать возможность прогнозирования дальнейшего клинического течения МЭХД у носителей мажорных мутаций.

В данной исследовательской работе полученные нами результаты позволили расширить патологический спектр мутаций генов *EXT1/EXT2* и установить этиологию болезни. Изучение вопросов при данном заболевании должно быть продолжено.

ВЫВОДЫ

1. Множественная экзостозная хондродисплазия является наследственной патологией с высокой степенью распространённости в якутской популяции, более чем в 2 раза превышающей аналогичные показатели в общероссийской и европейской популяциях. Распределение частоты мутаций носит очаговый характер с накоплением в отдельных улусах, в которых проживает преимущественно коренное население.

2. Молекулярно-генетическими причинами изученной наследственной патологии являются мутации в генах *EXT1* и *EXT2*, 3 (с.970delT (p.Tyr324Phefs*35), с.1003delC (p.Leu335Trpfs*24), с.1703_1713delCGGTGCTTTCA (p.Thr568Asnfs*16) в гене *EXT1*) из которых описаны впервые. Якутская популяция характеризуется высокой частотой носительства 2 мажорных мутаций с.310delA (p.Ile104fs*8) и с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2*.

3. Клинический полиморфизм множественной экзостозной хондродисплазии у обследованных больных обусловлен генетической гетерогенностью популяции и может подразделяться на умеренную и выраженную формы.

4. Мажорные мутации с.310delA (p.Ile104fs*8) и с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2* дают гено-фенотипические ассоциации с развитием разных клинических форм множественной экзостозной хондродисплазии. Мутация с.310delA (p.Ile104fs*8) ассоциирована с выраженной формой заболевания, а мутация с.751C>T (p.Gln251*) – с умеренной.

5. Разработанные и внедрённые в практику медико-генетического консультирования методы молекулярно-генетической диагностики мажорных мутаций с.310delA (p.Ile104fs*8) и с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2* представляют значительный интерес для клинических специалистов как для уточнения диагноза больных, так и для прогнозирования течения множественной экзостозной хондродисплазии и позволяют выявить молекулярную этиологию заболевания у 64,0% пробандов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А – аденозин

АД – аутосомно-доминантный тип наследования

ГС – гепарансульфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МГЦ РБ №1-НЦМ – медико-генетический центр Республиканская больница №1 -
Национальный центр медицины

МО – множественные остеохондромы

МПС (MPS) – массовое параллельное секвенирование (massive parallel sequencing)

МЭ – множественные хрящевые экзостозы

МЭХД – множественная экзостозная хондродисплазия

НЗС – наследственные заболевания скелета

ОП – оптическая плотность

п.о. – пар оснований (нуклеотидов)

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РС (Я) – Республика Саха (Якутия)

СВФУ – Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова

ВМР – костный морфогенетический белок

BSA – бычий сывороточный альбумин

С – цитозин

ClinVar – база данных о клинической значимости и фенотипической взаимосвязи
вариантов

dbSNP – база данных коротких генетических вариантов

ETDA – этилендиаминтетраацетат натрия

Exo1 – экзонуклеаза 1

EXT1 – ген экзостозин 1

EXT2 – ген экзостозин 2

F – прямой праймер

FastAp – щелочная фосфатаза

FGF – фактор роста фибробластов

G – гуанин

GnomAD – база данных с агрегированными сведениями о геномах

HGMD – база данных аннотированных вариантов нуклеотидной последовательности

HGVS – сайт общества по изучению вариаций генома человека

LOVD – база данных открытых вариаций Лейдена

NCBI – национальный центр биотехнологической информации США

OMIM – номер наследственной болезни или признака в международном каталоге МакКьюсика

pH – водородный показатель

R – обратный праймер

SDS – додецилсульфат натрия

SIFT – эволюционная консервативность

TAE-трис – ацетатный буфер

Tris-HCL – трис гидрохлорид

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амелина С. С. Эпидемиология моногенной наследственной патологии и врожденных пороков развития у населения Ростовской области: специальность 03.00.15 «Генетика»: автореферат дис. ... доктора медицинских наук: Москва: ГУ «Медико-генетический научный центр РАМН». – 2006. – 39 с.
2. Банщикова Е. С. Особенности клинического течения и морфофункциональное состояние эритроцитов у детей с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией: специальность 14.00.09 «Педиатрия», 03.00.15 «Генетика»: автореферат дис. ... кандидата медицинских наук: Томск: СибГМУ. – 2002. – 26 с.
3. Барашков Н. А. Молекулярно-генетическое изучение наследственной несиндромальной сенсоневральной глухоты в Республике Саха (Якутия): специальность: 03.00.15 «Генетика» автореферат дис. ... кандидата биологических наук: Уфа: Уфимский научный центр РАН, Институт биохимии и генетики. – 2007. – 23 с.
4. Барашков Н. А., Терютин Ф. М., Пшенникова В. Г., Соловьев А. В., Федорова С. А. Молекулярно-генетические методы изучения наследственных болезней на примере аутосомно-рецессивной глухоты 1А типа: учебное пособие // Якутск: Издательский дом СВФУ. – 2017. – 86 с.
5. Благодатский М. Д., Рунович А. А., Рычков А. В. Случай множественной экзостозной хондродисплазии позвоночника с компрессией спинного мозга // Сибирский медицинский журнал. – 1999. – № 19. – С. 52–54.
6. Боголепова Н. Н., Матюшевская Е. В. Рентгенодиагностика доброкачественных опухолей и опухолеподобных образований костей у детей // Педиатрический вестник Южного Урала. – 2016. – № 1. – С. 41–45.
7. Бочков Н. П. Наследственные болезни. Национальное руководство / под ред. Н. П. Бочкова, Е. К. Гинтера, В. П. Пузырева // Москва: ГЭОТАР-Медиа. – 2012. – 936 с.
8. Боева С. Б. Антропогенетическое обследование коренного населения Якутской АССР в связи с вопросами этногенеза якутов: специальность 03.00.14 «Антропология»: автореферат дис. ... кандидата биологических наук: Москва: НИИ МГУ им. М. В. Ломоносова. – 1988. – 24 с.

9. Брахфогель И. Ф. Молекулярно-генетическая характеристика спинально-мышечной атрофии 1 типа в Якутии: специальность 03.00.15 «Генетика»: автореферат дис. ... кандидата биологических наук: Якутск: Академия наук РС(Я), Институт здоровья АН РС(Я). – 2000. – 24 с.
10. Вальков Р. А. Генетико-эпидемиологическое исследование наследственных заболеваний скелета в Ростовской области: специальность 03.02.07 «Генетика»: автореферат дис. ... кандидата медицинских наук: Москва: ФГБНУ «Медико-генетический научный центр». – 2017. – 25 с.
11. Владимирцев А. И. Хронический якутский (вилюйский) энцефалит за 12 лет по материалам неврологического отделения Якутской республиканской больницы. Якутск. – 1964. – С. 97–106.
12. Волков М. В., Меерсон Е. М., Нечволодова О. Л., Юкина Г. П. Наследственные системные заболевания скелета. Москва: Медицина. – 1982. – 320 с.: ил.
13. Волков М. В. Болезни костей у детей. 2-е изд., доп. // Москва: Медицина. – 1985. – 512 с.
14. Галеева Н. М., Назаренко Л. П., Назаренко С. А., Тверская С. М., Поляков А. В. Молекулярно-генетическая причина наследственной метгемоглобинемии I типа в Якутии // Медицинская генетика. – 2006. – Т. 5. – № 9 (51). – С. 15–21.
15. Галеева Н. М., Воевода М. И., Спиридонова М. Г. Степанов В. А., Поляков А. В. Популяционная частота и возраст мутации с.806С>Т в гене *CYB5R3*, являющейся причиной наследственной метгемоглобинемии первого типа в Якутии // Генетика человека. – 2013. – Т. 49. – № 4. – С. 523-530.
16. Генетические исследования населения Якутии: сборник статей / под ред. В. П. Пузырева, М. И. Томского // Якутск: ФГБУ «ЯНЦ КМП СО РАМН», «Дани-Алмас». – 2014. – 336 с.: ил.
17. Григорьева Л. В., Романова А. Н., Кылбанова Е. С., Махарова Н. В., Тарабукина Л. В. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов-кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний в якутской популяции и

анализ ассоциаций с инфарктом миокарда // Якутский медицинский журнал. – 2006. – № 2 (14). – С. 16–19.

18. Гурьева П. И., Петухова Д. А., Сухомясова А. Л., Гуринова Е. Е., Николаева И. А., Иванова Р. Н., Ноев Д. Д., Афанасьев А. А., Кузнецов А. А., Васильев Ф. Ф., Максимова Н. Р. Идентификация новой мутации в гене *CLN6*, ответственной за возникновение нейронального цероидного липофусциноза 6-го типа в Якутии / Генетика человека и патология: сборник научных трудов / под ред. В. А. Степанова. Выпуск 11. // Томск: Литературное бюро. – 2017. – С. 140–141.

19. Данилова А. Л. Генетико-демографическое исследование народонаселения Республики Саха (Якутия): специальность 03.00.15 «Генетика»: автореферат дис. ... кандидата биологических наук: Томск: НИИ медицинской генетики Томский научный центр СО РАМН. – 2009. – 21 с.

20. Зацепин С. Т. Костная патология взрослых: руководство для врачей / С.Т. Зацепин // Москва: Медицина. – 2001. – 640 с.

21. Зинченко Р. А., Ельчинова Г. И., Гинтер Е. К. Факторы, определяющие распространение наследственных болезней в российских популяциях // Медицинская генетика. – 2009. – Т. 8. – № 12 (90). – С. 7–23.

22. Зинченко Р. А., Галкина В. А., Дадали Е. Л., Хлебникова О. В., Михайлова Л. К., Кадышев В. В., Гаврилина С. Г., Петрин А. Н., Ельчинова Г. И., Поляков А. В., Стрельников В. В., Залетаев Д. В., Васильева Т. А., Петрова Н. В., Петрина Н. Е., Захарова Е. Ю., Бессонова Л. А., Гинтер Е. К. Медико-генетическое изучение населения Республики Татарстан. VII. Разнообразие наследственной патологии в восьми районах // Медицинская генетика. – 2014. – Т. 13 – № 11(149). – С. 15–29.

23. Зоткин А. В. Хирургическое лечение детей с экзостозной хондродисплазией костей верхних и нижних конечностей: специальность 14.01.15 «Травматология и ортопедия»: автореферат дис. ... кандидата медицинских наук: Пенза: ПГУ. – 2011. – 24 с.

24. Зубри Г. Л., Гольдфарб Л. Г. Наследственная мозжечковая атаксия в Якутии / Первая Всесоюзная конференция по медицинской генетике: Тез. докл. // М.: АМН СССР. – 1975. – С. 60–62.
25. Иващенко Т. Э., Глазков П. Б., Хромов-Борисов Н. Н., Баранов В. С. Популяционный анализ тринуклеотидных СТG-повторов в гене миотонической протеинкиназы I // Генетика. – 1997. – Т. 33. – №9. – С. 1287–1290.
26. Иллариошкин С. Н., Руденская Г. Е., Иванова-Смоленская И. А., Маркова Е. Д., Ключников С. А. Наследственные атаксии и пареплегии / М.: МЕД-пресс-информ. – 2006. – 416 с.: ил.
27. Конева Л. А. Моделирование распространенности спиноцеребеллярной атаксии I типа в зависимости от особенностей генетико-демографических процессов в якутских популяциях: специальность 03.00.15 «Генетика»: дис. ...кандидата биологических наук: Томск: НИИ медицинской генетики Томский научный центр СО РАМН. – 2009. – 146 с.
28. Козлова С. И., Демикова Н. С., Семанова Е., Блинникова О. Е. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование: атлас-справочник / науч. ред. Е. К. Гинтер. – 1996. – 416 с.: ил. 392.
29. Косянкова Т. В. Гены синтаз оксида азота: полиморфизмы в сибирских популяциях и их функциональное значение: специальность 03.00.15 «Генетика»: дис. ...кандидата биологических наук: Томск: НИИ медицинской генетики Томский научный центр СО РАМН. – 2002. – 140 с.
30. Куртанов Х. А. Окулофарингиальная миодистрофия и генетическая вариабельность локуса ОФМД в популяциях Якутии: специальность 03.00.15 «Генетика»: дис. ...кандидата медицинских наук: Томск: НИИ медицинской генетики Томский научный центр СО РАМН. – 2015. – 139 с.
31. Лагунова И. Г. Клинико-рентгенологическая диагностика дисплазий скелета: монография // Москва: Медицина. – 1989. – 255. [1] с.: ил.
32. Лимборская С. А., Хуснутдинова Э. К., Балановская Е. В. Этногенетика и геногеография народов Восточной Европы // М.: Наука. – 2002. – 261 с.

33. Максимова Н. Р. Генетическая характеристика населения Усть-Алданского улуса Якутии: демографические параметры, гены-кандидаты и факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний: специальность 03.00.15 «Генетика»: специальность 14.00.06 «Кардиология»: автореферат дис. ... кандидата медицинских наук: Томск: НИИ медицинской генетики Томский научный центр СО РАМН. – 2002. – 23 с.
34. Максимова Н. Р., Ноговицына А. Н., Сухомясова А. Л., Гуринова Е. Е., Алексеева С. П. Клинические и молекулярно-генетические аспекты наследственного нанизма у якутов с мутацией в гене *CUL7* // Якутский медицинский журнал. – 2007. – № 2 (18). – С. 6–9.
35. Максимова Н. Р., Сухомясова А. Л., Гуринова Е. Е., Николаева И. А., Коротов М. Н., Павлов Р. Н., Ноговицына А. Н., Пузырев В. П. Генетико-эпидемиологические и социально-экономические аспекты наследственной этноспецифической патологии в Якутии // Медицинская генетика. – 2008. – Т. 7. – № 10 (76). – С. 35–43.
36. Максимова Н. Р. Клинико-генеалогическая и молекулярно-генетическая характеристика этноспецифических форм наследственной патологии у якутов: специальность 03.00.15 «Генетика»: специальность 14.00.06 «Кардиология»: автореферат дис. ... доктора медицинских наук: Томск: НИИ медицинской генетики Томский научный центр СО РАМН. – 2009. – 44 с.
37. Максимова Н. Р., Ноговицына А. Н., Куртанов Х. А., Алексеева Е. И. Популяционная частота и возраст мутации G5741 – А в гене *NBAS*, являющейся причиной SOPH-синдрома в Республике Саха (Якутия) // Генетика. – 2016. – Т. 52. – № 10. С. 1194–1201.
38. Маркова Т. В., Кенис В. М., Мельченко Е. В., Нагорнова Т. С., Орлова А. А., Вассерман Н. И., Захарова Е. Ю., Дадали Е. Л. Клинико-генетические характеристики наследственных скелетных дисплазий // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19. – № 8 (217). – С. 50–51.
39. Мостахова Т. С. Рождаемость в Республике Саха (Якутия): тенденции и особенности / Демографические процессы на постсоветском пространстве: сб.

науч. Трудов // Екатеринбург: Изд-во Институт экономики Уральского отделения РАН. – 2015. – С. 307–313.

40. Назаренко Л. П., Саженова Е. А., Назаренко С. А., Банщикова Е. С., Ноговицына А. Н. Анализ мутаций гена энзимопенической наследственной мет-гемоглобинемии в якутской популяции. Медико-генетическое исследование населения Республики Саха (Якутия): сборник научных трудов / под ред. В. П. Пузырева // Якутск: ЯФ СО РАН. – 2002б. – С. 151–159.

41. Ноговицына А. Н. Отягощенность населения Республики Саха (Якутия) наследственной патологией и анализ работы региональной медико-генетической консультации: специальность 03.00.15 «Генетика»: автореферат дис. ... кандидата медицинских наук: Томск: НИИ медицинской генетики Томский научный центр СО РАМН. – 2001. – 24 с.: ил.

42. Платонов Ф. А. Наследственная мозжечковая атаксия в Якутии: специальность 14.00.13 «Нервные болезни»: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук: Москва: Науч. исслед. ин-т неврологии РАМН. – 2003. – 49 с.

43. Попова С. Н., Сломинский П. А., Галушкин С. Н., Тарская Л. А., Спицын В. А., Гусева И. А., Лимборская С. А. Анализ аллельного полиморфизма триплетных повторов (CTG) n и (CAG) n в генах DM, DRPLA и SCA1 в различных популяциях России // Генетика. – 2002. – Т. 38. – № 11. – С. 1549–1553.

44. Посух О. Л., Вибе В. П., Сукерник Р. И., Осипова Л. П., Карафет Т. М. Генетическое и экологическое изучение коренных жителей Северо-Востока // Генетика. – 1990. – Т. 26. – № 9. – С. 1637–1647.

45. Пузырев В. П., Степанов В. А., Голубенко М. В., Пузырев К. В., Максимова Н. Р., Харьков В. Н., Спиридонова М. Г., Ноговицына А. Н. Генофонд якутов по линиям митохондриальной ДНК и Y-хромосомы. Медико-генетическое исследование населения Республики Саха (Якутия): сборник научных трудов / под ред. В. П. Пузырева // Якутск: ЯФ СО РАН. – 2002. – С. 151–159.

46. Пузырев В. П., Фрейдин М. Б., Кучер А. Н. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека // Томск: «Печатная мануфактура», – 2007. – 320 с.
47. Пузырев В. П. Максимова Н. Р. Наследственные болезни у якутов // Генетика. – 2008. – Т. 44. – № 10. – С. 1308–1314.
48. Раззаков А. А. «Множественная экзостозная хондродисплазия. Клиника, диагностика и лечение» Кандидатская диссертация М. – 1986. – 16 с.
49. Рыжкова О. П., Кардымон О. Л., Прохорчук Е. Б., Коновалов Ф. А., Масленников А. Б., Степанов В. А., Афанасьев А. А., Заклязьминская Е. В., Ребриков Д. В., Савостьянов К. В., Глотов А. С., Костарева А. А., Павлов А. Е., Голубенко М. В., Поляков А. В., Куцев С. И. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) // Медицинская генетика. – 2019. – Т. 18. – № 2. – С. 3–23.
50. Сломинский П. А., Попова С. Н., Фатхлисламова Р. И., Ахмадеева Л. Р., Магжанов Р. В., Хуснутдинова Е. К., Лимборская С. А. Анализ экспансии триплетного (CTG)_n у больных миотонической дистрофией из Башкирии // Генетика. – 2000. – Т. 36. №6. – С. 844–848.
51. Соловьев Ю. Н. Стратегия диагностики опухолей костей // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2003. – Т. 14. – № 4. – С. 8–11.
52. Спицын В. А. Биохимический полиморфизм человека // Москва: Московского университета. – 1985. – 216 с.
53. Спиридонова М. Г., Степанов В. А., Максимова Н. Р., Пузырев В. П. Популяционное исследование частоты полиморфизма C677T гена метилентетрагидрофолат - редуктазы в Якутии // Генетика. – 2004. – Т. 40. № 5. – С. 704–708.
54. Степанов В. А. Этногеномика населения Северной Евразии // Томск: «Печатная мануфактура». – 2002. – 244 с.
55. Степанов В. А. Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонафицированная медицина // Acta Naturae. – 2010. – Т. 2. №4. – С. 18–34.

56. Степанова С. К. Генетическая вариабельность локуса миотонинпротеинкиназы в якутской популяции: специальность 03.02.07 «Генетика»: дис. ... кандидата биологических наук: Томск: НИИ медицинской генетики Томский научный центр СО РАМН. – 2015. – 157 с.
57. Сухомясова А. Л. Аутосомно-доминантная миотоническая дистрофия в Республике Саха (Якутия): специальность 03.00.15 «Генетика»: дис. ... кандидата медицинских наук: Томск: НИИ медицинской генетики Томский научный центр СО РАМН. – 2005. – 189 с.
58. Тарская Л. А., Зинченко Р. А., Ельчинова Г. И., Егорова А. Г., Коротов М. Н., Басова Е. В., Прокопьева А. М., Сивцева Е. Н., Николаева Е. Е., Банщикова Е. С., Самаркина М. В., Санникова А. Н., Данилова Г. И., Желобцова А. Ф., Данилова А. П., Попова Г. Н. Груз наследственных болезней у населения Республики Саха (Якутия) // Генетика. – 2003. – Т. 39. – № 12. – С. 1719–1722.
59. Тарская Л. А. Полиморфизм региона V митохондриальной ДНК у якутов // Медицинская генетика. – 2005. – Т. 4. – № 10. – С. 466–471.
60. Тарская Л. А., Мелтон Ф. Сравнительный анализ митохондриальной ДНК якутов и других монголоидных популяций // Генетика. – 2006. – Т. 42. – № 12. – С. 1703–1711.
61. Федорова С. А., Бермишева М. А., Виллемс Р. И. Максимова Н. Р., Хуснутдинова Э. К. Анализ линий митохондриальной ДНК в популяции якутов // Молекулярная биология. – 2003. – Т. 37. – № 4. – С. 643–653.
62. Федорова С. А., Хусаинова Р. И., Кутуев И. А., Сухомясова А. Л., Николаева И. А., Куличкин С. С., Ахметова В. Л., Салимова А., Святова Г. С., Березина Г. М., Платнов Ф. А., Хуснутдинова Э. К. Полиморфизм (CTG)_n-повторов гена миотонинпротеинкиназы в популяциях Республики Саха (Якутия) и Средней Азии // Молекулярная биология. – 2005. – Т. 39. – № 3. – С. 385–393.
63. Федорова С. А., Сухомясова А. Л., Николаева И. А., Куличкин С. С., Хуснутдинова Э. К., Платнов Ф. А. Аллельный полиморфизм гена миотонинпротеинкиназы в популяциях населения Республики Саха (Якутия) // Наука и образование. – 2005б. – Т.38. – № 2. – С. 59–65.

64. Федорова С. А. Генетические портреты народов РС(Я): анализ линий митохондриальной ДНК и Y-хромосомы // Якутск: ЯНЦ СО РАН. – 2008. – 235 с.
65. Федотов В. П., Курбатов С. А., Никитин С. С., Миловидова Т. Б., Галеева Н.М., Поляков А.В. Семейный случай сегрегации наследственной моторно-сенсорной нейропатии 1В типа с множественными экзостозами у монозиготных близнецов // Нервно-мышечные болезни. – 2015. – № 1. – С. 48–52.
66. Фефелова В. В., Высоцкая Г. С. Изучение распределения антигенов системы HLA у коренных народностей Сибири как основа для анализа этногенеза популяций // Красноярск: Препринт ВЦ СО АН СССР. – 1987. – № 12. – 17 с.
67. Фохтин В. В., Кузнечихин Е. П., Кузин А. С., Махров Л. А. Результаты лечения детей с экзостозной хондродисплазией сложной анатомической локализации // Современные технологии в диагностике и лечении. – 2014. – № 1. – С. 13–16.
68. Харьков В. Н., Степанов В. А., Фещенко С. П., Боринская С. А., Янковский Н. К., Пузырев В. П. Частоты диаллельных гаплогрупп Y-хромосомы у Белорусов // Генетика. – 2005. – Т. 41. – № 8. – С. 1132–1136.
69. Хисаметдинова Г. Р. Возможности ультрасонографии с доплерографией при болезни Пертеса, асептических некрозах головки бедренной кости другого генеза и транзисторном синовите тазобедренного сустава у детей: 14.00.19 «Лучевая диагностика, лучевая терапия»: автореферат дис. ... доктора медицинских наук: Москва, и ФГУ «Российский научный центр рентгенорадиологии Росмедтехнологий». – 2007. – 23 с.
70. Хитринская И. Ю. Генетическое разнообразие коренного населения Сибири и Средней Азии по полиморфным Alu-инсерциям: 03.00.15 15 «Генетика»: дис. ... кандидата биологических наук: Томск: НИИ медицинской генетики Томский научный центр СО РАМН. – 2003. – 165с.
71. Хитринская И. Ю., Степанов В. А., Пузырев В. П., Спиридонова М. Г., Пузырев К. В., Максимова Н. Р., Ноговицына А. Н. Генетическое своеобразие населения Якутии по данным аутосомных локусов // Молекулярная биология. – 2003. – Т. 37. – № 2. – С. 234–238.

72. Цыбанов А. С. Хирургическое лечение детей и с экзостозной хондродисплазией: специальность 14.00.22 «Травматология и ортопедия»: автореферат дис. ... кандидата медицинских наук: Санкт-Петербург: ГУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии». – 2004. – 10 с.
73. Чердонова А. М., Пшенникова В. Г., Соловьев А. В., Кузьмина С. С., Романов Г. П., Кононова С. К., Федорова С. А., Барашков Н. А. Биоэтические аспекты ДНК-тестирования наследственных нарушений слуха в Якутии // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19. – № 10. – С. 93–94.
74. Чеснокова Г. Г. Изучение структурных аномалий и точковых мутаций генов *EXT1* и *EXT2* при множественной экзостозной хондродисплазии и спорадических злокачественных новообразованиях: специальность 03.00.15 «Генетика»: автореферат дис. ... кандидата биологических наук: Москва: Мед. генет. науч. центр РАМН. – 1999. – 24 с.
75. Шавырин Д. А. Диагностика и хирургическое лечение опухолей и опухолеподобных заболеваний костей, образующий коленный сустав, у взрослых: специальность 14.01.15 «Травматология и ортопедия»: дис. ... доктора медицинских наук: Москва: Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова ГУН. – 2014. – 240 с.
76. Шишкина Н. С., Горельшева В. А., Семенцова Е. М., Субботина Т. И., Смирнова О. М., Дедов И. И. Сочетание сахарного диабета и синдрома множественной экзостозной костно-хрящевой хондродисплазии // Сахарный диабет. – 2004. – №4. – С. 34–36.
77. Шевелев О. Б., Рыкова В. И., Федосеева Л. А., Леберфарб Е. Ю., Дымшиц Г. М., Колосова Н. Г. Экспрессия генов *EXT1*, *EXT2* и гепараназы в мозге преждевременно стареющих крыс охус в период раннего онтогенеза и развития нейродегенеративных изменений // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – № 1. – С. 71–78.
78. Яковлева А. Е., Данилова А. Л., Гуринова Е. Е., Иванова Р. Н., Сухомясова А. Л., Максимова Н. Р. Изучение множественной экзостозной хондродисплазии в Республике Саха (Якутия) // Вестник СВФУ им. М.К. Аммосова, серия «Медицинские науки». – 2016. – № 3(04). – С. 114–117.

79. Яковлева А. Е., Максимова Н. Р. Молекулярно-генетические причины множественной экзостозной хондродисплазии // Якутский медицинский журнал. – 2018. – № 3. – С. 94–98.
80. Яковлева А. Е., Петухова Д. А., Голикова П. И., Гуринова П. И., Данилова А. Л., Сухомясова А. Л., Максимова Н. Р. Случай множественной экзостозной хондродисплазии в якутской семье, обусловленной редкой мутацией в гене *EXT2* // Медицинская генетика. – 2019. – № 12. – С. 25–33.
81. Яковлева А. Е., Данилова А. Л., Федоров А. И., Петухова Д. А., Николаева И. А., Сухомясова А. Л., Максимова Н. Р. Гено-фенотипический анализ у больных с множественной экзостозной в якутской популяции // Медицинская генетика. – 2022. – Т. 21. – № 10. – С. 69–74.
82. Ahn J., Ludecke H. J., Lindow S., Horton W., Lee B. H., Wagner M., Horsthemke B., Wells D. Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (*EXT1*) // Nature Genet. – 1995. – Vol. 11. – P. 137–143.
83. Alvarez C., Tredwell S., De Vera M., Hayden M. The genotype-phenotype correlation of hereditary multiple exostoses // Clin Genet. – 2006. – V. 70. – P. 122–30.
84. Alvarez C. M., De Vera M. A., Heslip T. R., Casey B. Evaluation of the anatomic burden of patients with hereditary multiple exostoses // Cl. Orthopaedics and related research. – 2007. – № 462. – P. 73–79.
85. Al-Zayed Z., Al-Rijjal R. A., Al-Ghofaili L., BinEssa H. A., Pant R., Alrabiah A., Al-Hussainan T., Zou M., Meyer B. F., Shi Y. Mutation spectrum of *EXT1* and *EXT2* in the Saudi patients with hereditary multiple exostoses // Orphanet J. Rare Dis. – 2021. – V. 16. – № 100. – P. 1–11.
86. Anower-E-Khuda M. F., Matsumoto K., Habuchi H., Morita H., Yokochi T., Shimizu K., Kimata K. Glycosaminoglycans in the blood of hereditary multiple exostoses patients: half reduction of heparan sulfate to chondroitin sulfate ratio and the possible diagnostic application // Glycobiology. – 2013. – V. 23. – P. 865–876.
87. Baitner A. C., Maurer S. G., Gruen M. B., Cesare P. E. Di. The Genetic Basis of the Osteochondrodysplasias // Journal of Pediatric Orthopaedics. – 2000. – V. 20. – № 5. – P. 594–605.

88. Baralle D., Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes // *J. Med Genet.* – 2005. – V. 42. – № 10. – P. 737–748.
89. Beighton P., Giedion A., Gorlin R., Hall J., Horton B., Kozłowski K., Lachman R., Langer L., Maroteaux P., Poznanski A., Rimoin D., Sillence D., Spranger J., T. Bone J. International classification of osteochondrodysplasias // *American Journal of Medical Genetics.* – 1992. – V. 44. – P. 223–229.
90. Beighton P., Sujansky E., Patzak B., Portele K. A. Genetic skeletal dysplasias in the Museum of Pathological Anatomy, Vienna // *American journal of medical genetics.* – 1993. – V. 47. – № 6. – P. 843-847.
91. Bernard M. A., Hall C. E., Hogue D. A., Cole W. G., Scott A., Snuggs M. B., Clines G. A., Lüdecke H. J., Lovett M., Van Winkle W. B., Hecht J. T. Diminished levels of the putative tumor suppressor proteins *EXT1* and *EXT2* in exostosis chondrocytes // *Cell Motil Cytoskeleton.* – 2001. – V. 48. – P. 149–162.
92. Billings P. C., Pacifici M. Interactions of signaling proteins, growth factors and other proteins with heparan sulfate: mechanisms and mysteries // *Connect Tissue Res.* – 2015. – V. 56. – P. 272–280.
93. Bishop J. R., Schuksz M., Esko J. D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology // *Nature.* – 2007. – V. 446. – P. 1030–1037.
94. Bonafe L., Cormier-Daire V., Hall C., Lachman R., Mortier G., Mundlos S., Nishimura G., Sangiorgi L., Savarirayan R., Sillence D., Spranger J., Superti-Furga A., Warman M., Unger S. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision // *American journal of medical genetics Part A.* – 2015. – V. 167 A. – P. 2869–2892.
95. Bozzola M., Gertosio C., Gnoli M., Baronio F., Pedrini E., Meazza C., Sangiorgi L. Hereditary multiple exostoses and solitary osteochondroma associated with growth hormone deficiency: to treat or not to treat? // *Italian Journal of Pediatrics.* – 2015. – V. 41:53. – P. 1–6.
96. Bovee J. V., Cleton-Jansen A. M., Wuyts W., Caethoven G., Taminiau A. H., Bakker E., Van Hul W., Cornelisse C. J., Hogendoorn P. C. *EXT*-mutation analysis

and loss of heterozygosity in sporadic and hereditary osteochondromas and secondary chondrosarcoma // *Am J Hum Genet.* – 1999. – V. 65. – P. 689–698.

97. Bovee J. V. Multiple osteochondromas // *Orphanet Journal of Rare Diseases.* – 2008. – V. 3. – № 3.

98. Brattstrom L., Wilcken D. E., Ohrvik J., Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis // *Circulation.* – 1998. – V. 98. – № 23. – P. 2520–2526.

99. Buckland R. A., Collinson J. M., Graham E., Davidson D. R., Hill R. E. Antagonistic effects of FGF4 on BMP induction of apoptosis and chondrogenesis in the chick limb bud // *Mech Dev.* – 1998. – V. 71. – P. 143–150.

100. Busse-Wicher M., Wicher K. B., Kusche-Gullberg M. The extostotin family: Proteins with many functions // *Matrix Biology.* – 2014. – V. 35. – P. 25–33.

101. Cadenas A. M., Zhivotovsky L. A., Cavalli-Storza L. L., Underhill P. A., Herrera R. J. Y-chromosome diversity characterizes the Gulf of Oman // *European Journal of Human Genetics.* – 2008. – V. 16. – № 3. – P. 374–386.

102. Cheung P. K., McCormick C., Crawford B. E., Esko J. D., Tufaro F., Duncan G. Etiological point mutations in the hereditary multiple exostoses gene *EXT1*: a functional analysis of heparan sulfate polymerase activity // *Am J. Hum Genet.* – 2001. – V. 69. – № 1. – P. 55–66.

103. Chen X-J., Zhang H., Tan Z-P., Hu W., Yang Yi-F. Novel mutation of *EXT2* identified in a large family with multiple osteochondromas // *Mol Med Rep.* – 2016. – V. 14. – P. 4687–4691.

104. Ciavarella M., Coco M., Baorda F., Stanziale P., Chetta M., Bisceglia L., Palumbo P., Bengala M., Raiteri P., Silengo M., Caldarini C., Facchini R., Lala R., Cavaliere M. L., Brasi D. De., Pasini B., Zelante L., Guarnieri V., D'Agruma L. 20 novel point mutations and one large deletion in *EXT1* and *EXT2* genes: report of diagnostic screening in a large Italian cohort of patients affected by hereditary multiple exostosis // *Gene.* – 2013 – V. 515. – P. 339–348.

105. Clement N. D., Porter D. E. Hereditary multiple exostoses: anatomical distribution and burden of exostoses is dependent upon genotype and gender // *Scottish Med J.* – 2014. – V. 59. – P. 34–44.
106. Cox M. P., Redd A. J., Karafet T. M., Ponder C. A., Lansing S., Sudoyo H., Hammer M. F. A Polynesian motif on the Y chromosome: population structure in remote Oceania // *Human Biology.* – 2007. – V. 79. – № 5. – P. 525–535.
107. Dhoot G. K., Gustafsson M. K., Ai X., Sun W., Standiford D. M., Emerson C. P. Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase // *Science.* – 2001. – № 293. – P. 1663–1666.
108. Dobson-Stone C., Cox R. D., Lonie L., Southam L., Fraser M., Wise C., Bernier F., Hodgson S., Porter D. E., Simpson A. H., Monaco A. P. Comparison of fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis and denaturing high-performance liquid chromatography for detection of *EXT1* and *EXT2* mutations in hereditary multiple exostoses // *European Journal of Human Genetics.* – 2000. – V. 8. – P. 24–32.
109. Faiyaz-Ul-Haque M. Ahmad W. Zaidi S. H. E., Hussain S., Haque S., Ahmad M., Cohn D. H., Tsui L-C. Novel mutations in the *EXT1* gene in two consanguineous families affected with multiple hereditary exostoses (familial osteochondromatosis) // *Clinical Genetics.* – 2004. – V. 66. – P. 144–151.
110. Fusco C., Nardella G., Rita Fischetto R., Copetti M., Petracca A., Annunziata F., Augello B., D'Asdia M. C., Petrucci S., Mattina T., Rella A., Cassina M., Bengala M., Biagini T., Causio F. A., Caldarini C., Brancati F., De Luca A., Guarnieri V., Micale L., D'Agruma L., Castori M. Mutational spectrum and clinical signatures in 114 families with hereditary multiple osteochondromas: insights into molecular properties of selected exostosin variants // *Human Molecular Genetics.* – 2019. – V. 00. – № 00. – P. 1–10.
111. Goldfarb L. G., Vasconcelos O., Platonov F. A., Lunkes A., Kipnis V., Kononova S., Chabrashvili T., Vladimirtsev, V. P. Alexeev, Gajdusek D. C. Unstable triplet and phenotypic variability of spinocerebellar ataxia type 1 // *Ann. Neurol.* – 1996. – V. 39. – P.500–506.

112. Goni O. The elusive functions of EXT1 and EXT2: Thesis is submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Philosophy in Global Health at the University of Bergen. Norway. – 2021. – 55 p.
113. Grasemann H., Yandava C. N., Drazen J. M. Neuronal NO synthase (NOS1) is a major candidate gene for asthma // *Clinical and Experimental Allergy*. – 1999. – V. 29. – № 4. – P. 39–41.
114. Hall C. M. International nosology, and classification of constitutional disorders of bone // *American Journal of Medical Genetics*. – 2002. – V. 113. – P. 65–77.
115. Hameetman L., Szuhai K., Yavas A., Knijnenburg J., Van Duin M., Van Dekken H., Taminiau A. H. M., Cleton-Jansen A-M., Bovée J. V. M. G., Hogendoorn P. C. W. The role of *EXT1* in nonhereditary osteochondroma: identification of homozygous deletions // *J Natl Cancer Inst*. – 2007. – V. 99. – P. 396–406.
116. Heinritz W., Huffmeier U., Streng S., Mitterski B., Zweier C., Leinung S., Bohring A., Mitulla B., Peters U., Froster U. G. New mutations of *EXT1* and *EXT2* genes in German patients with multiple osteochondromas // *Genet*. – 2009. – V. 73. – P. 283–291.
117. Hecht J. T., Hogue D., Strong L. C., Hansen M. F., Blanton S. H., Wagner M. Hereditary multiple exostosis and chondrosarcoma: linkage to chromosome 11 and loss of heterozygosity for *EXT*-linked markers on chromosome 11 and 8. // *Am J Hum Genet*. – 1995. – V. 56. – P. 1125–1131.
118. Hecht J. T., Hogue D., Wang Y., Blanton S. H., Wagner M., Strong L. C., Raskind W., Hansen M. F., Wells D. Hereditary multiple exostoses (*EXT*): mutational studies of familial *EXT1* cases and *EXT*-associated malignancies // *Genet*. – 1997. – V. 60. – P. 80–86.
119. Hennekam R. C. Hereditary multiple exostoses // *Journal of Medical Genetics*. – 1991. – V. 28. – P. 262–266.
120. Hong G., Guo X., Yan W., Li Q., Zhao H., Ma P., Hu X. Identification of a novel mutation in the *EXT1* gene from a patient with multiple osteochondromas by exome sequencing // *Molecular Medicine Reports*. – 2017. – V. 15. – P. 657–664.

121. Huegel J., Mundy C., Sgariglia F., Nygren P., Billings P. C., Yamaguchi Y., Koyama E., Pacifici M. Perichondrium phenotype and border function are regulated by EXT1 and heparan sulfate in developing long bones: a mechanism likely deranged in hereditary multiple exostoses // *Dev Biol.* – 2013. – V. 377. – P. 100–112.
122. Huegel J., Sgariglia F., Enomoto-Iwamoto M., Koyama E., Dormans J. P., Pacifici M. Heparan sulfate in skeletal development, growth, and pathology: the case of hereditary multiple exostoses // *Dev Dyn.* – 2013. – V. 242. – P. 1021–1032.
123. Huegel J., Enomoto-Iwamoto M., Sgariglia F., Koyama E., Pacifici M. Heparanase stimulates chondrogenesis and is up-regulated in human ectopic cartilage. A mechanism possibly involved in hereditary multiple exostoses // *Am J. Path.* – 2015. – V. 185. – P. 1676–1685.
124. Irie F., Badie-Mahdavi H., Yamaguchi Y. Autism-like socio-communicative deficits and stereotypies in mice lacking heparan sulfate // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2012. – V. 109. – P. 5052–5056.
125. Ishimaru D., Gotoh M., Takayama S., Kosaki R., Matsumoto Y., Narimatsu H., Sato T., Kimata K., Akiyama H., Shimizu K., Matsumoto K. Large-scale mutational analysis in the *EXT1* and *EXT2* genes for Japanese patients with multiple osteochondromas // *BMC Genomics.* – 2016. – V. 17. – № 52. – P. 1–7.
126. Jager M., Westhoff B., Portier S., Leube B., Hardt K., Royer-Pokora B., Gossheger G., Krauspe R. Clinical Outcome and Genotype in Patients with Hereditary Multiple Exostoses // *Inter Science.* – 2007. – V. 19. – P. 1541–1551.
127. Jamsheer A., Socha M., Sowinska-Seidler A., Telega K., Trzeciak T., Latos-Bieleńska A. Mutational screening of *EXT1* and *EXT2* genes in Polish patients with hereditary multiple exostoses // *Journal of Applied Genetics.* – 2014. – V. 55. – P. 183–188.
128. Jennes I., Pedrini E., Zuntini M., Mordenti M., Balkassmi S., Asteggiano C. G., Casey B., Bakker B., Sangiorgi L., Wuyts W. Multiple osteochondromas: mutation update and description of the multiple osteochondromas mutation database (MOdb) // *Hum Mutat.* – 2009. – V. 30. – № 12. – P. 1620–1627.

129. Jorde L., Carey J., Bamshad M. Medical genetics. 4th edition. Mosby. – 2010. – 368 p.
130. Jones K. B., Piombo V., Searby C., Kurriger G., Yang B., Grabellus F., Roughley P. J., Morcuende J. A., Buckwalter J. A., Capecchi M. R., Vortkamp A., Sheffield V. C. A mouse model of osteochondromagenesis from clonal inactivation of EXT1 in chondrocytes A mouse model of osteochondromagenesis from clonal inactivation of EXT1 in chondrocytes // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – V. 107. – P. 2054–2059.
131. Joseph C. G., Darrah E., Shah A. A., Skora A. D., Casciola-Rosen L. A., Wigley F. M., Boin F., Fava A., Thoburn C., Kinde I., Jiao Y., Papadopoulos N., Kinzler K. W., Vogelstein B., Rosen A. Association of the autoimmune disease schleroderma with an immunologic response to cancer // Science. – 2014. – V. 343. – P. 152–157.
132. Jurik A. G. Multiple hereditary exostoses and enchondromatosis // Journal Best Practice & Research Clinical Rheumatology. – 2020. – V. 34. – № 3. – P. 1–11.
133. Kang Q., Xu J., Zhang Z., He J-W., Fu W-Zh., Zhang Zh-L. Mutation screening for the *EXT1* and *EXT2* Genes in Chinese Patients with multiple Osteochondromas // Archives of Medical Research. – 2013. – V. 44. – P. 542–548.
134. Kim S., Lee Ch-H., Choi S-Y., Kim M-K., Jung S. T. A Genotype-Phenotype Study of Multiple Hereditary Exostoses in Forty-Three Patient // J. Clin. Med. – 2022. – V. 11. № 3703. – P. 1–14.
135. Knudson A. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1971. – V. 68. – P. 820–823.
136. Knudson A. G. Hereditary cancer: two hits revisited // J. Cancer Res Clin Oncol. – 1996. – V. 122. – P. 135–140.
137. Kondo H., Maksimova N., Takanobu O., Kato H., Imai A., Asano Y., Kobayashi K., Nojima S., Nakaya A., Hamada Y., Irahara K., Gurinova E., Sukhomyasova A., Nogovicina A., Savvina M., Yoshimori T., Ozono K., Sakai N. Mutation in *VPS33A* affects metabolism of glycosaminoglycans: a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms // Human Molecular Genetics. – 2017. – V. 0. – № 0. – P. 1–11.

138. Komura S., Matsumoto K., Hirakawa A., Akiyama H. Natural History and Characteristics of Hand Exostoses in Multiple Hereditary Exostoses // *Journal of Hand Surgery*. – 2021. – V. 46. – P. 815.e1–815.e12.
139. Koziel L., Kunath M., Kelly O. G., Vortkamp A. EXT1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification // *Dev Cell*. – 2004. – V. 6. – P. 801–813.
140. Krooth R., Macklin M., Hilbish T. Diaphysial aclasis (multiple exostoses) in Guam // *American journal of medical genetics*. – 1961. – V. 13. – P. 340–347.
141. Lappalainen T., Laitinen V., Salmela E., Andersen P., Huoponen K., Savontaus M-L., Lahermo P. Migration Waves to the Baltic Sea Region // *Journal compilation*. – 2008. – V. 72 (Pt 3) – P. 337–348.
142. Lachman R. S. International nomenclature, and classification of the osteochondrodysplasia // *Pediatric Radiology*. – 1998. – V. 28. – P. 737–744.
143. Legeai-Mallet L., Munnich A., Maroteaux P., Merrer M. Le. Incomplete penetrance and expressivity skewing in hereditary multiple exostoses // *Clin Genet*. – 1997. – V. 52. – P. 12–16.
144. Lek M., Karczewski K. J., Minikel E. V., Samocha K. E., Banks E., Fennell T., O'Donnell-Luria A. H., Ware J. S., Hill A. J., Cummings B. B., Tukiainen T., Birnbaum D. P., Kosmicki J. A., Duncan L. E., Estrada K., Zhao F., Zou J., Pierce-Hoffman E., Berghout J., Cooper D. N., DeFlaux N., DePristo M., Do R., Flannick J., Fromer M., Gauthier L., Goldstein J., Gupta N., Howrigan D., Kiezun A., Kurki M. I., Moonshine A. L., Natarajan P., Orozco L., Peloso G. M., Poplin R., Rivas M. A., Ruano-Rubio V., Rose S. A., Ruderfer D. M., Shakir K., Stenson P. D., Stevens C., Thomas B. P., Tiao G., Tusie-Luna M. T., Weisburd B., Won H-H., Yu D., Altshuler D. M., Ardissino D., Boehnke M., Danesh J., Donnelly S., Elosua R., Florez J. C., Gabriel S. B., Getz G., Glatt S. J., Hultman C. M., Kathiresan S., Laakso M., McCarroll S., McCarthy M. I., McGovern D., McPherson R., Neale B. M., Palotie A., Purcell S. M., Saleheen D., Scharf J. M., Sklar P., Sullivan P. F., Tuomilehto J., Tsuang M. T., Watkins H. C., Wilson J. G., Daly M. J., MacArthur D. G. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans // *Nature*. – 2016. – V. 536. – P. 285–291.

145. Liang Ch., Wang Y-J., Wei Y-X., Dong Y., Zhang Z-Ch. Identification of Novel *EXT* Mutations in Patients with Hereditary Multiple Exostoses Using Whole-Exome Sequencing // Orthopaedic Surgery. – 2020. – V. 12. – P. 990–996.
146. Lin X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development // Development. – 2004. – V. 131 – P. 6009–6021.
147. Li Y., Wang J., Wang Z., Tang J., Yu T. A genotype-phenotype study of hereditary multiple exostoses in forty-six Chinese patients // BMC Medical Genetics. – 2017. – V. 18. – № 126. – P. 1–7.
148. Lonie L., Porter D. E., Fraser M., Cole T., Wise C., Yates L., Wakeling E., Blair E., Morava E., Monaco A. P., Ragoussis J. Determination of the mutation spectrum of the *EXT1/EXT2* genes in British Caucasian patients with multiple osteochondromas, and exclusion of six candidate genes in *EXT* negative cases // Human Mutation. – 2006. – V. 27. – P. 1160.
149. Lunkes A., Goldfarb L. G., Platonov F. A., Alexeev V. P., Duenas-Barajas E., Gajdusek D. C., Auburger G. Autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA) in Siberian ataxia type 1 // Exp. Neurol. – 1994. – V. 126. – P. 310–312.
150. Makhdom A. M., Jiang F., Hamdy R. C., Benaroch T. E., Lavigne M., Saran N. Hip Joint Osteochondroma: Systematic Review of the Literature and Report of Three Further Cases // Arch in Orth. – 2014. – V. 20. – P. 1–10.
151. Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. F. Molecular Cloning - A Laboratory Manual // Cold Spring Harbor Press (New York). – 1982. – P. 76–85.
152. Matsumoto K., Irie F., Mackem S., Yamaguchi Y. A mouse model of chondrocyte-specific somatic mutation reveals a role for *EXT1* loss of heterozygosity in multiple hereditary exostoses // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – V. 107. – P. 10932–10937.
153. McCormick C., Leduc Y., Martindale D., Mattison K., Esford L. E., Dyer A. P., Tufaro F. The putative tumour suppressor *EXT1* alters the expression of cell-surface heparan sulfate // Nature Genetics. – 1998. – V. 19. – P. 158–161.

154. McCormick C., Duncan G., Goutsos K. T., Tufaro F. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – V. 97. – № 2. – P. 668–673.
155. Medek K., Zeman J., Honzík T., Hansíková H., Švecová S., Beránková K., Vidrová V. K., Kuklík M., Chomiak J., Tesařová M. Hereditary Multiple Exostoses: Clinical, Molecular and Radiologic Survey in 9 Families // *Prague Medical Report*. – 2017. – V. 118. – № 2–3. – P. 87–94.
156. Mooij H. L., Cabrales P., Bernelot Moens S. J., Xu D., Udayappan S. D., Tsai A. G., Van der Sande M. A. J., De Groot E., Intaglietta M., Kastelein J. J. P., Dallinga-Thie G. M., Esko J. D., Stroes E. S., Nieuwdorp M. Loss of Function in Heparan Sulfate Elongation Genes *EXT1* and *EXT2* Results in Improved Nitric Oxide Bioavailability and Endothelial Function // *Journal of the American Heart Association*. – 2014. – 3: e001274. – P. 1–10.
157. Mooij H. L., Bernelot-Moens S. J., Gordts P. L., Stanford K., Foley E. M., Van den Boogert M. A. W., Witjes J. J., Hassing H. C., Tanck M. W., Van de Sande M. A. J., Levels J. H., Kastelein J. J. P., Stroes E. S. G., Dallinga-Thie G. M., Esko J. D., Nieuwdorp M. *Ext1* heterozygosity causes a modest effect on postprandial lipid clearance in humans // *J Lipid Res*. – 2015. – V. 56. – P. 665–673.
158. Mortier G. R., Cohn D. H., Cormier-Daire V., Hall C., Krakow D., Mundlos S., Nishimura G., Robertson S., Sangiorgi L., Savarirayan R., Sillence D., Superti-Furga A., Unger Sh., Warman M. L. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision // *American Journal of Medical Genetics. Part A*. – 2019. – V. 179. – P. 2393–2419.
159. Morimoto-Tomita M., Uchimura K., Werb Z. Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mouse and human // *J. Biol. Chem*. – 2002. – № 277. – P. 49175–49185.
160. Novelli G., Spedini G., Destro-Bisol G., Gennarelli M., Fattorini C., Dalla-piccola B. North Eurasian origin of the myotonic dystrophy mutation // *Hum. Mutat*. – 1994. – V. 4. – P. 79–81.

161. Nykamp K., Anderson M., Powers M., Garcia J., Herrera B., Ho Ya-Ya., Kobayashi Ya., Patil N., Thusberg J., Westbrook M., Topper S. Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG–AMP variant classification criteria // *Journal of the American College of Medical Genetics and Genomics*. – 2017. – V. 00. – P. 1–13.
162. Ornitz D. M., Marie P. J. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease // *Genes Dev*. – 2015. – V. 29. – P. 1463–1486.
163. Pan H., Lin H., Ku W., Li T. C., Li S. Y., Lin C. C., Hsiao K. M. Haplotype analysis of the myotonic dystrophy type 1 (DM1) locus in Taiwan: implications for low prevalence and founder mutations of Taiwanese myotonic dystrophy type 1 // *Eur. J. Hum. Genet*. – 2001. – V. 9. – P. 638–641.
164. Pakendorf B., Wiebe V., Tarskaia L. A. Spitsyn V. A., Soodyall H., Rodewald A., Stoneking M. Mitochondrial DNA evidence for admixed origins of central Siberian populations // *American journal of physical anthropology*. – 2003. – V. 120. – № 3. – P. 211–224.
165. Pakendorf B., Novgorodov I. N., Osakovskij V. L., Danilova A. P., Protod'jakonov A. P., Stoneking M. Investigating the effects of prehistoric migrations in Siberia: genetic variation and the origins of Yakuts // *Human Genetics*. – 2006. – V. 120. – № 3. – P. 334–353.
166. Pacifici M. Hereditary Multiple Exostoses: New Insights into Pathogenesis, Clinical Complications, and Potential Treatments // *National library of medicine: Curr Osteoporos Rep*. – 2017. – V. 15. – № 3. – P. 142–152.
167. Pedrini E., De Luca A., Valente E. M., Maini V., Capponcelli S., Mordenti M., Mingarelli R., Sangiorgi L., Dallapiccola B. Novel *EXT1* and *EXT2* Mutations Identified by DHPLC in Italian Patients with Multiple Osteochondromas // *Human Mutation Mutation in Brief*. – 2005. – V. 830. – P. 1–10.
168. Pedrini E., Jennes I., Tremosini M., Milanese A., Mordenti M., Parra A., Sgariglia F., Zuntini M., Campanacci L., Fabbri N., Pignotti E., Wuyts W., Sangiorgi L. Genotype-phenotype correlation study in 529 patients with hereditary multiple exostoses: identification of «protective» and «risk» factors // *J. Bone Joint Surg*. – 2011. – V. 93. № 24. – P. 2294–2302.

169. Pei Y., Wang Y., Huang W., Hu B., Huang D., Zhou Y., Su P. Novel mutations of *EXT1* and *EXT2* genes among families and sporadic cases with multiple exostoses // Genetic Testing and Molecular Biomarkers. – 2010. – V. 14. – № 6. – P. 865–872.
170. Philippe C., Porter D. E., Emerton M. E., Wells D. E., Simpson A. H., Monaco A. P. Mutation screening of the *EXT1* and *EXT2* genes in patients with hereditary multiple exostoses // Genet. – 1997. – V. 61. – № 3. – P. 520–528.
171. Popova S. N., Slominsky P. A., Pocheshnova E. A., Balanovskaya E. V., Tarskaya L. A., Bebyakova N. A., Bets L. V., Ivanov V. P., Livshits L. A., Khusnutdinova E. K., Spitsyn V. A., Limborska S. A. Polymorphism of trinucleotide repeats in loci DM, DRPLA and SCA1 in East European populations // Eur. J. Hum. Genet. – 2001. – V. 9. – № 11. – P. 829–835.
172. Porter D. E., Lonie L., Fraser M., Dobson-Stone C., Porter J. R., Monaco A. P., Simpson A. H. R. W. Severity of disease and risk of malignant change in hereditary multiple exostoses. A genotype-phenotype study // The Bone & Joint Journal. 2004. – V. 86 – № 7. – P. 1041-1046.
173. Pritchard M. P., Havitz M. E., Howard D. R. Analyzing the Commitment-LoyaltyLink in Service Contexts // J. of the academy of marketing science. – 1999. – V. 27. – № 3. – P. 333–348.
174. Raskind W. H., Conrad E. U., Matsushita M., Wijsman E. M., Wells D. E., Chapman N., Sandell L. J., Wagner M., Houck J. Evaluation of locus heterogeneity and *EXT1* mutations in 34 families with hereditary multiple exostoses // Human Mutation. – 1998. – V. 11. – № 3. – P. 231–239.
175. Reijnders C. M. A., Waaijer C. J., Hamilton A., Buddingh E. P., Dijkstra S. P. D., Ham J., Bakker E., Szuhai K., Karperien M., Hogendoorn P. C. W., Stringer S. E., Bovée J. V. M. G. No haploinsufficiency but loss of heterozygosity for *EXT* in multiple osteochondromas // Am J Path. – 2010. – V. 177. – № 4. P. 1946–1957.
176. Rimoin D. L. International nomenclature of constitutional diseases of bone with bibliography // Birth Defects: Original Article Series. – 1979. – V. 15. – № 10. – P. 30.

177. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W. W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H. L. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // *Genetics in Medicine*. – 2015. – V. 17. – № 5. – P. 405–423.
178. Rosenberg N. A., Pritchard J. K., Weber J. L., Cann H. M., Kidd K. K., Zhivotovsky L. A., Feldman M. W. Genetic Structure of Human Populations // *Science*. – 2002. – V. 298. – № 5602. – P. 2381–2385.
179. Rubin P. On organizing a dynamic classification of bone dysplasias // *Arthritis and rheumatis*. – 1964. – V. 7. – P. 693–708.
180. Salazar V. S., Gamer L. W., Rosen V. BMP signaling in skeletal development, disease and repair // *Nat Rev Endocrinol*. – 2016. – V. 12. – № 4. – P. 203–221.
181. Santos J. E. P., Villasenor M., Robinson P. H., DePeters E. J., Holmberg C. A. Type of Cottonseed and Level of Gossypol in Diets of Lactating Dairy Cows: Plasma Gossypol, Health, and Reproductive Performance // *J. Dairy Sci*. – 2003. – V. 86 – № 3. – P. 892–905.
182. Santos S. C. L., Rizzo I. M. P. O, Takata R. I., Speck-Martins C. E., Brum J. M., Sollaci C. Analysis of mutations in *EXT1* and *EXT2* in Brazilian patients with multiple osteochondromas // *Mol Genet Genomic Med*. – 2018. – V. 6. – № 3. – P. 382–392.
183. Sarrion P., Sangorrin A., Urreiziti R., Delgado A., Artuch R., Martorell L., Armstrong J., Anton J., Torner F., Vilaseca M. A., Nevado J., Lapunzina P., Asteggiano C. G., Balcells S., Grinberg D. Mutations in the *EXT1* and *EXT2* genes in Spanish patients with multiple osteochondromas // *Scientific Reports*. – 2013. – V. 3. – P. 1–7.
184. Sarrazin S., Lamanna W. C., Esko J. D. Heparan sulfate proteoglycans // *Cold Spring Harb Prospect Biol*. – 2011. – V. 3. – № 7. – P. a004952.
185. Seki H., Kubota T., Ikegawa S., Haga N., Fujioka F., Ohzeki S., Wakui K., Yoshikawa H., Takaoka K., Fukushima Y. Mutation Frequencies of *EXT1* and *EXT2* in 43 Japanese Families with Hereditary Multiple Exostoses // *American Journal of Medical Genetics*. – 2001. – V. 99. – № 1. – P. 59–62.

186. Sgariglia F., Candela M. E., Huegel J., Jacenko O., Koyama E., Yamaguchi Yu., Pacifici M., Enomoto-Iwamoto M. Epiphyseal abnormalities, trabecular bone loss and articular chondrocyte hypertrophy develop in the long bones of postnatal *EXT1*-deficient mice // *Bone*. – 2013. – V. 57. – № 1. – P. 220–231.
187. Signori E., Massi E., Matera M. G., Poscente M., Gravina C., Falcone G., Rosa M. A., Rinaldi M., Wuyts W., Seripa D., Dallapiccola B., Fazio V. M. A Combined Analytical Approach Reveals Novel *EXT1/2* Gene Mutations in a Large Cohort of Italian Multiple Osteochondromas Patients // *Genes, Chromosomes & Cancer*. – 2007. – V. 46. – P. 470–477.
188. Spranger J. International classification of osteochondrodysplasias. The international working group on constitutional diseases of bone // *European Journal of Pediatrics*. – 1992. – V. 151. – № 6. – P. 407–415.
189. Stickens D., Clines G., Burbee D., Ramos P., Thomas S., Hogue D., Hecht J. T., Lovett M., Evans G. A. The *EXT2* multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes // *Nature Genetics*. – 1996. – V. 14. – № 1. – P. 25–32.
190. Stickens D., Zak B. M., Rougier N., Esko J. D., Werb Z. Mice deficient in *EXT2* lack heparan sulfate and develop exostoses // *Development*. – 2005. – V. 132. – № 22. – P. 5055–5068.
191. Superti-Furga A., Unger S. and the Nosology Group of the International Skeletal Dysplasia Society. 2007. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2006 revision // *American journal of medical genetics Part A*. – 2007. – V. – 143A. – № 1. – P. 1–18.
192. Tanteles G. A., Nicolaou M., Neocleous V., Shammass C., Loizidou M. A., Alexandrou A., Ellina E., Patsia N., Sismani C., Phylactou L. A., Christophidou-Anastasiadou V. Genetic screening of *EXT1* and *EXT2* in Cypriot families with hereditary multiple osteochondromas // *Journal of Genetics*. – 2015. – V. 94. – № 4. – P. 749–754.
193. Tian C., Yan R., Wen S., Li X., Li T., Cai Zh., Li X., Du H., Chen H. A Splice Mutation and mRNA Decay of *EXT2* Provoke Hereditary Multiple Exostoses // *PLOS One*. – 2014. – V. 9. – № 4. – P. 1–9.

194. TruSight One Sequencing Panel Series: Reference Guide. 2018. URL: https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-suport/documents/documentation/chemistry_documentation/trusight_one/trusight-one-sequencing-panel-reference-guide-15046431-03.pdf (дата обращения: 02.07.2021).
195. Wang X., Li L., Li J., Sun J., Heng X., Gong Y., Liu Q. Pathogenic Gene Screening and Mutation Detection in a Chinese Family with Multiple Osteochondroma // Genetic Testing and Molecular Biomarkers. – 2012. – V. 16. – № 7. – P. 827–832.
196. Wang Y., Zhong L., Xu Y., Ding L., Ji Y., Schutz S., Férec C., Cooper D. N., Xu C., Chen J-M., Luo Y. *EXT1* and *EXT2* variants in 22 Chinese families with multiple osteochondromas: seven new variants and potentiation of preimplantation genetic testing and prenatal diagnosis // Frontiers in Genetics. – 2020. – V. 11. – P. 1–13.
197. Warman M. L., Cormier-Daire V., Hall C., Krakow D., Lachman R., LeMerrer M., Mortier G., Mundlos S., Nishimura G., Rimoin D. L., Robertson S., Savarirayan R., Sillence D., Spranger J., Unger Sh., Zabel B., Superti-Furga A. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision // American Journal of Medical Genetics. – 2011. – V. 155A. – № 5. – P. 943–968.
198. Wicklund C. L., Pauli R. M., Johnston D., Hecht J. T. Natural history study of hereditary multiple exostoses // American Journal of Medical Genetics. – 1995. – V. 55. – № 1. – P. 43–46.
199. Wong L-J. C. Next generation sequencing: translation to clinical diagnostics // Springer. – 2013. – 302 p.
200. Wu Y., Xing X., Xu S., Ma H., Cao L., Wang S., Luo Y. Novel and Recurrent Mutations in the *EXT1* and *EXT2* Genes in Chinese Kindreds with Multiple Osteochondromas // Journal of Orthopaedic Research. – 2013. – V. 31. – № 9. – P. 1492–1499.
201. Wuyts W., Van Hul W., Wauters J., Nemtsova M., Reyniers E., Van Hul E. V., De Boulle K., De Vries B. B., Hendrickx J., Herrygers I., Bossuyt P., Balemans W., Fransen E., Vits L., Coucke P., Nowak N. J., Shows T. B., Mallet L., Van den Ouweland A. M., McGaughran J., Halley D. J., Willems P. J. Positional cloning of a gene involved in hereditary multiple exostoses // Human Molecular Genetics. – 1996. – V. 5. – № 10. – P. 1547-1557.

202. Wuyts W., Van Hul W. Molecular basis of multiple exostoses: mutations in the *EXT1* and *EXT2* genes // Hum Mutat. – 2000. – V. 15 – № 3. – P. 220–227.
203. Xia P., Xu H., Shi Q., Li D. Identification of a novel frameshift mutation of the *EXT2* gene in a family with multiple osteochondroma // Oncology Letters. – 2016. – V. 11. P. – № 1. – P. 105–110.
204. Xu D., Esko J. D. Demystifying heparan sulfate-protein interactions // Annu Rev Biochem. – 2014. – V. 83. – P. 129–157.
205. Yakovleva A., Danilova A., Petukhova D., Sukhomyasova A., Nadezda Maksimova N. Molecular Genetic Study of Multiple Hereditary Exostoses in the *EXT2* Gene. Advances in Health Sciences Research. – 2021. – V. 42. – P. 251-255.
206. Yoon B. S., Pogue R., Ovchinnikov D. A., Yoshii I., Mishina Y., Behringer R. R., Lyons K. M. BMPs regulate multiple aspects of growth plate chondrogenesis through opposing actions of FGF pathways // Development. – 2006. – V. 133. – № 23. – P. 4667–4678.
207. Zak B. M., Schuksz M., Koyama E., Mundy C., Wells D. E., Yamaguchi Yu., Pacifici M., Esko J. D. Compound heterozygous loss of *EXT1* and *EXT2* is sufficient for formation of multiple exostoses in mouse ribs and long bones // Bone. – 2011. – V. 48. – № 5. – P. 979–987.
208. Zerylnick C., Torroni A., Sherman S., Warren S. Normal variation at the myotonic dystrophy locus in global human populations // Am. J. Hum. Genet. – 1995. – V. 56. – № 1. – P.123–130.
209. Zuntini M., Pedrini E., Parra A., Sgariglia F., Gentile F. V., Pandolfi M., Alberghini M., Sangiorgi L. Genetic models of osteochondroma onset and neoplastic progression: evidence for mechanisms alternative to *EXT* genes inactivation // Onco-gene. – 2010. – V. 29. – № 26. – P. 3827–3834.

Интернет-ресурсы:

210. База данных утверждений о клинической значимости и фенотипических проявлениях вариантов нуклеотидной последовательности [Электронный ресурс]: ClinVar. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> (дата обращения: 02.10.2021).

211. База данных коротких генетических вариантов [Электронный ресурс]: dbSNP. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> (дата обращения: 02.10.2021).
212. База данных структурных вариантов [Электронный ресурс]: dbVar. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/> (дата обращения: 02.10.2021).
213. База данных вариантов [Электронный ресурс]: Exome Aggregation Consortium URL: <http://exac.broadinstitute.org/> (дата обращения: 01.02.2019).
214. База данных вариантов [Электронный ресурс]: Exome Variant Server. URL: <https://evs.gs.washington.edu/EVS/> (дата обращения: 01.02.2019).
215. База данных геномных вариантов [Электронный ресурс]: gnomAD. URL: <https://gnomad.broadinstitute.org/> (дата обращения: 02.10.2021).
216. База данных генов человека и генетических состояний [Электронный ресурс]: OMIM. URL: <https://www.omim.org/> (дата обращения: 02.10.2021).
217. Инструмент для подбора праймеров [Электронный ресурс]: Primer designing tool – NCBI. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> (дата обращения: 2017, 2021).
218. Компьютерная программа предсказания патогенности вариантов нуклеотидной последовательности [Электронный ресурс]: MutationTaster. URL: <https://www.mutationtaster.org/> (дата обращения: 02.10.2021).
219. Компьютерная программа предсказания патогенности вариантов нуклеотидной последовательности [Электронный ресурс]: PROVEAN. URL: <http://provean.jcvi.org/index.php> (дата обращения: 02.10.2021).
220. Компьютерная программа предсказания патогенности вариантов нуклеотидной последовательности [Электронный ресурс]: SIFT. URL: <http://sift.jcvi.org> (дата обращения: 02.10.2021).
221. Компьютерная программа предсказания патогенности вариантов нуклеотидной последовательности [Электронный ресурс]: PolyPhen-2. URL: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (дата обращения: 02.10.2021).
222. Медицинская энциклопедия [Электронный ресурс]: фотография больного с МЭХД. URL: https://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_medicine/21489/ (дата обращения: 01.11.2022).

223. Номенклатура вариантов нуклеотидной последовательности [Электронный ресурс]: Sequence Variant Nomenclature. URL: <https://varnomen.hgvs.org/recommendations/DNA/> (дата обращения: 02.10.2021).

224. Сайт общества по изучению вариаций генома человека [Электронный ресурс]: Human Genome Variation Society. URL: <http://www.hgvs.org/> (дата обращения: 02.10.2021).

225. Сайт общества по изучению вариаций генома человека [Электронный ресурс]: Leiden Open Variation Database. URL: <https://www.lovd.nl/> (дата обращения: 02.10.2021).

226. Сайт Европейского института биоинформатики [Электронный ресурс]: EMBL-EBI. URL: www.ebi.ac.uk (дата обращения: 17.11.2022).

227. Территориальный орган Федеральной службы государственной статистики по Республике Саха (Якутия) [Электронный ресурс]: Всероссийская перепись населения 2010 года. URL: <https://sakha.gks.ru/ofstatistics> (дата обращения: 02.07.2021).

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

МИНОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ

Федеральное государственное
автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Северо-Восточный
федеральный университет
имени М.К.Аммосова»
(СВФУ)

Белинского ул., д.58, г. Якутск
Республика Саха (Якутия), 677000
Тел. (4112) 35-20-90
Факс (4112) 32-13-14
E-mail: rector-svfu@ysu.ru
<http://www.svfu.ru>

Локальный комитет
по биомедицинской этике

ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА

№ 8 от 11 ноября 2016 г.

Решение № 3

№ 19

на № 19 от 22.10.2016 г.

Присутствовали:

Н.В.Саввина, М.Н. Петрова, С.Н.Федулова, А.В. Егорова, О.В.Татарникова, Г.А.Пальшин

Рассмотрели: аннотацию диссертационной работы на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему: «Молекулярно-генетический анализ множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии».

Исполнитель: Яковлева Александра Еремеевна

Исследовательские центры: учебно-научная лаборатория «Геномная медицина» медицинского института ФГАОУ ВО СВФУ им. М. К. Аммосова, Медико-Генетический центр РБ№1, НЦМ.

Для рассмотрения в этический комитет были представлены следующие документы:

1. Выписка из протокола заседания кафедры.
2. Протокол исследования.
3. Основные сведения об исследуемом методе или средстве.
4. Информация для пациентов с формой информированного согласия
5. Список клинических центров, где планируется проводить исследование.
6. Форма индивидуальной регистрационной карты
7. Профессиональная автобиография исследователя
8. Обязательство о конфиденциальности
9. Справка о выполненном объеме НИР

Постановили:

Установлено, что целью диссертационного исследования является изучение и характеристика структурных аномалий и точковых мутаций генов EXT1 и EXT2, приводящих к множественной экзостозной хондродисплазии и злокачественной трансформации экзостозов.

Используемые методы исследования: клиничко-генеалогический анализ, молекулярно-генетический, биоинформатический, статистический.

Исследование проводится на основе добровольного обследования пациентов без нарушений этических и юридических норм. Члены этического комитета дают одобрение исследовательскому проекту.

Председатель Этического комитета,
д.м.н. Н.В.Саввина

Секретарь, к.м.н.
М.Н.Петрова



ПРИЛОЖЕНИЕ Б**Информированное согласие пациента на проведение исследования**

Я, _____

осведомлен (а) врачом _____

обо всех аспектах исследований (общий анализ, иммунный статус, ДНК-анализ).

Я получил (а) информацию о целях, задачах и сущности проводимых исследований, о пользе, ожидаемой эффективности и безопасности.

Я имел (а) возможность обсудить с врачом все интересующие меня вопросы, и удовлетворен (а) полученными ответами.

Я информирован (а) о том, что мой образец крови (сыворотка, ДНК) и информация об обмене будут зашифрованы и недоступны третьим лицам.

Я даю согласие на то, чтобы данные обо мне были занесены в компьютерный файл, обеспечивающий гарантию защиты лицами, определенным законодательством. Я имею право обращаться к данным и при необходимости дополнить или исправлять их через выбранного мною врачом.

Я оповещен (а), что информация обо мне и результаты исследований будут конфиденциальны и могут быть раскрыты только официальным представлением при соблюдении анонимности.

Подписывая форму информированного согласия, я даю свое разрешение на анонимное использование медицинских данных и результатов моих анализов учреждению, проводившему исследование – НИЛ «Молекулярная медицина и генетика человека» МИ СВФУ.

Ф.И.О. пациента _____

дата

подпись

Ф.И.О. родителя / опекуна _____

дата

подпись

ПРИЛОЖЕНИЕ В

ПРОТОКОЛ РЕГИСТРАЦИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЭКЗОСТОЗНОЙ ХОНДРОДИСПЛАЗИИ

Номер _____ Начало наблюдения « ____ » _____ г.
 Фамилия _____ Имя _____ Отчество _____
 Год рождения _____ Возраст _____ Пол: М ☐ Ж ☐ №ДНК _____
 Место рождения: (район, город) _____
 Село _____
 Место жительства: (район, город) _____
 Село _____
 Этническое происхождение _____
 Место работы _____
 Перенесенные заболевания _____

 Сопутствующие заболевания _____

Функциональные методы исследования:

Рентгенография _____

МРТ: _____

УЗИ: _____

Другие исследования: _____

Консультации специалистов:

Консультация ортопеда: _____

Продолжение Приложения В

Консультация невролога: _____

Консультация онколога: _____

Консультация окулиста: _____

Другие _____

Последняя дата осмотра:

Жалобы:

Вес _____ Рост _____ Конституция _____ Телосложение _____

Экзостозы (формы, размер) _____

ДНК анализ:

№ДНК _____

	Дата	Место проведения	Результат
ПЦР – анализ			
Прямое секвенирование			

Окончание Приложения В

Генеалогический анамнез:

Сибсы:

Год рожд.	Пол	Имя	№ДНК	Место жительства	Сем. поло- жение	Сост. здоровья

Дети:

Год рожд.	Пол	Имя	№ДНК	Место жительства	Сем. поло- жение	Сост. здоровья

Родители пробанда:

	Мать	Отец
Ф.И.О. (девичья)		
Год рождения		
Национальность		
Место рождения (район, город, село)		
Место жительства (район, город, село)		
Наличие МЭХД		
Состояние здоровья		
Возраст смерти, причина		
№ ДНК		

Родители родителей:

	Матери		Отца	
	Бабушка	Дедушка	Бабушка	Дедушка
Ф.И.О. (девичья)				
Национальность				
Год рождения				
Место рождения (район, город, село)				
Состояние здоровья				
Наличие МЭХД				
Возраст смерти, причина				
№ ДНК				

Родословная составлена со слов

Дата: « ____ » _____ г.

Врач _____

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Таблица Г.1 – Клинико-генеалогический анализ больных с множественной экзостозной хондродисплазией

Семья	Пациент	Пол	Дата рождения	Возраст манифестации (в месяцах)	Локализация экзостозов	Хирургическое вмешательство	Родословная
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Пробанд II (1) AA5124	Женский	03.12.1996	48	- плечевая кость, - бедренная кость, - малоберцовая кость;	Да	
2	Пробанд II (3) AA6280	Мужской	08.08.2001	36	- ребра, - плечевая кость, - бедренная кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	
	Сибс II (4) B8642	Мужской	13.04.2007	84	- лопатка, - ребра, - кисть, - коленный сустав;		
	Мать I (2) B8643	Женский	19.03.1976		- колено;		
3	Пробанд II (1)	Мужской	25.12.1982	12	- лопатка, - лучезапястный сустав;		
4	Пробанд III (1)	Мужской	02.09.1987	6	- плечевая кость, - бедренная кость;	Да	

Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
	Двоюродная III (4)	Женский	26.04.2004	2	- плечевая кость, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	
5	Пробанд II (2) AA1774	Мужской	27.08.1991	48	- плечевая кость, - локтевой сустав, - лучезапястный сустав, - тазобедренный сустав, - бедренная кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	
6	Пробанд II (5) AA3874	Женский	23.04.1991	132	- плечевая кость, - лучезапястный сустав, - кисть, - бедренная кость, - большеберцовая кость,	Да	

Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
					- малоберцовая кость;		
7	Пробанд II (1) AA2283	Мужской	05.01.1994	6	- лопатка, - грудина, - плечевая кость, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость, - голеностопный сустав;		
8	Пробанд III (1) AA5498	Мужской	16.11.1992	1	- грудина, - ребра, - плечевая кость, - кисть, - бедренная кость, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	
9	Пробанд II (1) 934	Мужской	15.09.1981	144	- ребра, - плечевая кость, - кисть, - бедренная кость, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	

Продолжение Таблицы Г.1

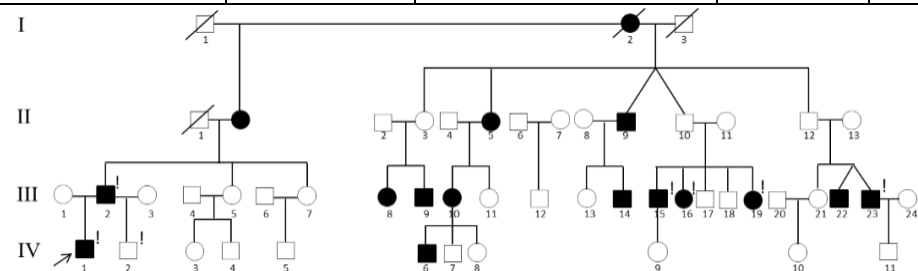
1	2	3	4	5	6	7	8
10	Пробанд II (3) АА3	Мужской	11.03.1984	18	- плечевая кость, - бедренная кость, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	
	Отец I (1) АА4	Мужской	14.01.1952	36	- коленный сустав;		
	Сибс II (2)	Женский	29.11.1988	-	- ребра, - стопа;	Да	
11	Пробанд II (1) 686	Женский	27.09.1993	16	- лопатка, - грудина, - ребра, - плечевая кость, - кисть;		
12	Пробанд IV (9) АА8907	Женский	11.07.1998	5	- плечевая кость, - кисть, - бедренная кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;		
	Мать III (9) АА8908	Женский	04.01.1970	168	- плечевая кость;		
	Двоюродный IV (6) АА4063	Мужской	17.12.1992	24	- плечевая кость, - кисть, - тазобедренный сустав, - бедренная кость, - большеберцовая кость,	Да	

Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
					- малоберцовая кость;		
	Дядя III (5) B3766	Мужской	11.03.1963	-	- коленный сустав;		
	Тетя III (8) B5872	Женский	17.11.1965	-	- коленный сустав;		
	Двоюродная IV (7) B5873	Женский	02.09.1993	84	- плечевая кость, - локтевой сустав, - лучезапястный сустав, - кисть, - коленный сустав;		
	Двоюродный IV (8) B5874	Мужской	30.11.1994	72	- плечевая кость, - локтевой сустав, - лучезапястный сустав, - коленный сустав, - большеберцовая кость;		
13	Пробанд IV (1) AA4741	Мужской	15.04.2001	36	- плечевая кость, - бедренная кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	
	Отец III (2) B5922	Мужской	16.04.1977	-	- колено;		

Продолжение Таблицы Г.1

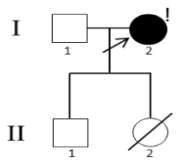
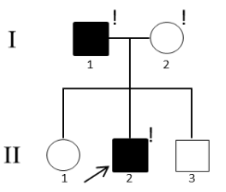
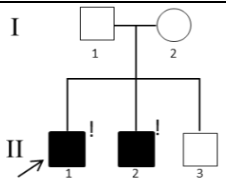
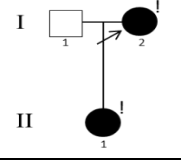
1	2	3	4	5	6	7	8
	Двоюродный IV (6)	Мужской	27.01.2010	24	- лопатка, - ребра, - плечевая кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;		
	Тетя III (19) АБ3118/ В6092	Женский	12.01.2010	144	- бедренная кость;	Да	
	Тетя III (16) В6093	Женский	14.06.1992	-	- плечевая кость, - коленный сустав;		
	Дядя III (14)	Мужской	22.05.1985	2	- лопатка, - грудина, - ребра; - плечевая кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	
	Дядя III (15) АА3757	Мужской	07.05.1982	-	- плечевая кость, - коленный сустав;		
	Дядя III (23) В6932	Мужской	01.01.1988	-	- коленный сустав;		



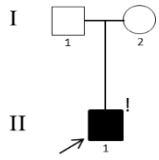
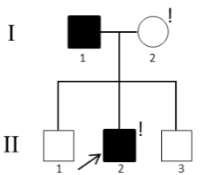
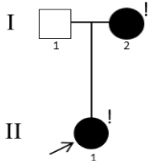
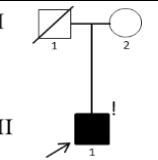
Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
14	Пробанд III (4) 658/1121	Женский	28.12.1987	60	- лопатка, - грудина, - ребра, - плечевая кость, - локтевой сустав, - лучезапястный сустав, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость, - голеностопный сустав;	Да	I II III
	Мать II (4) 657/1120	Женский	27.06.1949	1	- плечевая кость, - кисть, - тазовая кость, - коленный су- став;		
	Сибс III (3)	Женский	09.04.1998	48	- лопатка, - плечевая кость, - бедренная кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;		
	Двоюродный III (2) 2506/АБ3438	Мужской	08.03.1986	120	- лопатка, - ребра, - плечевая кость, - локтевой сустав, - лучезапястный		

Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
					сустав, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость, - голеностопный сустав;		
15	Пробанд I (2)	Женский	17.03.1973	-	- лучезапястный сустав, - кисть;		
16	Пробанд II (2) АБ4706	Мужской	24.07.2008	48	- лопатка, - плечевая кость, - локтевой сустав, - лучезапястный сустав, - кисть, - голеностопный сустав;	Да	
17	Пробанд II (1) АБ9198	Мужской	24.11.2002	144	- коленный сустав, - большеберцовая кость;		
	Сибс II (2)	Мужской	26.04.2004	124	- коленный сустав;		
18	Пробанд I (2)	Женский	02.07.1977	84	- лопатка, - плечевая кость, - кисть;	Да	

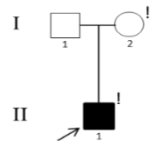
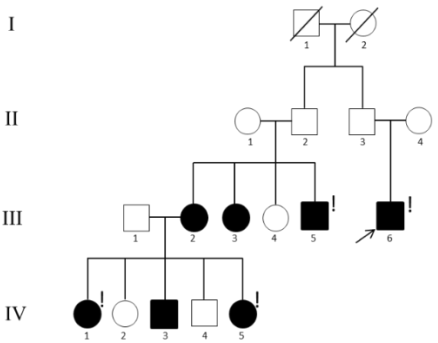
Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
	Дочь II (1)	Женский	26.07.1997	1	- лопатка, - ребра, - плечевая кость, - локтевой сустав, - кисть;		
19	Пробанд II (1) AA1685	Мужской	25.01.1977	168	- бедренная кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	I 
20	Пробанд II (2) AA3748	Мужской	26.02.1999	36	- ребра, - плечевая кость, - бедренная кость, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	I 
21	Пробанд II (1) AA701	Женский	08.04.1993	60	- позвоночный столб, - бедренная кость, - большеберцовая кость;	Да	I 
	Мать I (2) AA702	Женский	09.05.1970	-	- коленный сустав;		
22	Пробанд II (1) AA8148	Мужской	08.11.1986	-	- позвоночный столб;		I 

Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
23	Пробанд II (4) AA7374	Женский	06.08.2003	36	- ребра, - плечевая кость, - лучезапястный сустав, - кисть; - малоберцовая кость;		
	Сибс II (2) AA7461	Женский	16.08.1998	96	- плечевая кость, - лучезапястный сустав, - кисть; - коленный сустав;	Да	
	Мать I (2) AA7375	Женский	27.07.1971	-	- коленный сустав;		
24	Пробанд II (3) AB3695	Женский	05.07.1998	156	- лопатка, - локтевой сустав, - лучезапястный сустав, - бедренная кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;		
	Пробанд II (1)	Мужской	13.07.2012	3	- лопатка;	Да	
	Сибс II (2)	Мужской	16.07.2010	36	- грудина;		
	Отец I (1)	Мужской	23.11.1981	-	- лопатка;		

Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
25	Пробанд II (1)	Мужской	13.07.2012	3	- лопатка;	Да	
	Сибс II (2)	Мужской	16.07.2010	36	- грудина;		
	Отец I (1)	Мужской	23.11.1981	-	- лопатка;		
26	Пробанд II (1)	Мужской	06.02.1988	1	- плечевая кость;	Да	
27	Пробанд III (6) AA8280	Мужской	25.08.1992	156	- плечевая кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;		
	Двоюродная III (2)	Женский	15.01.1973	-	- коленный сустав;		
	Двоюродная III (3)	Женский	11.02.1971	-	- малоберцовая кость, - голеностопный сустав;		
	Двоюродный III (5) 530	Мужской	14.07.1975	96	- ребра, - локтевой сустав, - кисть, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;		
	Племянница IV (5) AA8214	Женский	08.06.2001	36	- грудина, - ребра, - лопатка,		

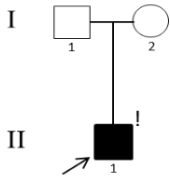
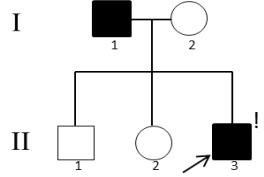
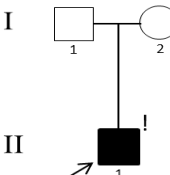
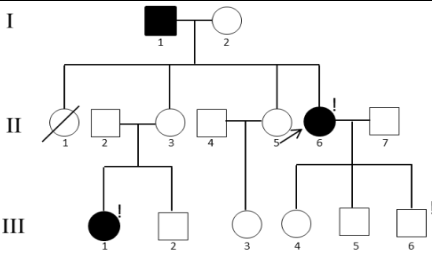
Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
					- плечевая кость, - коленный сустав, - голеностопный сустав;		
	Племянница IV (1) AA8215	Женский	28.06.1990	-	- коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;		
	Племянник IV (3)	Мужской	10.06.1996	48	- лопатка, - ребра, - кисть, - бедренная кость;		
28	Пробанд I (2) 149	Женский	09.06.1970	84	- затылочная кость, - позвоночный столб, - плечевая кость, - локтевой сустав, - лучезапястный сустав, - кисть, - бедренная кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	
	Сын II (2) B5901	Мужской	03.12.2004	60	- плечевая кость, - коленный сустав;		

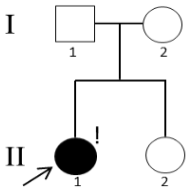
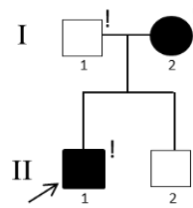
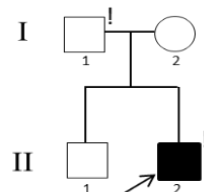
Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
29	Пробанд II (2)	Женский	27.08.2000	-	- плечевая кость;	Да	I
30	Пробанд II (2) 1116	Женский	27.10.1985	72	- плечевая кость, - локтевой сустав, - лучезапястный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость, - стопа;		I
	Сибс II (4) 1115	Женский	06.07.1987	60	- ребра, - лопатка, - плечевая кость, - локтевой сустав, - лучезапястный сустав, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость, - голеностопный сустав;		
	Отец I (1) 1117	Мужской	18.11.1952	72	- позвоночный столб, - коленный сустав, - большеберцовая		

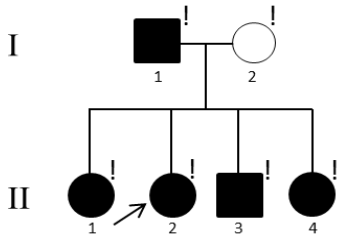
Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
31	Пробанд II (1) AA749	Мужской	18.10.1986	36	- грудина, - плечевая кость, - лопатка, - кисть, - бедренная кость, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость, - голеностопный сустав, - стопа;	Да	
32	Пробанд II (3) AA2108	Мужской	01.01.1978	1	- большеберцовая кость, - малоберцовая кость;		
	Отец I (1)	Мужской	01.04.1953	-	- коленный сустав;		
33	Пробанд II (1)	Мужской	03.04.1999	8	- плечевая кость;	Да	
34	Пробанд II (6)	Женский	12.01.1984	-	- плечевая кость, - коленный сустав;		
	Племянница III (1) AB4017	Женский	10.03.2007	15	- ребра, - лопатка, - бедренная кость, - коленный сустав, - большеберцовая		

Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
					кость, - малоберцовая кость, - голеностопный сустав;		
35	Пробанд II (1) АБ403	Женский	12.05.1992	96	- плечевая кость, - тазобедренный сустав, - бедренная кость, - большеберцовая кость;		
36	Пробанд II (1)	Мужской	27.01.2005	24	- ребра, - лопатка, - плечо, - локтевой сустав, - лучезапястный сустав, - кисть, - бедренная кость, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	
	Мать I (2)	Женский	24.02.1982	-	- коленный сустав;		
37	Пробанд II (2) АА4363	Мужской	19.08.1992	18	- плечевая кость, - локтевой сустав, - лучезапястный сустав;	Да	

Продолжение Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
38	Пробанд II (2) АБ2008	Женский	01.01.2002	84	- кисть, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;		I  II
	Сибс II (3) АБ2007	Мужской	22.07.2003	36	- локтевой сустав, - лучезапястный сустав, - бедренная кость, - большеберцовая кость;		
	Сибс II (1)	Женский	28.09.2000	120	- плечевая кость, - локтевой сустав, - бедренная кость, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;	Да	
	Сибс II (4)	Женский	05.07.2005	48	- тазобедренный сустав, - бедренная кость, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость, - голеностопный сустав;		

Окончание Таблицы Г.1

1	2	3	4	5	6	7	8
	Отец I (1)	Мужской	01.07.1976	48	- локтевой сустав, - бедренная кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;		
39	Пробанд II (2)	Мужской	07.08.1981	-	- плечевая кость;		
40	Пробанд II (1) B7322	Женский	17.08.2017	24	- ребра, - плечевая кость, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость;		
41	Пробанд II (1) B6271	Женский	01.12.1988	48	- бедренная кость, - колено, - коленный сустав, - большеберцовая кость, - малоберцовая кость		

– здоровый мужчина;
 – больной мужчина;
 – здоровая женщина;

– больная женщина;
 ↗ – пробанд;
 ! – обследованные лично;
 / – умершие;

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Таблица Д.1 – Нуклеотидная последовательность праймеров к экзонам гена *EXT1*

Экзон	Размер продукта	Последовательности праймеров (5' – 3')	Длина, п.о.	Температура отжига
1	419	F – CGTGACGCTCGGCCAATG R – AGCACTCCGGTTCCAACAAG	18 20	55 54
1	450	F – CGAGCGCAGGAGTAAACAC R – GCGCATGTGGGCGATTTC	19 18	53 53
1	450	F – ACTGCAAGCCTCCGAAATAAAAC R – GTCTTGCCATTGATTGGGTATCG	23 23	55 53
1	449	F – TTGATTGGGAAACTTGGGTGATTTC R – TCGGCGATTTTCTCCCTTTTTC	24 23	54 55
1	444	F – CCCGGCAGAAGCGAGATG R – AGTTGGGTCGGAAGTTTTCAG	18 21	55 52
1	431	F – CTTGTGGAACAATGGTAGGAATC R – GCCCAGACACTTACTTCTCATAC	23 23	53 55
1	252	F – AACGGGGAGGACGTTGTG R – CACCCGAACCGGATTTGC	18 18	53 53
2	445	F – GGCTTTCCCGAGTTGCTTTG R – TCTAAACATGACCCAGAAGAATCC	20 24	54 54
3	308	F – CCTCTGATTGGAACAGCTTCTG R – CACCATGACACAGGTAATTTTCTC	22 24	55 54
4	333	F – GCTAGAAGCCAAATGCTATGAAG R – CCACTGGACCAATCACACATC	23 21	53 54
5	302	F – TGAGCATCATCCTTTCCAAATATC R – GGTGTTAGATGGACCCATTAG	24 22	52 55
6	319	F – CGGAGCAAGGAGGAGTAATTTTC R – GCAGGGTATGATGTTAGAGAAGTC	23 24	55 56
7	268	F – TGGGTTGGAGGCATACATAAATAC R – AAATAATCCAGGAACAGGGAGAAG	24 24	54 54
8	310	F – GTGTTGAGGGGTGACATGATAG R – GGCACGGCTAAAAGAAGCATTAG	22 23	55 55
9	443	F – GCATTATGAATTAGTGGGGAGAAG R – TCTGGAAATGAAACATGCCAAGAG	24 24	54 54
10	368	F – GGGATTCAAAGAATGGGTATGTG R – TATGCTCCTGGGTGGAACAG	23 20	53 54
11	421	F – AGGTGCATAGATGGTGAGACTTG R – GGCTCTGCTGATGAGTGGATCTG	23 23	55 59
11	420	F – CGAGACATTGAGCGACTTTGAG R – TGTCTGTGGGAAAAGGAATAGC	22 22	55 53

Примечания: F – прямой праймер; R – обратный праймер; G – guanine (гуанин), C – cytosine (цитозин), A – adenine (аденин), T – thymine (тимин)

Таблица Д.2 – Нуклеотидная последовательность праймеров к экзонам гена *EXT2*

Экзон	Размер продукта	Последовательности праймеров (5' – 3')	Длина, п.о.	Температура отжига
1	346	F – CTACATATTTGTTAGTTTATAAG R – CTTGGTCACCGGCTCATG	24 18	53 53
1	392	F – GTGCTCGGACTCCTCCTGTC R – GTGGCCTCTCGCAGCCCAC	20 19	61 61
2	447	F – CAGCCTGAGTGACAGAGTG R – CAGCGATAGACATCAAAACAC	19 21	55 55
2	419	F – CATTCTATCGAGTCCTCAAATG R – CTGGGCTGTATGAGTGTGAG	22 20	57 57
3	356	F – CTGAGAAGCGGCCCTATTTG R – CTAATCTTCAGGAGGAAAATAC	20 23	57 57
4	360	F – GACTCTGTAAACGTTAGCTG R – GTGCCTCAAGGACCCTAC	20 18	53 53
5	451	F – GACTGGTAAGGAAACACTTAC R – CATGTCCAGTAAAGAGCAATG	21 21	55 55
6	382	F – CTTGGCGTCAACCCTTGTAG R – CTAATCTCCTAATGGAAAATAG	20 23	57 57
7	319	F – GAAGGAGGTTTGGGATGTTG R – GATCTAGTGGAGGAAGTAAAC	20 21	55 55
8	308	F – CATAGCAAACATGGAAAATCTC R – CTGACCAATAAACTGTGTTTG	22 22	55 55
9	326	F – GTATCTAGTTTTCCCACTCTG R – CAAGTATAAAAAGCACACTCTC	21 22	55 55
10	426	F – GTAAAAGCCACCAAGCCTGC R – GAAAAATGGAGGCATGCTGTC	20 21	57 57
11	427	F – GTTCTACCTTTGGATTTGATG R – GACTCTACTGGAAGATTTTAG	21 21	53 53
12	412	F – CATCTCCAGAATCCCATTATG R – GTAAAATACTGTCACACAATATG	21 23	55 55
13	423	F – CTTTTACCCTTCCTATTAATACAG R – GTGACCGCATCAATCATAGAAC	24 22	59 59
14	339	F – GAGGTGTGTGTGTGTGTGTG R – GAGGTGACTATGGCTACCAG	20 20	57 57
15	434	F – GTGGCTACTTGAGCTTTTTTTG R – GAAAGTGGGTTAGGTGGGTG	22 20	57 57
15	414	F – GAAGAGCTTCCCCAACATTG R – CAAATGGGCTAACACGCTTC	20 20	55 55
15	378	F – CAGCTGAGGCTCCCTTTG R – GTTTAAGACACAGTAGAAAAAG	18 22	53 53
15	439	F – CTTGGGACCTGGAGTGCTG R – CTAGAGCGACTCCTTGCAATG	19 20	57 57
15	411	F – CATAACCATTTTAAGAACAGATG R – GTTTCGAATCCATAACATTTAAC	23 23	55 55

Примечания: F – прямой праймер; R – обратный праймер; G – guanine (гуанин), C – cytosine (цитозин), A – adenine (аденин), T – thymine (тимин)

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Таблица Е.1 – Клинические проявления множественной экзостозной хондродисплазии у больных с МЭХД

№	Семья	ДНК	Больные с выраженной формы												Семья	ДНК	Больные с умереннойфор- мой				
			Область части тела				Общее количество экзостозов	Исход (осложнения)									Область части тела				Общее количество экзостозов
			Голова	Туловище	Верхние конечности	Нижние конечности		Ограничение подвижности Верхние конечности	Ограничение подвижности Нижние конечности	Трудности при ходьбе	Укорочение конечности	Деформация костей	Оперативное лечение	Инвалидность			Голова	Туловище	Верхние конечности	Нижние конечности	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	1	AA5124			1	2	3						+								
2	2	AA6280		1	1	3	5						+								
3															2	B8642		2	1	1	4
4															2	B8643			1	1	2
5	3			1	1		2	+													
6	4				1	1	2						+								
7	4			1	1	3	5						+								
8	5	AA1774			3	4	7	+	+			+	+								
9	6	AA3874			3	3	6	+			+	+	+	+							
10	7	AA2283		2	1	4	7		+					+							
11	8	AA5498		2	2	4	8			+	+	+	+								
12	9	934		1	2	4	7	+	+				+	+							
13	10	AA3			1	4	5						+								
14	10			1		1	2						+								

Продолжение Таблицы Е.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
15															10	AA4				1	1
16	11	686		3	2		5				+	+									
17	12	AA4063			2	3	5				+	+	+	+							
18	12	AA8907			2	3	5			+				+							
19	12	B5873			4	1	5	+			+	+									
20															12	B3766				1	1
21															12	AA8908			1		1
22															12	B5872				1	1
23															12	B5874			3	2	5
24	13	AA4741			1	3	4						+								
25	13			3	1	2	6						+								
26	13	AB3118				1	1				+		+	+							
27															13	AA3757			1	1	2
28															13	B5922				1	1
29															13			2	1	2	5
30															13	B6932				1	1
31															13	B6093			1	1	2
32	14	658/1121		3	3	4	10					+	+	+							
33	14	657/1120			2	2	4	+	+												
34	14	AB3438		2	3	4	9	+			+	+		+							
35															14			1	1	3	5
36															15				2		2
37	16	AB4706		1	4	1	6	+			+	+	+								
38															17	AB9198				2	2
39															17					1	1
40	18			1	2		3				+	+	+								
41															18			2	3		5
42	19	AA1685				3	3	+	+		+	+	+	+							
43	20	AA3748		1	1	4	6	+	+				+	+							
44	21	AA701		1		2	3						+								
45															21	AA702				1	1

Продолжение Таблицы Е.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
46															22	AA8148		1			1
47	23	AA7461			3	1	4	+	+				+								
48															23	AA7374		1	3	1	5
49															23	AA7375				1	1
50															24	AB3695		1	2	3	6
51															25			1			1
52															25			1			1
53															25			1			1
54	26				1		1						+								
55	27	530		1	2	3	6				+	+									
56	27	AA8215				3	3			+											
57															27	AA8280			1	2	3
58															27					2	2
59															27					1	1
60															27	AA8214		3	1	2	6
61															27			2	1	1	4
62	28	149	1	1	4	3	9	+			+	+	+								
63															28	B5901			1	1	2
64	29				1		1						+								
65	30	1116			3	3	6				+	+									
66	30	1115		1	4	4	9	+	+	+	+	+		+							
67	30	1117		1		2	3	+	+			+		+							
68	31	AA749		2	2	6	10		+	+	+	+	+	+							
69	32	AA2108				2	2				+	+									
70															32					1	1
71	33				1		1						+								
72	34	AB4017		2		5	7						+								
73															34				1	1	2
74	35	AB403			1	3	4	+	+	+	+	+									
75	36			2	4	4	10	+	+		+		+	+							
76															36					1	1

Окончание Таблицы Е.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
77	37	АА4363			3		3	+	+				+	+							
78	38	АБ2008			2	4	6				+	+	+								
79															38				1	3	4
80															38	АБ2007			2	2	4
81															38					6	6
82															38				1	3	4
83															39				1		1
84	40	В7322		1	1	2	4					+									
85															41	В6271				4	4
Итого			1	35	76	111	223	17	13	6	19	21	30	15				18	30	55	103

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

«УТВЕРЖДАЮ»
 Министерство здравоохранения
 Республики Саха (Якутия)
 Е.А. Борисова
 «15» Сентября 2019 г.



АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. **Наименования предложения для внедрения:** «Молекулярная диагностика множественной экзостозной хондродисплазии в гене *EXT2*»

2. **Кем предложено, адрес исполнителя:**

1. Яковлева Александра Еремеевна – младший научный сотрудник УНЛ «Геномная медицина» Клиники МИ СВФУ, аспирант 4 года кафедры неврологии и психиатрии
 2. Сухомясова Айталиня Лукична – к.м.н., врач генетик, заведующая МГЦ ГАУ РС(Я) РБ№1-НЦМ
 3. Максимова Надежда Романовна – д.м.н., главный научный сотрудник УНЛ «Геномная медицина» Клиники МИ СВФУ
 4. Голикова Полина Иннокентьевна – к.м.н., главный инженер проекта УНЛ «Геномная медицина» Клиники МИ СВФУ
 5. Петухова Диана Александровна – инженер-исследователь УНЛ «Геномная медицина» Клиники МИ СВФУ
 6. Данилова Анастасия Лукична – к.б.н., научный сотрудник УНЛ «Геномная медицина» Клиники МИ СВФУ
 7. Степанова Светлана Кимовна – к.б.н., биолог МГЦ ГАУ РС(Я) РБ№1-НЦМ
- г. Якутск, Сергеляхское 4 тел. 39-54-94, ул. Кулаковского 36 тел. 49-65-42

3. **Источники информации:**

1. Ishimaru D. Large-scale mutational analysis in the *EXT1* and *EXT2* genes for Japanese patients with multiple osteochondromas / D. Ishimaru, M. Gotoh, S. Takayama et. al. // BMC Genetics – 2016. – P.17-52.
2. Wuyts W., Van Hul W. Molecular basis of multiple exostoses: mutations in the *EXT1* and *EXT2* genes // Human Mutation. 2000. T. 15. № 3. С. 220–227.
3. Wang X. Pathogenic Gene Screening and Mutation Detection in a Chinese Family with Multiple Osteochondroma / X. Wang, L. Li, J. Li et. al. // Genet. Test. And Molec. Biomark. - 2012. Vol.16. – P.827-832.

Окончание Приложения Ж

4. Wu Y. Novel and Recurrent Mutations in the *EXT1* and *EXT2* Genes in Chinese Kindreds with Multiple Osteochondromas / Y. Wu, X. Xing, S. Xu et al. // J Orthop Res. – 2013. Vol.9. - P.1492-1499.

5. Xia P. Identification of a novel frameshift mutation of the *EXT2* gene in a family with multiple osteochondroma / P. Xia, H. Xu, Q. Shi, D. Li // Oncology Letters. – 2016. Vol.11. – P.105-110.

4. **Где и когда внедрено:** Методика разработана с сентября 2018 по март 2019г. в УНЛ «Геномная медицина» Клиники МИ СВФУ, внедрена в отделе молекулярной генетики лаборатории медико-генетического центра РБ №1-НЦМ в марте 2019 г.

5. **Результаты внедрения метода** за период с сентября 2018 по март 2019 г.

Положительные (количество наблюдений) 13

Отрицательные (количество наблюдений) 58

Неопределенные (количество наблюдений) нет

6. Эффективность внедрения:

Проведен ДНК анализ у 71 человек, выявлено 13 больных. Идентифицирована новая нонсенс-мутация с.751C>T (NM_001178083) в 5 экзоне гена *EXT2*, приводящая к замене кодирующего кодона на стоп-кодон в 251 позиции белка (p.Gln251*, NP_001171554).

В результате исследования впервые в лаборатории МГЦ ГАУ РС(Я) РБ№1 – НЦМ внедрена диагностика множественной экзостозной хондродисплазии. Появилась возможность ДНК диагностики у больных и проведения пренатальной диагностики МЭХД в гене *EXT2*.



Генеральный директор ГАУ РС(Я) «РБ№1-НЦМ»

Лугинов Н.В.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«СЕВЕРО-ВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.К. АММОСОВА»**
(СВФУ)
Клиника СВФУ

«20» 12 2021 г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Наименование предложения для внедрения: «ДНК-диагностика гетерозиготной мутации c.310delA (p.Ile104fs) во 2-м экзоне в гене *EXT2*, ответственной за развитие множественной экзостозной хондродисплазии»
2. Кем предложено, адрес исполнителя:
 1. Яковлева Александра Еремеевна – научный сотрудник НИЛ «Молекулярная медицина и генетика человека» МИ СВФУ, биолог УНЛ «Геномная медицина» Клиники СВФУ.
 2. Максимова Надежда Романовна – д. м. н., врач-генетик высшей категории, руководитель НИЛ «Молекулярная медицина и генетика человека» МИ СВФУ.
 3. Сухомясова Айталиня Лукична – к. м. н., врач-генетик высшей категории, ведущий научный сотрудник НИЛ «Молекулярная медицина и генетика человека» МИ СВФУ, заведующий УНЛ «Геномная медицина» Клиники СВФУ, заведующая медико-генетическим центром ГАУ РС(Я) «РБ№1-НЦМ».
 4. Данилова Анастасия Лукична – к. б. н., старший научный сотрудник НИЛ «Молекулярная медицина и генетика человека» МИ СВФУ, лабораторный генетик УНЛ «Геномная медицина» Клиники СВФУ.
 5. Голикова Полина Иннокентьевна – к. м. н., старший научный сотрудник НИЛ «Молекулярная медицина и генетика человека» МИ СВФУ
 6. Петухова Диана Александровна – главный инженер НИЛ «Молекулярная медицина и генетика человека» МИ СВФУ
 7. Иванова Роза Николаевна – врач-генетик МГЦ ГАУ РС(Я) РБ№1-НЦМ

г. Якутск, Сергеляхское 4 тел. 39-54-94, ул. Кулаковского 36 тел. 49-65-42

3. Источник информации:

Окончание Приложения 3

1. Fernandez-Perez S. Total knee arthroplasty in patients with multiple hereditary exostoses / S. Fernandez-Perez, J. Rodriguez, D. Beaton-Comulada et al. // *Arthroplasty Today* – 2018. – P. 325-329.
2. Guo X. A novel splice mutation induces exon skipping of the *EXT1* gene in patients with hereditary multiple exostoses / X. Guo, M. Lin, W. Yan et al. // *International journal of oncology* – 2019. – P. 859-868.
3. Wang Y. *EXT1* and *EXT2* variants in 22 Chinese families with multiple osteochondromas: seven new variants and potentiation of preimplantation genetic testing and prenatal diagnosis / Y. Wang, L. Zhong, Y. Xu et al. // *Frontiers in Genetics*. – 2020. – V. 11. – P. 1-13.
4. Li Y. Heterogeneous spectrum of *EXT* gene mutations in Chinese patients with hereditary multiple osteochondromas / Y. Li, J. Wang, J Tang et al. // *Medicine* – 2018. – P. 97-42.
5. Xia P. Identification of a novel frameshift mutation of the *EXT2* gene in a family with multiple osteochondroma / P. Xia, H. Xu, Q. Shi, D. Li // *Oncology Letters* – 2016. Vol.11. – P.105-110.

4. Где и когда внедрено: Метод ДНК-диагностики разработан с октября 2020 г. по март 2021 г. в НИЛ «Молекулярная медицина и генетика человека» МИ СВФУ, в УНЛ «Геномная медицина» Клиники СВФУ, в лаборатории молекулярно-генетической диагностики медико-генетического центра РБ №1-НЦМ.

5. Результаты внедрения метода за период с октября 2020 г. по март 2021 г.

Положительные (количество наблюдений) 17

Отрицательные (количество наблюдений) 24

Неопределенные (количество наблюдений) нет

6. Эффективность внедрения:

При проведении молекулярно-генетического исследования 41 пациентов из 29 неродственных семей идентифицирован вариант нуклеотидной последовательности с.310delA (p.Ile104fs) во экзоне 2 в гене *EXT2* у 17 (29,8%) пациентов из 12 неродственных семей. Выявленный гетерозиготный вариант, приводящий к сдвигу рамки считывания.

В лаборатории МГЦ ГАУ РС(Я) РБ№1 – НЦМ внедрена диагностика множественной экзостозной хондродисплазии.

Полученные результаты полезны для расширения базы данных известных мутаций *EXT1*, *EXT2* и в понимании генетической основы МЭХД, что может улучшить генетическое консультирование и пренатальную диагностику дляотягощенных с МЭХД.

Директор Клиники СВФУ



В.Г. Аммосов

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю – главному научному сотруднику научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная медицина и генетика человека» медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, д.м.н. Надежде Романовне Максимовой, а также ведущему научному сотруднику, зав. медико-генетического центра ГАУ РС (Я) Республиканской больницы №1-Национальный центр медицины им. М.Е. Николаева, к.м.н. Айталине Лукичне Сухомясовой за предоставленную возможность заниматься данной темой, за поддержку и помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы.

Автор сердечно благодарит своих коллег НИЛ «Молекулярная медицина и генетика человека» медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет» им. М.К. Аммосова и коллектив медико-генетического центра ГАУ РС (Я) РБ№1-НЦМ им. М.Е. Николаева. Особую благодарность хочется выразить за поддержку и ценные советы старшим научным сотрудникам нашей лаборатории к.б.н. Анастасие Лукичне Даниловой, к.м.н. Полине Иннокентьевне Голиковой, к.б.н. Афанасию Ивановичу Федорову за помощь в освоении молекулярно-генетических, статистических, биоинформатических методов исследований. Также автор огромную благодарность выражает врачам медико-генетического центра ГАУ РС (Я) РБ№1-НЦМ им. М.Е. Николаева за помощь в осмотре и обследовании пациентов.

Автор искренне выражает признательность учёному секретарю диссертационного совета, к.б.н. Ирине Юрьевне Хитринской за помощь в подготовке документов к защите.