

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Уфимский
федеральный исследовательский центр Российской академии наук

(УФИЦ РАН)

Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра Российской академии наук

(ИБГ УФИЦ РАН)

На правах рукописи

ЗАРИПОВА АЛИЯ РАМИЛЕВНА

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АРХИТЕКТУРА НЕЗАВЕРШЕННОГО
ОСТЕОГЕНЕЗА**

1.5.7 – Генетика (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,

доцент Р.И. Хусаинова

Уфа – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Исторические и современные аспекты классификации незавершенного остеогенеза	10
1.2 Распространенность незавершенного остеогенеза в различных странах мира	18
1.3 Клиническая вариабельность незавершенного остеогенеза	20
1.4 Молекулярный патогенез и генетическая гетерогенность заболевания	25
1.4.1 Патогенные изменения в генах, ответственных за первичную структуру и модификации коллагена I типа	25
1.4.2 Патогенные изменения нуклеотидной последовательности в генах-модификаторах коллагена I типа	29
1.4.3 Патогенные изменения в генах, вызывающих дефекты сворачивания и/или сшивания коллагена	32
1.4.4 Патогенные изменения в гене, вызывающем дефекты минерализации костной ткани	34
1.4.5 Патогенные изменения в генах, вызывающих дефекты развития остеобластов при недостаточности коллагена I типа	36
1.4.6 Патогенные изменения в генах с неустановленной биологической значимостью	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1 Материалы исследования	41
2.2 Методы исследования	45
2.2.1 Выделение ДНК	45
2.2.2 Подбор праймеров для ПЦР	46
2.2.3 Полимеразная цепная реакция синтеза ДНК	50
2.2.4 Метод электрофореза в полиакриламидном геле	52

2.2.5 Секвенирование по Сэнгеру	53
2.2.6 Секвенирование нового поколения (NGS)	56
2.2.7 Биоинформатический анализ результатов	62
2.2.8 Критерии оценки клинической значимости изменений нуклеотидной последовательности	64
2.3 Дизайн исследования	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	71
3.1. Поиск и идентификация патогенных изменений нуклеотидной последовательности у пациентов с незавершенным остеогенезом	71
3.1.1. Оценка спектра и частоты патогенных изменений в генах коллагена I типа	75
3.1.1.1 Поиск мутаций в гене альфа-1 цепи коллагена I типа.	78
3.1.1.2 Поиск мутаций в гене альфа-2 цепи коллагена I типа	85
3.2. Идентификация патогенных изменений в неколлагеновых генах, вовлеченных в развитие незавершенного остеогенеза	89
3.2.1. Идентификация патогенного варианта в гене интерферон индуцированного трансмембранного белка 5 (<i>IFITM5</i>)	89
3.2.2. Идентификация патогенного варианта в гене пролил-3-гидроксилазы-1 (<i>P3H1</i>)	96
3.3. Идентификация патогенных изменений в генах, не вовлеченных в патогенез незавершенного остеогенеза	98
3.4. Идентификация сочетанных вариантов мутаций у пациентов с незавершенным остеогенезом	107
3.5 Анализ полиморфных вариантов с неизвестной клинической значимостью в таргетных генах	109
3.5.1 Изучение спектра и частоты полиморфных вариантов в гене <i>COL1A1</i> у пациентов с незавершенным остеогенезом	109
3.5.2 Изучение спектра и частоты полиморфных вариантов в гене <i>COL1A2</i> у пациентов с незавершенным остеогенезом	113

3.5.3. Изучение спектра и частоты полиморфных вариантов с неизвестной клинической значимостью в генах <i>P3H1</i> и <i>IFITM5</i>	117
3.6. Разработка алгоритмов диагностики незавершенного остеогенеза	119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
ВЫВОДЫ	126
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128
ПРИЛОЖЕНИЕ	151
Приложение А	151
Приложение Б	167

ВВЕДЕНИЕ

Незавершенный (несовершенный) остеогенез (НО, МКБ-10: Q78.0) представляет собой орфанное наследственное заболевание соединительной ткани с распространенностью 1 на 10-20 тысяч новорожденных (Chen et al., 2022; Garibaldi et al., 2022) или 6-7 на 100 тысяч человек (Sponer et al., 2022). Заболевание характеризуется выраженной клинической вариабельностью с преимущественной склонностью к переломам костей в результате лёгкой травмы, сниженной плотностью костной ткани, деформациями длинных костей и грудной клетки, треугольной формой лица. Помимо скелетных дефектов, у пациентов могут наблюдаться голубые склеры, аномалии дентина, прогрессирующее снижение слуха, низкий рост, гипермобильность суставов и т.д. (Sałacińska et al., 2022). Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному, аутосомно-рецессивному типам, встречаются случаи с X-сцепленным наследованием и варианты *de novo*, болезнь может манифестировать в любом возрасте, начиная с внутриутробного периода жизни (Рябых и др., 2021).

Клиническая вариабельность заболевания обусловлена его генетической гетерогенностью. По данным Лейденской базы (Leiden Open Variation Database) в патогенезе заболевания участвует 25 генов (<https://lovd.nl/OI-genes>, 12.01.2023). В большинстве случаев причиной НО являются молекулярные дефекты в генах коллагена 1 типа (*COL1A1*, *COL1A2*), кодирующих его $\alpha 1$ и $\alpha 2$ цепи (Marini et al., 2017). Мутации в этих генах встречаются при I-IV типах НО. От 1 до 5% случаев НО обусловлены мутациями в гене интерферон-индуцированного трансмембранного белка 5 (*IFITM5*), который играет роль в дифференцировке остеобластов и минерализации костей (Zhytnik et al., 2019) и классифицируется как НО V типа (Marom et al., 2020). Кроме того, в патогенез заболевания вовлечены гены белков, принимающих участие в фолдинге и посттрансляционных модификациях коллагена I типа (*CRTAP*, *P3H1*, *PPIB* и *BMP1*) или его внутриклеточном перемещении (*FKBP10* и *SERPINH1*), в контроле качества синтеза белка и реакции эндоплазматического ретикулума на

стресс (*CREB3L1* и *MBTPS2*) (Marini et al., 2017), минерализации кости (*SERPINF1* и *SPARC*) (Etich et al., 2020; Durkin et al., 2021), функционировании канонического сигнального пути WNT (*LRP5*, *WNT1* и *MESD*) (Moosa et al., 2019), а также белки с внутриклеточной или ядерной локализацией, которые влияют на функцию остеобластов способом, который еще полностью не изучен (*SP7* и *TENT5A*) (Fiscaletti et al., 2018; Doyard et al. 2018).

Несмотря на достигнутые успехи, все еще продолжается поиск новых причинных генов заболевания, т.к. до сих пор до конца не определена генетическая архитектура незавершенного остеогенеза. Существуют популяционные и этнические различия по частоте и спектру мутаций в различных причинных генах, практически в каждом исследовании идентифицируются ранее неописанные патогенные изменения.

В России в настоящее время недостаточно сведений по распространенности заболевания и его молекулярном патогенезе. По данным Яхаевой с коллегами в 2016 году в России было зарегистрировано 650 случаев НО, из них 421 – дети (Яхаева и др., 2016), в Сибирском и Приволжском федеральных округах - 1,5 и 1,35 случаев на 100 000 детей; в Северо-Западном федеральном округе - 0,28 на 100 000 детей; в Ставропольском крае - 1,42 на 100 000 детей (Сорокина и др., 2017). Алимова с коллегами сообщает, что распространенность НО на 2019 год составила 1,08:100 000 детей (Алимова и др., 2019).

Таким образом, НО является одним из наиболее распространенных скелетных наследственных заболеваний с выраженной клинической вариабельностью и генетической гетерогенностью, молекулярные аспекты которого все еще до конца не раскрыты.

Проведение молекулярно-генетического исследования необходимо для подтверждения диагноза, установления типа наследования заболевания и прогноза течения заболевания, а также для эффективного медико-генетического консультирования отягощенных семей.

Личный вклад автора.

Определение темы, цели и задач диссертационной работы проводилось совместно с научным руководителем, д.б.н, доц. Хусаиновой Р.И.. Формирование литературного обзора по теме исследования, экспериментальная работа, заключающаяся в проведении молекулярно-генетического исследования образцов ДНК больных незавершенным остеогенезом, формировании выборки (с последующим выделением ДНК) и генотипирования (ПЦР, NGS-технология, секвенирование по Сэнгеру) автором были выполнены самостоятельно. Подготовка рукописи настоящей диссертационной работы и автореферата, а также материалов для публикаций проводились лично автором.

Степень достоверности результатов проведенных исследований.

Достоверность полученных результатов в ходе молекулярно-генетического исследования пациентов с незавершенным остеогенезом подтверждается проведением исследования на репрезентативной выборке пациентов и контрольных образцов, а также актуальных в настоящий момент молекулярно-генетических и биоинформатических методов анализа. Выводы, сформулированные по результатам диссертационной работы, соответствуют поставленным задачам.

Научная новизна.

Впервые проведен поиск и идентификация патогенных вариантов генов, приводящих к развитию незавершенного остеогенеза (НО), и установлена молекулярная причина заболевания у 58,7% исследованных пациентов из Республики Башкортостан. Поиск патогенных изменений с применением NGS технологии выявил 43 мутаций в 14 генах (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*, *ERCC4*, *PTH1R*, *ALOX12B*, *ARSB*, *PLEKHM1*, *SGMS2*, *TGFBI*, *CLCN7*, *FGF23*, *LAMB3*), из которых 31 патогенный вариант изменения нуклеотидной последовательности обнаружен в двух генах коллагена 1 типа (*COL1A1* и *COL1A2*), что составило 93,9% от всех выявленных патогенных мутаций, 10 из которых ранее не были описаны в литературе. Впервые обнаружена ранее

неописанная мутация с.1051G>Т (p.Glu351*) в гене пролил-3-гидроксилазы-1 (*P3H1*) у пациента башкирской этнической принадлежности. В гене *IFITM5* впервые идентифицирована мутация с.-14C>Т у трех неродственных пациентов с V типом НО из Республики Башкортостан.

Практическая значимость результатов.

Результаты исследования вносят существенный вклад в понимание молекулярно-генетических основ незавершенного остеогенеза и являются теоретической и методической основой для разработки научно обоснованного алгоритма ДНК-диагностики, оптимального для конкретного региона с учетом популяционных особенностей народов, проживающих в Республике Башкортостан. На основе полученных результатов создана таргетная NGS панель для диагностики НО на основе анализа двух генов коллагена первого типа, что позволит проводить более эффективную ДНК диагностику заболевания. Полученные результаты имеют важное практическое значение для повышения эффективности медико-генетического консультирования отягощенных семей с незавершенным остеогенезом в Республике Башкортостан.

Цель исследования.

Поиск и идентификация патогенных вариантов генов, приводящих к развитию незавершенного остеогенеза (НО) и определение молекулярной гетерогенности заболевания в Республике Башкортостан.

Задачи исследования.

1. Поиск и идентификация патогенных изменений нуклеотидной последовательности у пациентов с НО с применением NGS технологии.
2. Оценка спектра и частоты мутаций в генах коллагена I типа, определение типа наследования, формы заболевания и гено-фенотипических корреляций.

3. Идентификация патогенных изменений в неколлагеновых генах и определение их роли в развитии незавершенного остеогенеза.
4. Верификация и поиск выявленных изменений у членовотягощенных семей с использованием секвенирования по Сэнгеру.
5. Разработка алгоритмов таргетного NGS секвенирования для диагностики НО.

Положения, выносимые на защиту.

1. Патогенные изменения нуклеотидной последовательности в 4 генах (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*) выявлены у 58,7% пациентов с НО из Республики Башкортостан.
2. Мутации в генах коллагена I типа (*COL1A1*, *COL1A2*) являются преобладающими (93,9%) от всех выявленных патогенных изменений в причинных генах.
3. Мутации с.3076C>T, с.1265G>C, с.579delT в гене *COL1A1*, выявлены у пациентов татарской этнической принадлежности, каждая в двух неродственных семьях. Остальные патогенные изменения в генах коллагена I типа (*COL1A1*, *COL1A2*) являются уникальными, 10 из которых описаны впервые.
4. Мутация с.-14C>T в гене *IFITM5* является причиной незавершенного остеогенеза V типа у трёх неродственных пациентов.
5. Алгоритм ДНК диагностики незавершенного остеогенеза с разработкой таргетной NGS панели на основе анализа двух генов коллагена первого типа, кодирующих цепи альфа-1 и альфа-2 (*COL1A1* и *COL1A2*).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Исторические и современные аспекты классификации незавершенного остеогенеза

Первые описания клинических проявлений незавершенного (несовершенного) остеогенеза (НО) стали появляться в медицинской литературе с XVII годов. Философ Nicolas de Malebranche считается первым автором, кто описал заболевание. Автор страдал этим недугом и в своей работе: «De la recherche de la vérité. Où l'on traite de la nature de l'Esprit de l'homme, & de l'usage qu'il en doit faire pour éviter l'erreur dans les Sciences» рассказывает читателям о своей болезни и делится размышлениями о вероятной причине развития у него данной патологии (De Malebranche, 1749). Однако, только спустя 3 века исследователи смогли обозначить сочетание необычных симптомов (голубые склеры, множественные переломы и тугоухость) как отдельное заболевание – «незавершенный остеогенез». Одно из первых научных описаний НО датируется 1788 годом, когда J. Ekman описал серию семейных случаев заболевания, где в 4 поколениях были тяжелые прогрессирующие деформации конечностей и множественные переломы. Хотя его пациенты считались больными остеомалацией, они представляют собой ранние случаи НО (Baljet, 2002). В 1905 археолог G. Garstang из Ливерпуля нашёл останки египетского младенца-мумии возрастом 3 тысячи лет с признаками НО - аномалиями зубного ряда, скелетными деформациями, особенно нижних конечностей, выраженными утолщениями бедренной кости и треугольной формой головы с образованием дополнительных костей свода черепа (Tainmont, 2007).

У НО было много разных названий в течение всей истории – "fragilitas ossium", что в переводе с латыни означает «ломкие кости», синдром Экмана-Лобштейна, синдром Лобштейна-Вролика и ряд других. В народе заболевание упоминалось чаще как «болезнь хрупких костей» (<https://en.wikipedia.org/>, 12.01.2023). В 1788 году J. Ekman обозначил диагноз как «врожденная остеомалация». В 1833 г. французский патологоанатом С. Lobstein ввёл термин

«osteopsathyrosis idiopathica», что переводится как «идиопатический остеопсатироз» (Brailsford, 1943). И, наконец, по некоторым данным в 1845 году голландский анатом W. Vrolik описал плод с аномальной хрупкостью костей, дав окончательное название болезни, которое мы пользуемся до сих пор (Vrolik, 1949; Fratzi-Zelman, 2015). В 1831 году Axmann обратил внимание, что НО затрагивает не только кости, но и другие органы, а также носит наследственный характер (Weil, 1981), что отмечали также в своих работах ряд исследователей (Renard, 1803; Strack, 1807; Weil, 1981). Axmann, страдавший НО, дал полное описание своего случая заболевания, а также описывает 2х своих братьев со схожими признаками. Все трое были астеничного телосложения, склонны к переломам при незначительных нагрузках, имели признаки гипермобильности суставов и голубые склеры (Axmann, 1831). В 1859 году вышла статья Schmidt, в которой впервые в литературе появляются данные морфологического и гистологического описания младенца с НО, которой умер практически сразу после рождения. Автор сообщает, что голова новорожденного была похожа на «треснувшую яичную скорлупу» и наблюдались множественные переломы, сделано заключение, что клиническое состояние младенца похоже на хронический паренхиматозный остит (Weil, 1981). В 1896 г. Spurway, а в 1900 г. Eddowes предположили, что голубые склеры и множественные переломы могут быть симптомами одной болезни (Spurway, 1900). Немецкий офтальмолог Peters обнаружил, что цвет глаз зависит от того, насколько тонкая фиброзная ткань в сетчатке глаза и эта особенность может носить наследственный характер (Weil, 1981). В 1906 г. Looser предложил первую классификацию заболевания - «congenita», что в переводе означает «врожденный», если симптомы НО проявлялись у плода или новорожденного до 1 года жизни, «tarda» или «поздний», если первый перелом случался у ребенка после 1 года жизни или взрослого (Robichon и Germain, 1968; Fratzi-Zelman et al., 2015). Классификация была скорректирована Seedorf, который добавил 2 субтипа к типу «tarda»: НО «tarda gravis» - переломы в первый год жизни с последующими деформациями и НО «tarda levis» - переломы и тяжелые деформации случились после 1 года

жизни (Weil, 1981). В 1912 году Adair-Dighton описал прогрессирующее снижение слуха, как симптом НО. В 1917 Van der Hoeve определил, что есть связь между голубыми склерами, тугоухостью пациентов и состоянием их костей. С тех пор сочетание хрупких костей, голубых склер и прогрессирующей потери слуха стали называть «незавершенный остеогенез» (F.Carré et al., 2019). В 1940 г. Bauer предположил, что причиной НО может быть генерализованное заболевание мезенхимы, также обратил внимание на то, что при НО у пациентов поражается дентин, хрящевая ткань, кожа и страдают кровеносные сосуды. Позже Knagg высказал предположение, что изменения в костной ткани при НО, могут быть вызваны нарушением функцией остеобластов и структуры коллагена (Weil, 1981).

Одну из первых попыток обобщения знаний о НО и классификации заболевания предпринял Bauz с коллегами, описав группу из 42 пациентов, которых авторы подразделили на три типа НО: лёгкий, средний и тяжелый на основе клинических, радиологических и биохимических особенностей (Edelu et al., 2014). В 1979 Sillence и соавторы опубликовали расширенную версию классификации, которую впоследствии стали считать классической. Она включала в себя четыре типа НО, основанных на типе наследования заболевания, и фенотипических проявлениях и рентгенологических показателях (таблица 1, Sillence et al., 1979).

Примечательно, что классификация Sillence была опубликована за 4 года до того, как обнаружили первый молекулярный дефект, ответственный за развитие НО. В 1983 обнаружили мутацию в гене коллагена I типа (Chu et al., 1983). С тех пор НО считается заболеванием, связанным с коллагеном. На сегодняшний день известно, что в 90% случаев причиной НО являются мутации в генах коллагена I типа – *COL1A1* и *COL1A2*, кодирующих альфа-1 и альфа-2 цепи коллагена (Higuchi et al., 2021).

В 2004 г. F. Glorieux et al. описали три группы пациентов с установленным клиническим диагнозом НО. У этих групп имелись скелетные особенности, а также результаты гистологического исследования костей, которые отличались от

описанных ранее фенотипов. Исследователи пришли к выводу, что не все формы заболевания включены в классификацию Sillence и её необходимо расширить.

Таблица 1 - Классификация незавершенного остеогенеза по Sillence (1979 г.)

Тип НО	Уточняющие суффиксы	Тип наследования	Степень тяжести заболевания
I	congenita tarda	аутосомно-доминантный	Легкий тип НО с голубыми склерами
II	congenita	аутосомно-рецессивный	Перинатально-летальный НО
III	congenita tarda	аутосомно-рецессивный	Прогрессивно-деформирующий тип с нормальным цветом склер
IV	congenita tarda	аутосомно-доминантный	Средней степени тяжести с нормальным цветом склер

Чтобы подчеркнуть отличие фенотипов своих пациентов от «классических», они добавили новые типы НО в классификацию – V, VI, VII типы по порядку регистрации случаев НО (таблица 2, Rauch и Glorieux, 2004). В 2007 году был добавлен клинически тяжелый VIII тип НО с аутосомно-рецессивным типом наследования (Van Dijk, 2010).

По мере изучения заболевания и открытия «неколлагеновых» генов, вовлеченных в патогенез заболевания, стало понятно, что НО может развиваться не только при нарушении структуры коллагена.

Таблица 2 - Классификация НО по Glorieux (2004 г.)

Тип	Степень тяжести	Клинические особенности	Мутации
I	Лёгкий, недеформирующий	Голубые склеры, рост нормальный, либо ниже среднего	Преждевременный стоп-кодон в гене <i>COL1A1</i>
II	Перинатально-летальный	Множественные переломы, темные склеры, скелетные деформации, низкая плотность костей черепа	Замены глицина в генах <i>COL1A1</i> и <i>COL1A2</i>
III	Тяжелый, деформирующий	Низкий рост, сколиоз, треугольное лицо, серые склеры, аномалии дентина	Замены глицина в генах <i>COL1A1</i> и <i>COL1A2</i>
IV	Умеренно деформирующий	Низкий рост, сколиоз лёгкой и средней степени, сероватые или белые склеры	Замены глицина в генах <i>COL1A1</i> и <i>COL1A2</i>
V	Умеренно деформирующий	Низкий или средний рост, вывих головки лучевой кости, минерализация межкостной мембраны, гиперпластическая мозоль, белые склеры	Неизвестно
VI	От умеренной до тяжелой	Средний рост, сколиоз, накопление остеоида в костной ткани, костный рисунок в виде рыбьей чешуи, белые склеры	Неизвестно
VII	Умеренно деформирующий	Низкий или средний рост, короткие плечи и бёдра, <i>coxa vara</i> , белые склеры	Неизвестно

Plotkin в 2004 г. предложил считать причиной НО мутации только в коллагеновых генах, а другие гены отнести к «синдромам с выраженной ломкостью костей» (Plotkin, 2004).

В 2010 г. Van Dijk предложил принять классификацию 1979 г., как основную и исключить все фенотипы, которые отличаются от описанных в ней форм (Van Dijk et al., 2010).

В 2009 году на заседании Международной номенклатурной группы конституциональных расстройств скелета эксперты общим мнением приняли новую международную классификацию НО, включившую в себя 5 типов НО, их клинические проявления и гены, которые вовлечены в развитие указанных типов. Данный вариант был опубликован в 2010 году в *American Journal of Medical Genetics* (Warman et al., 2011). В 2014 г. Van Dijk и Silience в совместной статье согласились с предложенной классификацией (Van Dijk и Silience, 2014).

Дальнейшее изменение классификации связано преимущественно с совершенствованием технологий и выявлением новых значимых генетических вариантов. На сегодняшний день описано 22 типа НО (типы I-XXII) согласно ресурсу Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<https://omim.org/>, 12.01.2023). В наиболее актуальной версии классификации все известные фенотипы были сгруппированы в пять групп (типов): первые классические четыре типа НО, которые были описаны Silience, и добавленный V тип, характеризующийся межкостной оссификацией, вывихом головки лучевой кости и образованием гиперпластической мозоли. Классификация учитывает симптомы заболевания, степень тяжести и причинные гены, которые объединены в пять функциональных групп: первичная структура коллагена I типа, модификация коллагена I типа, процессинг и сшивание коллагена I типа, дифференцировка и функция остеобластов и минерализация костей с коррекцией функции остеокластов (van Dijk et al., 2020). Были предприняты попытки разделить гены, ассоциированные с развитием НО, на группы в контексте клинической классификации, один из таких вариантов, где сочетаются клинические и генетический подходы к классификации представлен в таблице 3.

Таблица 3 - Современная классификация типов незавершенного остеогенеза

Тип	Название типа	Ген	Тип наследования
I	Недеформирующий тип с голубыми склерами	<i>COL1A1, COL1A2, SP7, BMP1, P3H1, PLS3</i>	АД, X-сцепленный
II	Перинатально летальный, тяжелый	<i>COL1A1, COL1A2, CRTAP, P3H1, CREB3L1, PPIB, BMP1</i>	АД, АР
III	Прогрессивно деформирующий, умеренно тяжелый	<i>COL1A1, COL1A2, BMP1, CRTAP, FKBP10, P3H1, PLOD2, PPIB, SERPINF1, SERPINH1, TMEM38B, WNT1, CREB3L1, FAM46A</i>	АД, АР
IV	Вариабельный НО с голубыми склерами, среднетяжелый	<i>COL1A1, COL1A2, WNT1, CRTAP, PPIB, SP7, PLS3, TMEM38B, FKBP10, SPARC</i>	АД, АР, X-сцепленный
V	Среднетяжелый НО с оссификацией межкостной мембраны предплечья	<i>IFITM5</i>	АД

Примечание. АД – аутосомно-доминантный; АР – аутосомно-рецессивный типы наследования

Кроме этого, существует ряд заболеваний, клиническая картина которых схожа с незавершенным остеогенезом в основном из-за наличия переломов. В таблице 4 приведена характеристика основных нозологий, с которыми необходимо проводить дифференциальную диагностику.

Таблица 4 - Наследственные болезни, ассоциированные с переломами

Заболевание	Симптомы	Тип наследования	Ген
Остеопороз	Остеопороз, ломкость костей	X - сцепленный	<i>PLS3</i> ; <i>MBTPS2</i>
Остеопороз	Прогрессивно деформирующий тип (III), либо средней степени тяжести (IV) с голубыми склерами	АД	<i>WNT1</i> ; <i>LRP5</i>
Синдром Брука - 1 тип	Внутрисемейная вариабельность между 3 типом НО, артрогрипозом и синдромом Брука (1 тип)	АР	<i>FKBP10</i>
Синдром Брука - 2 тип	Множественные контрактуры суставов, двусторонняя косолапость, кривошея, множественные внутриутробные переломы ребер, белые склеры.	АР	<i>PLOD2</i>
Синдром остеопороза-псевдоглиомы (OPPG)	Может имитировать НО типы III и IV, склеры белые.	АР	<i>LRP5</i>
Синдром Коула-Карпентера	Патологические мутации в <i>SEC24D</i> вызывают незавершенный остеогенез с черепно-лицевой дисплазией у людей.	АР	<i>SEC24D</i>

Примечание. АД – аутосомно-доминантный, АР – аутосомно-рецессивный типы наследования

1.2 Распространенность незавершенного остеогенеза в различных странах мира

Первые данные о распространенности НО в мире появились в публикации Sillence и его коллег. Распространенность I типа была равна 3,5 случаев на 100 000 населения, II типа - 1,6 на 100 000 населения для и III типа - 1-2 на 100 000 населения. Частоту встречаемости IV типа НО установить в те годы не удалось, так как много случаев оставались не диагностированными (Sillence et al., 1979). Исследования, проведенные в Европе и Соединенных Штатах Америки, показали, что распространенность НО составляет 0,3–0,7 на 10 000 новорожденных (при подсчёте учитывали только тяжелые типы НО у новорожденных). Популяционное исследование с использованием Датского национального регистра пациентов показало, что в период с 1997 по 2013 год средняя распространенность составляла 1,5 случаев на 10000 рождений. В Финляндии распространенность составляет около 0,5 на 10 000 человек, большинство из них имеют более мягкие фенотипические варианты I и IV типов НО (Marini et al., 2017). В публикации Subramanian с соавторами приводятся популяционные частоты для разных типов НО во всём мире. Частота НО I типа варьирует от 2,35 до 4,7 на 100 000 человек, II типа - от 1 до 1,4 на 100 000. Точная заболеваемость НО III и IV типов, по данным автора, неизвестна (Subramanian et al., 2022). Известно, что существуют популяционные различия в частотах встречаемости различных типов НО. Имеются сведения, что у 46,85% пациентов с НО из Украины обнаружен НО I типа, у 16,78% - НО III типа, 34,27% - IV тип и 2,10% - V тип НО. У 58% пациентов из Тайваня встречался НО I типа, в 7% - НО III типа, в 35% - НО IV типа. У 28% пациентов из Китая выявлен НО I типа, 38% - III типа НО, 34% - IV типа НО (Nadyrshina D.D., 2022). В шведской когорте детей с НО распространенность I типа составляет 5,16 случаев на 100 000 пациентов, III - 0,89 на 100 000 пациентов и для IV - 1,35 на 100 000 пациентов, что выше средней частоты встречаемости НО в мире. Точных данных о частоте встречаемости V типа НО в разных популяциях нет, все данные сводятся к

приблизительной цифре равной 5% (Lindahl K., 2015). В исследовании африканской популяции было высказано предположение, что III тип НО чаще встречается у темнокожего населения Южной Африки. В Зимбабве исследователи изучили 58 случаев НО, из которых у 42 больных был III тип НО, что составило 72,41% (Beighton и Versfeld, 1985). В связи с тем, что данные, которые учитываются при подсчете показателей распространенности, включают в себя в основном клинические проявления, то разумно будет сказать, что в среднем частота встречаемости несовершенного остеогенеза в мире составляет 1 на 10 000 человек.

В России с 2012 года существует Федеральный регистр лиц, страдающих жизнеугрожающими и хроническими прогрессирующими редкими (орфанными) заболеваниями, приводящими к сокращению продолжительности жизни граждан или их инвалидности (утвержден постановлением Правительства РФ от 26 апреля 2012 г. №403), в котором ведется учёт всех известных случаев НО. К сожалению, сегодня нет открытого доступа к данным этого регистра, поэтому поиск информации о распространенности НО по годам осуществлялся исключительно по данным в статьях российских исследователей. По данным Г. Яхяевой в 2016 году в Российском регистре орфанных заболеваний было зарегистрировано 650 случаев НО, из которых 421 – дети (Яхяева и др., 2016). В статье Алимовой и коллег, которая была опубликована в 2019 году, говорится, что на тот момент, распространенность болезни в РФ составляла 1,08 на 100 000 детей (Алимова и др., 2019). В статье Сорокиной с соавторами от 2017 года, упоминаются показатели распространенности для разных регионов России: в Сибирском и Приволжском федеральных округах она составила 1,5 и 1,35 случаев на 100 000 детей, соответственно, в Северо-Западном федеральном округе - 0,28 на 100 000 детей; в Ставропольском крае - 1,42 на 100 000 детей (Сорокина и др., 2017). На сегодняшний день существует масса трудностей для точных вычислений частоты встречаемости заболевания в РФ. Диагностика НО является сложной задачей для генетиков и клиницистов, так как заболевание является гетерогенным и имеет широкий спектр фенотипических проявлений.

1.3 Клиническая вариабельность незавершенного остеогенеза

Клиническая картина несовершенного остеогенеза может варьировать в широких пределах не только в зависимости от типа, но и в пределах него, и даже внутри одной семьи у разных пациентов. Тем не менее, существуют определенные фенотипические признаки, более характерные для разных типов заболевания, во многом на их основе и была создана действующая классификация заболевания

I тип НО (*недеформирующий с голубыми склерами*) является самым лёгким типом и встречается в 50% всех случаев НО. Для данного типа НО характерны серо-голубые склеры (100% пенетрантность) и предрасположенность к тугоухости, начинающаяся чаще в подростковом возрасте, а также лёгкая степень хрупкости костей, то есть переломы случаются редко, а степень скелетных деформаций чаще всего умеренная или их может не быть вовсе (Балычевцева и Гадецкая, 2008; Войтович, 2009). Первый перелом обычно происходит в первый год жизни, когда активно начинает увеличиваться нагрузка на опорно-двигательный аппарат больного. При этом типе НО число переломов у одного пациента может достигать 100, но при этом не приводит к последующим скелетным деформациям. Число переломов при I типе НО зависит от гормональных изменений в организме, например, в период активного роста костей и при ускоренном обмене веществ в костной ткани количество переломов может увеличиваться, а после полового созревания снижаться. Однако, во взрослом возрасте, особенно у женщин в постменопаузе и у мужчин старше пятидесяти лет, переломы могут появиться вновь как следствие возрастных изменений в костной ткани (Steiner RD, Basel D, 2005). Из-за раннего появления переломов, пациенты с I типом НО обычно среднего роста или немного ниже сверстников. В подростковом возрасте часто отмечается снижение слуха, у 50% пациентов к 40 годам отмечают наличие прогрессирующей тугоухости (Kuorila et al., 2002; Swinnen et al., 2011). Прорезывание зубов обычно начинается раньше, чем у сверстников, поэтому несовершенный дентиногенез у больных I типом НО

встречается часто, причиной этого является преждевременное стирание зубов. (Lund et al., 1998; Steiner and Basel, 2005). Patterson с коллегами сравнили фенотипы пациентов НО I типа с наличием и отсутствием несовершенного дентиногенеза. Было обнаружено, что у первой группы чаще возникают переломы при рождении (25% случаев вместо 6% у пациентов без зубных аномалий). У пациентов первой группы чаще наблюдалась низкорослость и были более выраженные деформации скелета. Вместе с этим, было отмечено, что обе группы имеют одинаковую частота гипермобильности суставов, кровоподтеков, глухоты и вывихов суставов (Paterson et al., 1983).

II тип НО (*перинатально-летальный тип*) является наиболее тяжелым, так как повреждения обычно происходят в период внутриутробного развития и приводят к гибели плода (Sillence et al., 1979; Van Dijk et al., 2011). Такие нарушения морфогенеза возможно диагностировать уже на 18-20 неделе беременности. При помощи ультразвукового исследования можно обнаружить укорочение и деформации конечностей, а также нарушение в костеобразовании мозговой и лицевой частей черепа. Также исследователи отмечают внутриутробные переломы ребер с последующими их деформациями и уплотнениями. Обычно, когда подобные переломы встречаются вместе с деформациями длинных трубчатых костей, то такой фенотип относят к особо тяжелому случаю заболевания - подтип А. Остальные несколько менее тяжелые случаи относят к подтипу В, который по клиническим признакам схож с НО III типа (Van Dijk and Sillence, 2014). В публикации 1984 года Sillence и коллеги проанализировали и классифицировали 48 случаев с НО II типа. Было выделено три подтипа на основании рентгенологических признаков - подтип А (38 случаев) — короткие, широкие, плоские длинные кости, ангуляция голеней и ребер с непрерывной окантовкой; подтип Б (6 случаев) - короткие, широкие, плоские бедра, ангуляция голеней, но нормальные ребра или ребра с неполной бороздчатостью; и подтип С (4 случая) - длинные, тонкие, неадекватно смоделированные длинные кости с множественными переломами и тонкими ребрами. II тип НО характеризуется наличием голубых или серого цвета склер и

деформациями грудной клетки. Чаще всего такие новорожденные могут прожить несколько недель до наступления стадии дыхательной недостаточности (Sillence et al., 1984).

III тип НО (*прогрессивно-деформирующий*) характеризуется тяжелыми инвалидизирующими проявлениями (Arantes et al., 2021). К фенотипическим проявлениям при данном типе НО относят голубые склеры (интенсивность цвета с возрастом снижается), множественные переломы, значительные деформации костей (большинство больных не способны самостоятельно передвигаться), низкий рост, несовершенный дентиногенез. Первый перелом у пациентов с III типом НО случается в период внутриутробного развития или же при рождении. Размеры головы у новорожденных непропорциональны размерам тела, голова обычно треугольной формы из-за недоразвития костей лицевой части черепа. Все пораженные пациенты низкого роста, с детского возраста наблюдается кифосколиоз и деформации грудной клетки (Sinikumpu et al., 2015). У больных отмечают частые компрессионные переломы и искривление позвоночника, множественные переломы конечностей и скелетные деформации даже при отсутствии явного перелома. Некоторых пациентов количество и тяжесть переломов ребер приводят к смерти в результате легочной недостаточности в первые несколько недель или месяцев жизни (Steiner and Basel, 2005). Сразу после рождения у больных с III типом НО при помощи ультразвукового исследования можно обнаружить симптомы остеопении либо остеопороза, множественные переломы, различные искривления и скелетные деформации. Особенностью данного типа НО является то, что кости больного в течение нескольких недель могут обрести плоский вид. Характерные плоские позвонки, которые искривляются с развитием платиспондии, и являются патогномичным рентгенологическим признаком III типа НО (Stephen et al., 2016). Генетическая консультация пораженных семей обязательна для снижения рисков рождения ребенка с подобным типом НО, либо если в семье уже имеется больной ребенок, то она необходима для скорейшего назначения правильного

лечения, поддерживающей терапии и курса реабилитации, целью которого является увеличение массы костной ткани и мышечной силы.

IV тип НО (*средней степени тяжести с нормальным цветом склер*) характеризуется множественными переломами, остеопорозом, различной степенью деформаций длинных трубчатых костей верхних и нижних конечностей и позвоночника. У больных с IV типом НО обычно склеры нормального цвета, в младенчестве можно заметить голубоватый оттенок глаз. Нарушения слуха встречаются не часто. Первый перелом может произойти в первый год жизни ребенка, когда увеличивается нагрузка на осевой скелет. Количество переломов зависит от степени тяжести болезни. У пациентов с этим типом НО наблюдаются задержка роста, степень которой также варьирует. Искривление длинных трубчатых костей встречается часто, однако, их степень значительно ниже, в сравнении с III типом НО. Несовершенный дентиногенез встречается у 30% пациентов с IV типом НО. Степень тяжести заболевания может также варьировать и внутри одной семьи, от легкого до умеренно тяжелого (Holcomb, 1931; Seedorf, 1949).

V тип НО (с кальцинозом в межкостных мембранах и/или гипертрофической мозолью) впервые был описан в 1908 г. (Battle и Shattock, 1908). Более подробно синдром был подробно описан Bauze и коллегами в 1975. В своей работе они сообщили, что 10% их пациентов с умеренным и тяжелым НО и нормальным цветом склер имели НО V типа (Bauze et al., 1975). В дальнейшем было много публикаций, которые описывали случаи данного подтипа заболевания (Roberts, 1976), однако, в связи с тем, что не было общепринятой классификации и был неизвестен молекулярный дефект, приводящий к развитию симптомов данного типа НО, то обозначить их как проявления одной болезни смогли только в 2000 году. Glorieux с соавторами впервые описали пациентов с клиническими проявлениями НО V типа: образование гиперпластической мозоли, вывих головки лучевой кости, окостенение лучелоктевой межкостной мембраны и ограничение вращения предплечья. Также был упомянут необычный гистологический рисунок кости -

неравномерно расположенные «сетчатые» пластинки. При гистоморфометрическом исследовании умеренно-тяжелого НО IV типа в 7 из 26 случаев были выявлены аномалии костей, характерные для НО V типа (Glorieux et al., 2000). В некоторых публикациях описываются случаи НО V типа с голубыми склерами, например, в публикации Shapiro у 2 пациентов из 7 наблюдался данный признак (Shapiro et al., 2013). Такие классические проявления НО как несовершенный дентиногенез и прогрессирующее снижение слуха не характерны для данного типа НО, однако, встречаются единичные упоминания о пациентах с подобными фенотипическими признаками. В 2015 году японские исследователи обобщили известные проявления НО V типа. Установлено, что кальцификация межкостной мембраны предплечья с ограничением супинации/пронации предплечья наблюдается в 100% случаев. В период заживления переломов костей происходит образование гиперпластической мозоли, однако, мозоль образуется не у всех пациентов, частота составляет 65-77% случаев. Вывих головки лучевой кости, приводящий к деформации локтевого сустава, наблюдается с частотой от 36% до 100%. Помимо описанных клинических проявлений, у пациентов наблюдаются такие особенности, как рентгенологически плотная полоса метафизов предплечья и сетчатые ламелярные узоры при гистологическом исследовании костей. Частота встречаемости деформация длинных трубчатых костей - 100%, сколиоза - 70% и компрессионных переломов позвонков - 50% (Hanagata, 2015).

Описанная выше классификация включает в себя основные фенотипические проявления, которые можно встретить у пациентов с НО. С учетом длительности ее существования, удобства использования, представляется целесообразным продолжить ее применение в клинической практике, даже при выявлении новых генетических маркеров заболевания.

1.4 Молекулярный патогенез и генетическая гетерогенность заболевания

В патогенез НО вовлечено, по разным данным, от 22 до 25 генов. Для большинства из них определена их биологическая функция - мутации в этих генах отвечают за биосинтез или посттрансляционные модификации цепей коллагена, а также за минерализацию костной ткани. В одной из последних классификаций было предложено делить эти гены на группы в зависимости от их биологической функции. Выделяют группу А - первичные дефекты структуры или переработки коллагена (*COL1A1*, *COL1A2* и *BMP1*), группу В - дефекты модификации коллагена (*CRTAP*, *P3H1/LEPRE1*, *PP1B* и *TMEM38B*); группу С - дефекты сворачивания и/или сшивания коллагена (*SERPINH1*, *FKBP10* и *PLOD2*); группа D - дефекты костеобразования или минерализации (*IFITM5*); и группа E - дефекты развития остеобластов при недостаточности коллагена (*WNT1*, *CREB3L1* и *SP7*) (Forlino et al., 2016). Хотя данный подход не нашел отражения в клинической классификации заболевания, он является удобным для систематизации выявленных патогенных изменений ДНК.

1.4.1 Патогенные изменения в генах, ответственных за первичную структуру и модификации коллагена I типа

Наибольшее число причинных мутаций выявляется в генах коллагена I типа (*COL1A1* и *COL1A2*). Коллаген I типа – гетеротример, который содержит две $\alpha 1$ цепи и одну цепь $\alpha 2$, синтезируется в виде молекулы проколлагена с центральным трехспиральным доменом и является наиболее распространенным типом коллагена в организме человека, составляя 25% от общего количества белка. Коллаген I типа содержится преимущественно в костной ткани, являясь фибриллярной основой межклеточного вещества. Помимо этого, кости состоят

из различных клеток: остеобласты участвуют в формировании и минерализации костей, остециты поддерживают структуру, а остеокласты обеспечивают резорбцию костной ткани (Hadjidakis и Androulakis, 2006). Коллаген I типа продуцируется остеобластами в несколько этапов. Сначала рибосомы в остеобластах производят одиночные α -цепи внутри клетки. Эти молекулы с правоскрученной тройной полипептидной спиралью, где каждый третий аминокислотный остаток - глицин. Присутствие гидроксикаминокислот (3-гидроксипролина и 5-гидроксилизина) в полипептидной цепи является особенностью молекулы коллагена. Остатки пролина и лизина гидроксилируются посттрансляционно, т. е. после включения в полипептидную цепь. Это нужно для дальнейшего созревания коллагена. Три α -цепи коллагена I типа образуют между собой дисульфидные связи на С-конце молекулы, после сворачиваются в тройную спираль (Shoulders и Raines, 2009).

В 1983 г. первая молекулярная причина НО - делеция в гене альфа 1-цепи коллагена I типа (*COL1A1*) - была описана у пациента с НО II типа (Chu et al., 1983). Мутации в генах *COL1A1* и *COL1A2* встречаются почти при всех типах НО (I-IV), от предположения о генетической (локусной) гетерогенности в значительной степени отказались в пользу аллельной гетерогенности (Marini et al., 2017). Клинический полиморфизм заболевания обусловлен характером мутаций: инсерции, делеции, сплайсинговые мутации, нонсенс-мутации и т.д. Ген *COL1A1* локализован на 17 хромосоме и содержит 51 экзон, ген *COL1A2* находится на 7 хромосоме и содержит 52 экзона. Согласно Лейденской базе данных всего в гене *COL1A1* описано на 2022 год 1415 мутаций, а в гене *COL1A2* - 788 мутаций (<https://databases.lovd.nl/>, 12.01.2023).

Мутации в генах коллагена I типа делятся на структурные и количественные (гаплонедостаточности). Структурные мутации приводят к изменениям в структуре зрелых молекул проколлагена I типа и возникают в результате аминокислотных замен, содержащих пептидные остатки глицина вдоль полипептидной цепи. В результате появляется коллаген с аномальной структурой или сниженными механическими характеристиками. Такие мутации

приводят к задержке сворачивания α цепей тройной спирали в эндоплазматическом ретикулуме, это приводит к сильной модификации цепей коллагена из-за более длительного воздействия посттрансляционных модифицирующих ферментов. Деформированные молекулы коллагена потом собираются в аномальные фибриллы. Таким образом, получается дефектный костный матрикс, который становится причиной переломов у человека с НО. Также возможен вариант, когда аномальный коллаген не выводится, а остается внутри клетки, вызывая стимуляцию аутофагии, активацию апоптоза и нарушение дифференцировки остеобластов. Такие процессы плохо влияют на синтез коллагена, из-за чего происходит снижение костной массы (Marini et al., 2017). Наиболее частыми мутациями, вызывающими нарушения структуры коллагена, являются однонуклеотидные замены, когда заменяется глицин в повторе Gly-X-Y более крупной аминокислотой. В 20-25% случаев структурные мутации в генах *COL1A1* и *COL1A2* происходят в 3' или 5' сайтах сплайсинга, которые отвечают за пропуск экзонов. В таком случае, обычная последовательность триплета Gly-X-Y остается неизменной, однако, выравнивание цепи может сместиться и это, в результате, может повлиять на фолдинг и секрецию коллагена (Wilcox, 2003). Миссенс-мутации (часто замены глицина в повторе Gly-X-Y, где X и Y могут быть любой аминокислотой) или сплайсинговые мутации (не сдвигающие рамку считывания) в *COL1A1* или *COL1A2* обычно приводят к летальному, тяжелому или умеренному НО (типы II, III или IV соответственно) (Marom et al., 2020). Известно, что менее 5% структурных изменений случаются в С - пропептидном домене проколлагена. Изменения в этой области могут разорвать связь между цепями или стимулировать задержку фолдинга белка (Symoens, 2014). Если случится дупликация или делеция одного или двух триплетов Gly-X-Y в спиральной части коллагена, то такие мутации могут вызвать сдвиг рамки считывания цепей в молекуле коллагена I типа и привести к летальному или тяжелому типу НО у носителя такой мутации (Cabral et al., 2003).

К какому типу НО приведет та или иная мутация в гене коллагена I типа, зависит от ряда факторов. Во-первых, место мутации. Мутации на N-конце цепи коллагена не сильно нарушают структуру спирали и ассоциированы с нелетальными фенотипами НО. Мутации в С-концевой спиральной области могут вызвать как летальный, так и умеренный тип НО. Во-вторых, природа замещающей аминокислоты. Если замена аминокислоты произошла во время сворачивания цепи или же заменились заряженные аминокислоты, то такие мутации приводят к тяжелым фенотипам у пораженных людей. Статистически установлено, что летальный исход у пациентов при мутациях в гене *COL1A2* бывает значительно реже, чем при мутациях в *COL1A1*. В-третьих, цепь, в которой произошла замена. Известно, что область, в которой появляются мутации, в $\alpha 1$ цепи составляет 75%, а в $\alpha 2$ цепи – 50%. Замена на С-конце α -1 цепи коллагена в области лиганда MLBR3 (major ligand-binding regions 3), связывающего молекулу коллагена с белками внеклеточного матрикса, препятствует правильной организации внеклеточного матрикса и обычно вызывают летальный тип НО (Sweeney et al., 2008; Orgel et al., 2011). Если в С-пропептиде произошла мутация, которая привела к проблемам в распознавании α -цепи, то в таком случае происходит деградация белка, что в свою очередь приведет к разрушению всех цепей, которые не успели вступить в процесс сборки коллагена (Ishida, 2009). В $\alpha 2$ цепи коллагена также имеются области, мутации в которых приводят к летальному исходу. Такими областями могут быть сайты связывания протеогликанов на коллагеновых фибриллах, нарушения в которых приводят к дефектам сборки костного матрикса (Orgel et al., 2011). Количественные мутации приводят к изменению количества коллагена I типа. В основном это делеции, мутации сдвига рамки считывания или нонсенс-мутации, которые являются причинами меньшей хрупкости костей, чем при качественных мутациях. У пациентов с количественным типом мутации развивается НО I типа (Marom et al., 2020).

Еще один ген из данной группы – *BMP1* - костный морфогенетический белок-1, является прототипом семейства металлопротеиназ, которые участвуют

в эмбриональном развитии различных видов. Известно, что BMP1-подобные протеазы участвуют в процессинге проколлагена типа II, III и V. Гомозиготная трансверсия С на G в 747 положении гена *BMP1* у 2 египетских детей была впервые идентифицирована в кровнородственной семье с тяжелым НО и большой пупочной грыжей (Martínez-Glez et al., 2012). На сегодняшний день сообщается о примерно 20 случаях НО, вызванных мутациями в этом гене. Не было обнаружено значительных гено-фенотипических корреляций, как при НО V типа. У пяти пациентов наблюдались синие склеры (25,0%), у девяти пробандов - сколиоз (45,0%), у одного пробанда - несовершенный дентиногенез (5,0%); ни у одного из них не было потери слуха. Количество переломов в год варьировалось от 1 до более 15, первый перелом был до 3 лет у всех пациентов, пять пациентов родились с переломами. Пупочная грыжа, треугольное лицо, широкий лоб, синяки на коже и легкий птоз наблюдались у некоторых пациентов (Pollitt et al., 2016).

1.4.2 Патогенные изменения нуклеотидной последовательности в генах-модификаторах коллагена I типа

После созревания проколлагенов его цепи проходят несколько этапов посттрансляционных модификаций в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), которые необходимы для нормального сворачивания и стабильности тройной спирали. Качество модификаций также влияет на фолдинг, секрецию и сборку внеклеточного матрикса самого проколлагена (Forlino et al., 2011). Один из наиболее важных этапов посттрансляционных модификаций является гидроксирование остатков пролина при помощи тримерного комплекса коллаген-пролил-3-гидроксирования. Комплекс состоит из пролил-3-гидроксилазы-1, который кодируется геном *P3H1* (Prolyl 3-Hydroxylase), также ассоциированного со специфическим белком, который кодируется геном *CRTAP* (Cartilage Associated Protein), и пролил-цис-транс-изомеразы циклофилин-В,

которая кодируется геном *PPIB* (Peptidylprolyl Isomerase B). *P3H1* содержит домены клеточной адгезии RGD (Arg-Gly-Asp) и ретенционной последовательности KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) в ЭР, которые помогают ему функционировать во внеклеточном матриксе, а также в компартаментах комплекса Гольджи и ЭР (Takagi et al., 2012). Чрезмерная модификация цепей коллагена I типа возникает как следствие отсутствия функционального гена *P3H1* (Fratzl-Zelman et al., 2016). Мутации в этом гене и в гене *CRTAP*, в свою очередь, приводят к образованию аномального комплекса 3-гидроксилирования, нарушая посттрансляционную модификацию и приводя к структурным дефектам коллагена (Marini et al., 2010).

Известно, что ген *CRTAP* экспрессируется во многих тканях и вовлечен в формирование мозга, сердца, конечностей и легких. Его роль в формировании костей была изучена у мышей при помощи метода гибридизации *in situ*, благодаря которому смогли выявить высокий уровень экспрессии гена *Crtap* в пролиферирующих хондроцитах ростовых пластинок, в шейки кости и в кальцифицированных хрящах (Morello et al., 1999). Чтобы доказать роль гена *Crtap*, в другом своём исследовании Morello с коллегами создали нокаутных по первым двум экзонам гена мышей, у которых развилась тяжелая остеопения, были деформированы длинные кости, а к 6-ти месяцам развился сильно выраженный кифоз. Пролиферирующие хондроциты ростовых пластинок у мышей с дефектом в гене *Crtap* были дезорганизованы, а количество остеобластов и остеокластов осталось в норме. Исследователи провели гистоморфометрию, в результате которой окончательно подтвердилась роль *Crtap* в формировании кости. Результат анализа показал, что у нокаутированных мышей были дефекты в количестве продуцируемого остеоида и в качестве остеоидного матрикса. Кроме этого у мышей произошла гипермодификация коллагена I типа, увеличилась секреция коллагена остеобластами, что привело к увеличению размера коллагеновых структур в коже и хрящах (Morello et al., 2006).

P3H1 (пролил-3-гидроксилаза 1) представляет собой ген, кодирующий коллагенпролилгидроксилазу, который в свою очередь участвует в синтезе и сборке коллагена. В 1999 году ген *P3H1* впервые обнаружили в виде протеогликана, обогащенного лейцином и пролином (лепреканом), во время скрининга базальной мембраны клеток опухоли желточного мешка крысы L-2. Молекулярные дефекты в гене *P3H1* обычно приводят НО III типа с тяжелыми клиническими проявлениями. По различным данным, нулевые мутации в этом гене приводят к чрезмерной модификации спирали коллагена и либо к тяжелому фенотипу НО, либо к смерти носителя. Cabral с коллегами описали 5 случаев с нулевыми мутациями в гене *LEPRE1* (Leprecan, ранее название гена *P3H1*). Мутантный аллель был обнаружен у 4 из 5 больных. Преждевременная терминация кодонов гена и минимальная продукция мРНК и белка наблюдались у всех пробандов. Исследователи обратили внимание на то, что у пробандов скорость секреции коллагена была значительно снижена из-за минимального 3-гидроксилирования остатка pro986 $\alpha 1$ цепи коллагена I типа, что негативно сказывалось на укладке и стабильности коллагеновых молекул (Cabral et al., 2007).

Всего описано 6 семей с мутациями в гене *PPIB*. В одной из них клиническая картина соответствует НО типа II, во второй - очень тяжелой НО типа III, а в третьей фенотип похож на умеренно-тяжелый деформирующий НО типа III/IV. В двух случаях, описанных van Dijk с соавторами, три пораженных человека, один из одной семьи и два из второй, имели очень тяжелую клиническую картину, соответствующую НО типа II/III. В первой семье мРНК была нестабильной в культивируемых клетках, тогда как во второй небольшое количество мРНК было стабильным, но кодируемый белок оказался неполноценным. В семье, о которой сообщили Varns с соавторами, клиническая картина была умеренно тяжелой у одного ребенка и более тяжелой у второго. Они оба были гомозиготны по мутации, которая меняла кодон метионина на кодон аргинина в позиции, которая может быть иницирующим кодоном, по крайней мере, для некоторых транскриптов (Pyott et al., 2011).

1.4.3 Патогенные изменения в генах, вызывающих дефекты сворачивания и/или сшивания коллагена

Ген *SERPINH1* (Serp Family H Member 1) кодирует HSP47 - это коллаген-специфический шаперон, который находится в эндоплазматическом ретикулуме. Его функция - стабилизировать свернутый коллаген и маркировать его для переноса в комплекс Гольджи. Мыши с нокаутом гена *SERPINH1* погибают в эмбриональном периоде из-за внутриклеточной агрегации коллагена, задержки секреции и образования аномальных фибрилл. В литературе сообщалось о двух гомозиготных миссенс-мутациях в гене *SERPINH1* у таксы и у ребенка с тяжелым рецессивным несовершенным остеогенезом (тип X), которые, вероятно, приводят к некоторой остаточной активности белка. Ребенок прожил 3 года, у него были голубые склеры, несовершенный дентиногенез и атипичные признаки, такие как кожные буллы, пилорический стеноз и почечные камни. Его коллаген имел повышенную чувствительность к протеазам, что указывает на несовершенство его сворачивания (Christiansen и др, 2010).

FKBP10 (FKBP Prolyl Isomerase 10) представляет собой ген, кодирующий белок FKBP65, принадлежащий к семейству пептидилпролил-цис/транс-изомеразы (PPIase) FKBP-типа. Этот белок локализуется в эндоплазматическом ретикулуме и действует как молекулярный шаперон. Впервые было показано, что дефицит данного белка вызывает рецессивный незавершенный остеогенез (тип XI), от прогрессирующего деформирующего, с переломами длинных костей, платиспондилией и сколиозом, до умеренного, с коротким ростом и возможностью передвижения, при нормальных склерах и зубах. Также мутации *FKBP10* вызывают синдром Брука 1 типа, характерное заболевание с тяжелым несовершенным остеогенезом и врожденными контрактурами крупных суставов, низким ростом и сколиозом (Schwarze et al., 2013). Одни и те же мутации *FKBP10* встречаются как с контрактурами, так и без них, что позволяет предположить, что они являются аллельными. Третий фенотипический вариант

мутаций *FKBP10* - синдром Кускоквим (Kuskokwim), добавляет контрактуры к предыдущему фенотипическому диапазону. Синдром Кускоквим — это врожденное развитие контрактур с незначительными особенностями скелета, встречающееся исключительно у эскимосов племени Юпик на Аляске. Остаточного количества FKBP65 (около 5% от количества в нормальных клетках) при синдроме Кускоквима, по-видимому, достаточно для предотвращения существенной костной дисплазии (Barnes et al., 2013).

Ген *PLOD2* (procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2) кодирует специфический белок, представляющий собой мембраносвязанный гомодимерный фермент, локализованный в цистернах шероховатого эндоплазматического ретикулума. Он катализирует гидроксирование остатков лизила в коллагеноподобных пептидах. Образующиеся в результате гидроксильные группы являются местами прикрепления углеводов в коллагене и, таким образом, имеют решающее значение для стабильности межмолекулярных сшивок. У некоторых пациентов с синдромом Элерса-Данло тип VI наблюдается дефицит активности лизилгидроксилазы (van der Slot et al., 2003). Мутации в кодирующей области этого гена связаны с синдромом Брука 2 типа, имеющего признаки тяжелого НО и суставных контрактур. Альтернативный сплайсинг приводит к образованию множества вариантов транскрипта, кодирующих различные изоформы. В литературе описано не так много случаев данного заболевания. В семье из США родились двое детей с синдромом Брука 2 типа, вызванного мутацией в гене *PLOD2*. У мальчика при рождении были отмечены множественные контрактуры суставов, левосторонняя кривошея и двусторонняя косолапость. Они не были обнаружены при ультразвуковом исследовании за несколько недель до родов. На рентгенограммах черепа, шейного отдела позвоночника, грудной клетки и нижних конечностей выявлены вормиевы кости и множественные двусторонние заживающие переломы ребер. Его склеры были белыми. Обследование в возрасте 8 дней также выявило очень большой передний родничок, достигающий до затылочной кости. У его младшей сестры было порядка 20 переломов, в

основном ребер и ключиц. У нее был более тяжелый сколиоз, что потребовало хирургической коррекции. Контрактур у нее не было, а суставы имели признаки гипермобильности (3-4 балла по шкале Бейтона) (Gistelinck et al., 2021).

1.4.4 Патогенные изменения в гене, вызывающем дефекты минерализации костной ткани

Мутации в гене *IFITM5* (Interferon Induced Transmembrane Protein 5), также называемом *BRIL* (bone-restricted IFITM-like protein), приводят к развитию НО V типа. Классический НО V типа характеризуется образованием гиперпластической мозоли после переломов, кальцификацией межкостной мембраны предплечья, вывихом головки лучевой кости и сетчато-пластинчатым рисунком, наблюдаемым при гистологическом исследовании костей, однако ни один из этих признаков не является патогномоничным, что приводит к затруднениям в диагностике (Tyurin et al., 2022). Ген *IFITM5* расположен на хромосоме 11p15.5 и кодирует белок с функцией регуляции костного метаболизма. Исследования *in vitro* показали, что *IFITM5* может быть вовлечен в процесс формирования кости, так как пик его экспрессии приходится на время продуцирования костного матрикса и процесса клеточной минерализации (Hanagata et al., 2007). В другом исследовании оценивали экспрессию клеточных линий остеобластов MC3T3 и UMR106 и отметили роль белого продукта гена *IFITM5* как положительного регулятора минерализации (Moffatt et al., 2008; Patoine et al., 2017). В 2012 году гетерозиготная мутация (с.-14С>Т) в 5'-нетранслируемой области (UTR) гена *IFITM5* была идентифицирована как основная причина данного типа заболевания. Мутация добавляет 5 остатков к N-концу белковой цепи *IFITM5*. Ген *Ifimt5* мыши имеет 88% сходство с геном *IFITM5* человека. Характер экспрессии *IFITM5* во время эмбрионального развития похож на тот, что наблюдается у Osterix (ген *SP7*), мутации которого приводят к редкой аутосомно-рецессивной форме НО. Доступные данные по

экспрессии у взрослых грызунов доказывают роль *IFITM5* не только в формировании костей во время эмбриогенеза, но и во время постнатального развития. У мышей *Ifitm5*⁻ длинные кости при рождении на 15-25% короче, чем у мышей *Ifitm5*⁺, и они иногда сильно искривлены, что частично проходит к зрелому возрасту. О повышенной хрупкости костей или гиперпластическом мозаичном образовании у *Ifitm5*-дефицитных мышей не сообщалось. Другие недостатки костной массы, наблюдаемые у новорожденных мышей, такие как менее кальцифицированная нижняя челюсть и более тонкий череп, исчезали через 5 недель (Sacks D et al., 2018). *IFITM5* - единственный ген, который приводит к развитию НО с аутосомно-доминантным типом наследования, помимо генов коллагена I типа. Известны всего 200 случаев НО с мутациями в этом гене по всему миру (Maranda et al., 2022). На сегодняшний день, найдено 11 мутаций в гене *IFITM5* согласно базе данных LOVD (<https://databases.lovd.nl/>, 12.01.2023). Zhytnik с соавторами опубликовали работу о результатах поиска патогенного варианта с.-14C>T в гене *IFITM5* в когорте из 90 неродственных пациентов с НО различной степени тяжести из Эстонии, Украины и Вьетнама (Zhytnik et al., 2019). Из 90 пациентов только у 4-х пациентов (4,44%) была идентифицирована мутация с.-14C>T (3 украинца, 1 вьетнамец). Все варианты были *de novo*, кроме одного пациента из Украины, у которого обнаружили аутосомно-доминантный тип наследования. Гиперпластический каллус и вывих головки лучевой кости наблюдались у большинства больных (4/5). Сколиоз и деформация грудной клетки были у 3-х из 5-ти пациентов. У трех пациентов кальцификация межкостной мембраны и метафизарные рентгеноплотные тяжи. Также у трех пациентов были голубые склеры. У одного пациента было сочетание стоматологических проявления – хрупкость зубной эмали, прогрессирующего снижения слуха с 14-летнего возраста и двигательных нарушений. Общее количество переломов всех 5-ти больных НО с мутацией с.-14C>T варьировало от 0,5 до 2,3 раз в год (Zhytnik et al., 2019). В 2014 г. вышли 3 публикации, описывающие миссенс-мутацию с.119C>T (p.Ser40Leu) гена *IFITM5* (Guillén-Navarro et al., 2014; Hoyer-Kuhn et al., 2014; Farber et al., 2014).

Мутация была найдена у пациентов с тяжелым типом НО без признака образования гиперпластической мозоли после перелома или кальцификации межкостной мембраны. Фенотип таких больных Фарбер в 2014 г. назвал «атипичный несовершенный остеогенез VI типа» (Farber et al., 2014) Этот новый уникальный тип НО к 2022 г. идентифицирован у 10 человек (Hedjazi et al., 2022). В 2018 г. был описан новый фенотип пациента с мутацией с.119С>Т (p.Ser40Leu). Данный вариант вызывает тяжелую форму НО в пренатальном периоде развития. Позже у пациента наблюдались низкий рост, микроцефалия, искривленные и короткие конечности (Rodriguez et al., 2018).

1.4.5 Патогенные изменения в генах, вызывающих дефекты развития остеобластов при недостаточности коллагена I типа

Три гена, участвующие в дифференцировке остеобластов, были ассоциированы с фенотипами незавершенного остеогенеза: *WNT1* (Wnt Family Member 1, НО типа XV), *CREB3L1* (CAMP Responsive Element Binding Protein 3 Like 1, НО типа XVI) и *SP7* (Sp7 Transcription Factor, Osterix, НО типа XII). Дефекты этих генов либо вызывают, либо, как ожидается, будут вызывать снижение экспрессии коллагена I типа. Полученные данные подтверждают раннее начало остеопороза, но пока еще накапливаются сведения о причинах незавершенного остеогенеза. Связь дефектов этих генов с коллагеном может быть просто количественной, что приводит к остеопении, сочетающейся с другими проявлениями нарушенной дифференцировки остеобластов. Из этих генов *WNT1* имеет наибольшее количество данных в пользу вовлеченности в патогенез НО. Wnt - это семейство секретируемых гликопротеинов, вовлеченных в процессы костного ремоделирования. В каноническом пути связывание Wnt позволяет цитозольному β -катенину избежать протеасомного разрушения и транслоцироваться в ядро, где он активирует экспрессию нескольких генов, участвующих в формировании костей. Гетерозиготные мутации *WNT1* были

выявлены у пациентов с ранним началом остеопороза (Baron et al., 2013). Гомозиготные мутации в *WNT1* приводят к тяжелому типу незавершенного остеогенеза и встречаются у пациентов низкого роста, с частыми переломами и компрессией позвонков. У некоторых пациентов с дефектами *WNT1* наблюдаются пороки развития головного мозга. Некоторые мутации *WNT1* нарушают активацию канонического пути и минерализацию остеобластов *in vitro*. Мыши, нокаутные по *Wnt1*, имеют тяжелые неврологические дефекты, но не имеют скелетных проявлений. Экспрессия *Wnt1* в остеобластах, остеоцитах, гемопоэтических клетках-предшественниках и В-клетках подтверждает сложную регуляторную роль WNT в формировании костей (Faqeih E, et al., 2013; Laine C et al., 2013).

Второй ген, функционирующий преимущественно на уровне остеобластов, - *CREB3L1*, кодирующий OASIS (old astrocyte specifically induced substance) – специфический белок с не установленной до конца биологической функцией. После протеолиза N-концевой домен OASIS транслоцируется в ядро и активирует промотор *COL1A1*. У нокаутированных мышей наблюдается тяжелая остеопения с уменьшением объема кости, толщины трабекул и задержкой роста. В остеобластах *Oasis*^{-/-} снижена экспрессия *COL1A1* и расширен эндоплазматический ретикулум. Однако в фибробластах братьев и сестер с летальной костной дисплазией большая гомозиготная делеция, включающая ген *CREB3L1*, не вызвала качественные или количественные дефекты коллагена I типа или повышения маркеров стресса эндоплазматического ретикулума. Необходимы дальнейшие исследования гена *CREB3L1* для оценки его вовлеченности в формирование фенотипа незавершенного остеогенеза (Symoens et al., 2013; Murakami et al. , 2009).

Третьим геном с потенциальным остеобластным механизмом является *SP7*, который кодирует Osterix (фактор транскрипции для дифференцировки фибробластов) и является геном-мишенью для Wnt пути. Гомозиготная мутация гена *SP7*, предположительно усекающая пятую часть Osterix, была зарегистрирована при тяжелом рецессивном незавершенном остеогенезе. В

настоящее время изучаются функциональные, молекулярные и биохимические данные для подтверждения роли этого белка в патогенезе НО (Lapunzina P et al., 2010).

1.4.6 Патогенные изменения в генах с неустановленной биологической значимостью

В настоящее время исследователи продолжают открывать новые гены, ассоциированные с развитием НО. Во многом это происходит благодаря развитию и более активному внедрению технологий высокопроизводительного секвенирования. Но, наряду с большим количеством новой информации, возникают и вопросы, главным образом о патогенетической связи выявленных изменений с механизмами развития НО.

Недавно был идентифицирован ген *KDELR2* (Endoplasmic Reticulum Protein Retention Receptor 2), мутации в котором привели к НО в четырех семьях. У всех пациентов выявлены рецессивные патогенные варианты в гене *KDELR2*, состоящие из одного гомозиготного варианта со сдвигом рамки считывания, двух разных гомозиготных миссенс-вариантов и сложного гетерозиготного нонсенс- и миссенс-варианта. Пациенты имели непропорционально низкий рост и имели множественные переломы с раннего детства, что вызвало прогрессирующую деформацию скелета и потребовало повторных хирургических вмешательств, и в итоге привело к инвалидизации (van Dijk et al., 2020). Важной функцией *KDELR* является регулирование транспорта белков между аппаратом Гольджи и эндоплазматическим ретикуломом (ЭР) с целью возврата растворимых резидентных белков обратно в ЭР из промежуточного компартмента цис –рецепторов Гольджи. Электронная микроскопия выявила аномальное качество секретируемых коллагеновых фибрилл с повышенным количеством белка теплового шока HSP47, связанного с мономерными и мультимерными молекулами коллагена. Это подчеркивает

важность внутриклеточной рециркуляции в ЭР молекулярных шаперонов коллагена типа I, а также решающую роль HSP47 в связанном с *KDEL2* патогенном механизме, приводящем к НО (Capitani et al., 2009).

Сообщается о пяти больных НО из неродственных семей с гомозиготными мутациями в гене *MESD* (Mesoderm Development LRP Chaperone). Клиническими проявлениями были переломы в возрасте младше одного года, склеры были как голубой, так и белой окраски, отмечалась задержка развития крупной моторики. У младенца мужского пола с 23 внутриутробными/фетальными переломами, напоминающими незавершенный остеогенез, и с отрицательным результатом на мутации *COL1A1* и *COL1A2* обнаружена мутация в гене *MESDC2/MESD*, продукт которого действует как модулятор Wnt пути (Koduri et al., 2007). Данный ген ассоциирован с формированием НО 20-го типа. У матери младенца был синдром Элерса-Данло гипермобильного типа. У пациентки на сроке 32 недели беременности при УЗИ с высоким разрешением была обнаружена задержка внутриутробного развития плода, уменьшенный размер грудной клетки, короткие конечности и множественные переломы.

Ген *CCDC134* (Coiled-Coil Domain Containing 134) кодирует белок, который во внеклеточной секретируемой форме способствует пролиферации и активации CD8(+) Т-клеток, что указывает на цитокиноподобную функцию (Huang et al., 2014). Повышает цитотоксическую противоопухолевую активность CD8(+) Т-клеток (Huang et al., 2014). Недавно обнаружен гомозиготный вариант в сайте начала трансляции *CCDC134*, демонстрирующий повышенную активацию сигнального пути RAS/MAPK, был зарегистрирован в трех семьях марокканского происхождения с тяжелой деформирующей формой НО. Также сообщается о 9-летнем бразильском мальчике с тяжелым поражением костей с таким же гомозиготным вариантом в гене *CCDC134* (Ali et al., 2022). Патогенетическая значимость данной находки уточняется.

Таким образом, НО является гетерогенным заболеванием, в изучении которого за последние годы достигнут большой прогресс – открыто множество разных генов, участвующих в патогенезе болезни, проведена огромная работа по

классификации типов заболевания, каждый год появляются новые данные о гено-фенотипических корреляциях и патогенетических путях. Клинические проявления мутации могут различаться в пределах одного типа НО, даже одна и та же мутация может приводить к разным фенотипам кровных родственников внутри одной семьи.

Однако до сих пор не установлена степень генетической гетерогенности заболевания, ведется поиск новых мутаций в известных генах и проводится поиск новых генов, вовлеченных в патогенез заболевания.

Понимание эффектов патогенных мутаций генов на уровне белковых продуктов даёт возможность разработать новые стратегии лечения, включая генную и клеточную терапии, основанные на предотвращении экспрессии мутантных аллелей и трансплантации стволовых клеток, соответственно, что может повлиять на степень тяжести заболевания пораженного человека, то есть тяжелый фенотип может преобразоваться в лёгкую форму НО (Niyibizi et al., 2004). Поэтому молекулярно-генетическая диагностика необходима для принятия правильных клинических решений и медико-генетического консультирования отягощенных семей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

В качестве материала исследования использовалась выборка из 226 человек, среди которых 80 образцов ДНК пациентов с незавершенным остеогенезом из 68 семей и 98 членов их семей, а также 48 образцов ДНК здоровых индивидов без костной патологии. Диагноз «незавершенный остеогенез» был установлен медицинскими генетиками в период с 2000 по 2022 годы на основании клинической картины заболевания. Обследуемые проживают на территории Республики Башкортостан и/или состоят на учёте в ГБУЗ «Республиканский медико-генетический центр» (г. Уфа).

На основе специально разработанных анкет установлена этническая принадлежность пациентов (на основе данных до третьего поколения). Этнический состав был следующим: русские – 50% (34/68); татары – 41,1% (28/68); башкиры – 10,2% (7/68); марийцы – 2,9% (2/68); таджики – 4,4% (3/68); метисы – 8,8% (6/68). На сегодняшний день средний возраст пациентов составил 24 года.

Характеристика группы пациентов представлена в таблице 5.

Таблица 5 - Характеристика пробандов и пораженных НО членов семей

Семья	Пациент	Возраст	Пол	Голубые склеры	Число переломов	Этнос
1	1	69	ж	+	18	русская
2	2	56	ж	+	11	татарка
3	3	6	ж	+	3	татарка
4	4	28	м	+	15	татарин
	5	61	ж	-	3	татарка
5	6	20	м	+	33	татарин

Продолжение таблицы 5

6	7	11	м	+	11	татарин
7	8	43	ж	+	>7	русская
8	9	34	м	+	15	башкир/татарка
9	10	53	ж	+	20	русская
	11	31	ж	+	8	русская
10	12	53	м	-	-	мариец
	13	31	м	+	19	мариец
11	14	30	ж	+	10	русский\чуваш
12	15	23	м	+	5	башкир
13	16	20	ж	+	10	башкирка
14	17	38	ж	-	3	русская
	18	11	м	+	6	русский
15	19	-	ж	+	3	татарка
16	20	28	ж	+	13	татарка
17	21	30	ж	+	15	татарка
18	22	14	ж	+	50	татарка
19	23	19	ж	+	14	русская
	24	48	м	-	-	русский
20	25	11	м	+	7	татарин
21	26	19	м	+	12	таджик\татарка
22	27	8	м	-	4	татарин
23	28	13	м	-	3	башкир
24	29	22	м	+	7	татарин\чувашка
15	30	1	ж	-	0	татарка
25	31	13	м	+	5	русский
	32	32	м	-	-	русская
26	33	22	ж	+	5	татарин/башкирка
27	34	6	м	+	5	татарин

Продолжение таблицы 5

28	35	26	м	+	10	башкир
	36	54	ж	-	-	башкирка
29	37	33	м	-	7	русский
	38	60	м	-	-	русская
30	39	33	ж	+	7	татарка
	40	8	ж	+	5	татарка
31	41	16	ж	+	90	татарка
32	42	6	м	-	4	таджик
	43	46	м	-	-	таджик
33	44	12	м	+	10	татарин
34	45	27	ж	-	50	русская
35	46	29	ж	+	15	татарин\русская
36	47	26	м	+	12	татарин
37	48	7	ж	+	1	русская
38	49	10	м	+	>5	русский
39	50	14	м	-	4	татарин
40	51	14	м	+	18	татарка
41	52	16	ж	+	>9	русская
42	53	31	ж	+	>17	татарка
43	54	32	м	+	>11	русский
44	55	35	м	+	8	русский
45	56	16	м	-	-	татарин
46	57	20	м	-	-	башкир
47	58	23	м	-	-	русский
48	59	19	м	-	-	русский
49	60	29	ж	+	10	русская

Продолжение таблицы 5

50	61	20	ж	-	-	русская
51	62	7	м	+	-	русский
52	63	11	м	-	-	татарин
53	64	11	м	-	-	русский
54	65	10	ж	+	4	русская
55	66	33	ж	-	-	русская
	67	33	ж	-	5	русская
56	68	10	ж	+	3	башкирка
57	69	10	м	+	-	татарин
58	70	26	ж	+	4	татарка
59	71	21	м	+	6	русский
60	72	25	м	+	-	русский
61	73	14	ж	-	-	русская
62	74	16	ж	-	6	татарка
63	75	21	ж	-	-	Таджик
64	76	13	ж	-	4	русская
65	77	13	ж	+	-	русская\татарин
66	78	10	м	+	2	русский
67	79	26	ж	-	-	узбек
68	80	12	ж	-	5	татарка

В контрольную выборку включены ДНК 48 человек с нормальным уровнем МПКТ без костной патологии, в основном соответствующие по полу, возрасту и национальности исследуемым пациентам.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение ДНК

Для проведения ДНК-диагностики геномную ДНК обследуемого выделяли из цельной венозной крови стандартным методом фенол-хлороформной экстракции (Mathew, 1984). Для выделения геномной ДНК к 8-10 мл крови добавляли 30-40 мл лизирующего буфера, содержащего 320мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ трис-HCl, pH 7,6. Полученную смесь перемешивали, уравнивали и центрифугировали при +4⁰С, 4000 об/мин в течение 20 минут. По истечении времени центрифугирования, сливали надосадочную жидкость, к осадку добавляли 800 мкл Soline EDTA – буфера для протеиназы К, содержащего 25 мМ ЭДТА, pH 8,0 и 75 мМ NaCl, далее переносили буфер с осадком в новые эппендорфы и добавляли 80 мкл 10% SDS, 20-40 мкл протеиназы К – в зависимости от размера осадка, эппендорфы тщательно перемешивали на ротаторе и инкубировали образец при 37⁰С в течение 12-16 часов.

Экстракцию ДНК осуществляли путем добавления сначала в смесь 800 мкл или 0,8 мл забуференного фенола (фенол-Трис-HCl, pH 7,8, меркаптоэтанол (на 50 мл фенола-Трис-HCl, добавить 0,2 мл меркаптоэтанола)). А после центрифугирования на 10 тысячах оборотов в минуту в течение 10 минут, мы видели двухфазную структуру содержимого пробирки. Далее супернатант (верхняя фракция) переносили в новый эппендорф и добавляли к нему забуференный фенол и хлороформ-изоамиловый спирт - по 0,4 мл каждого (1:1). Хлороформ-изоамиловый спирт получается если добавить 240 мл хлороформа и 10 мл изоамилового спирта.

После активного перемешивания эппендорфов с образцами ДНК, содержимое опять разбилось на две фазы. Верхнюю фракцию мы переносим в новый эппендорф и добавляем 1 мл хлороформ-изоамилового спирта. Центрифугируем. Далее получившуюся жидкость выливаем в чистую колбу (для

одного образца – одна колба) и добавляем 70% спирт для удаления солей. Образовавшуюся «медузу» промываем 96% спиртом. Выделенную ДНК переносим в новый эппендорф, разбавляем водой для инъекций либо если есть, то MilliQ, и подписываем эппендорфы (указываем ФИО пациента, дату рождения и заболевание).

Концентрация ДНК сначала измерялась с помощью спектрофотометра Epoch-1 (BioTek, США) и при необходимости доводилась до рабочей концентрации (30-70 нг/мкл), в зависимости от качества исходного материала.

После выделения ДНК мы также измеряли концентрацию отобранных для NGS образцов прибором Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием набора «Qubit DNA HS Assay Kit» (Thermo Fisher Scientific, США) для количественного определения ДНК (0.2 - 100 нг). После измерения концентрации ДНК образцы считались готовыми для секвенирования нового поколения (NGS).

2.2.2 Подбор праймеров для ПЦР

Для подтверждения результатов NGS секвенирования были подобраны специфичные праймеры для размера фрагмента около 500 пар оснований (таблица 6 и 7).

Подбор праймеров осуществлялся при помощи программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, 12.01.2023). Референсную последовательность гена брали из базы данных Ensemble (<https://www.ensembl.org/>, 12.01.2023).

Таблица 6 - Последовательность собственно разработанных праймеров для генов коллагена I типа (*COL1A1*, *COL1A2*).

Регион (экзоны)	Размер (п.о.)	Направление прайма	Последовательность (5'-3')
<i>COL1A1</i>			
4	372	F	GCCTCTGCCGACGGGAGCAGC
		R	AGGCTGTCCAGGGATGCCATC
5	385	F	ACCTGGCCTCTTGTTCCTTCTC
		R	CTGTAGGATTCTTGCAACTTTTCT
7	300	F	ATAGGCGGCTGGTATAGACAG
		R	TCTCTGAGCATCTCTCCTGCCCTCA
9	346	F	CCCCTGGTGAGCCTGGCGAG
		R	CTGAGTATCGTTCCCAAATGTG
10	255	F	CCCCCAAACCTGACCTGC
		R	GGCCATTAGAACACATCACTG
12	253	F	CAAAGGGATGGCGGTGATGAC
		R	CTGTAGATCAGAGAATAATGAG
15	279	F	GATCCCTGAGCTCTGGAAGGGGCTC
		R	GAGATGGCAGCTGCAAGTCAC
17	160	F	CCAGGGTGGCTTCTGATATG
		R	GACACTGAGTCGGGGACACT
19	228	F	CTGGTGCTAAAGGTGCCAAT
		R	ACTCACGCTGTTACCCTTGG
20	196	F	GAGCCCCTAGTCTTCTGG
		R	CTCCTCGCTTTCCTTCTCT
23	224	F	GTGGCAAAGAGCCACAAACT
		R	CCTCATCCCAGACCCTACAC

36	250	F	CCCTGTCTGTGCCTTCACCCCTTGC
		R	CTTCTCCCCTGAGGATGGCTGAC
37	276	F	TGCCTCCATTA CTGCTCCTCC
		R	TGTAGGAGAGCACAGAGGCATCAAGC
38	236	F	GCTAAAGGCGATGCTGGTC
		R	GGAGAGGCTCAACAGAGAGG
41	211	F	GTGCTGATGGTCCTGCTGTA
		R	ACCAGGGAAGCCTCTCTCTC
43	242	F	CCCATGCCAGTACCCTCAGCATGGC
		R	GGGAGAGCAGGGGAATATGGGTCAG
43-44	304	F	GCAACACTCCATGACCACAGC
		R	CCTGCCTGGGTGAAGTCCGAC
49	476	F	GCTGGTCCTGTTGTATGTAGC
		R	CCAGCACCATATGGTAGGGGCACAT
52	398	F	GGACAGACATCTTCAGAATGAC
		R	TTGCCACAATTTAAGCAAGTAG
<i>COL1A2</i>			
14	258	F	CTTGTACAGGTTGGAAACTGAAC
		R	CCACGGGCACCCTAAGAAGA
17	462	F	CAGTAGCCAAGATGGCAGAATC
		R	CCAGTAAGGCCGTTTGCTCCAG
21	362	F	CGTAAGTAGCTCTATCATCAC
		R	AAGGCAGATGGAAAGCAGATG
31	359	F	AAACCAGGGCTCGGAAGCTACACAA
		R	GGTCCACTGGAATCGGATTGCTGTT
32	336	F	TCTCCCTCCTTTCAATAGCCCAGCC
		R	GTGAAA ACTTGGGCATCCTTGTGCA
38	282	F	TGCGGGAATGATCCACTTGAAGAAA

		R	TCGGAATTGCTCTGAATAGAATGAA
42	349	F	GGAGGGGAAGGTTAGCATTCCATCG
		R	AAAGCCCATTCTTTGGCCTAAGCAA
45	348	F	TGGGCCTAGCTAAGTTGTGT
		R	TAGGCTCTCACCTCTGCTGG
45	480	F	CAACCCAGATTGATGCTAAGCTTC
		R	GTATCAATTCTCAGCATGGACTG
46	320	F	GCAGATTACCAGCAGAGGTGAGAGC
		R	TGAAAATCCTTCTGAGCTGAAGGCC
49	535	F	GAACATGCTTCCGTGTGAAGCTC
		R	AGGGAAATGAGGTTGGGTGCTGGTT
51	471	F	CCCTTTTCCTAAGCTTGGATCTGAG
		R	TTAACCCCCCTTTAGACCCCCCTTG

Таблица 7 - Последовательность собственно разработанных праймеров для генов *IFITM5* и *P3H1*

Ген	Размер (п.о.)	Направление праймера	Последовательность (5'-3')
<i>P3H1</i> 5 экзон	488	F	TTGAGGCTCCTGTGTACTCCC
		R	ACAAGCTGGTGCCTGCTACTT
<i>IFITM5</i> промотор	164	F	ACCAGTCTGAGTGTGGAAGAGA
		R	AGTGTGAGGGCTGTGTGGG

2.2.3 Полимеразная цепная реакция синтеза ДНК

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) необходимо приготовить ПЦР-смесь. Для всех локусов объем ПЦР – смеси составлял 15 мкл. Для этого использовались следующие реактивы: Buffer x10 – специальный буфер для ПЦР - реакции, dNTP - смесь высокоочищенных 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Поставляется в воде высокой степени очистки. H₂O – использовали воду для инъекций, либо MilliQ. Также использовали прямой и обратный праймеры компании «Lumiprobe» (Москва, Россия). Primer F – специфичный для исследуемого локуса прямой праймер. Primer R - специфичный для исследуемого локуса обратный праймер. Taq Pol - Taq ДНК-полимераза использовали фирмы «Евроген» (Москва, Россия) и «Синтол» (Москва, Россия). DNA - ДНК пациента, которому проводится анализ (таблица 8).

Таблица 8 - Пропись для приготовления ПЦР-смеси

		Количество образцов ДНК						
		x1	x3	x5	x6	x8	x9	x10
Реактивы для ПЦР смеси	Buffer x10	1,5	4,5	7,5	9	12	13,5	15
	dNTP	0,6	1,8	3	3,6	4,8	5,4	6
	H₂O	11	32	53	63,5	84,5	95	105,5
	Primer F	0,2	0,6	1	1,2	1,6	1,8	2
	Primer R	0,2	0,6	1	1,2	1,6	1,8	2
	Taq Pol	0,5	1,5	2,5	3	4	4,5	5
	DNA	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Общий объём</i>	15	42	69	82,5	109,5	123	136,5

Необходимый для исследования образец ДНК добавляем в каждую ячейку стрипа отдельно по 1 мкл.

При наличии в исследуемом локусе CG-богатых регионов, в смесь добавляли 0,5 мкл диметилсульфида (DMSO) (таблица 9).

Таблица 9 - Пропись для приготовления ПЦР-смеси с добавлением DMSO

		Количество образцов ДНК						
		x1	x3	x5	X6	x8	x9	x10
Реактивы для ПЦР смеси	Buffer x10	1,5	4,5	7,5	9	12	13,5	15
	dNTP	0,6	1,8	3	3,6	4,8	5,4	6
	H2O	10,5	31,5	52,5	63	84	94	105
	DMSO	0,5	1,5	2,5	3	4	4,5	5
	Primer F	0,2	0,6	1	1,2	1,6	1,8	2
	Primer R	0,2	0,6	1	1,2	1,6	1,8	2
	Tag Pol	0,5	1,5	2,5	3	4	4,5	5
	DNA	1	1	1	1	1	1	1
	Общий объём	15	42,5	70,5	84,5	113	126	140

Готовую смесь для амплификации с образцами ДНК мы запускали на приборе T100 фирмы «BIORAD» (Калифорния, США). Протокол реакции амплификации использовали стандартный:

Протокол ПЦР

Начальная денатурация	94°	4 минуты	} ДИКЛОВ 28-30
Денатурация	94°	30 секунд	
Отжиг праймеров	63-69°	30 секунд	
Элонгация	72°	30 секунд	
Элонгация	72°	7 минут	

Температуру отжига для новых праймеров подбирали экспериментально. Оптимальный вариант температуры для каждого исследуемого локуса

варьировал - от 63 до 69 градусов. Чем больше CG-нуклеотидов в используемых парах праймеров, тем выше температура отжига, также учитывалась первичная последовательность матрицы и специфичность ПЦР.

2.2.4 Метод электрофореза в полиакриламидном геле

Качество готового для работы ПЦР-продукта проверяли на 7% полиакриламидном геле (ПААГ). Для приготовления такого геля необходимо смешать 7 мл 30% акриламида (29 мл акриламида и 1 мл метиленбисакриламид – 29:1), далее добавить 3 мл 10хТБЕ (0,089 М трис-НСl; 0,089 М борная кислота; 0,002 М ЭДТА, рН=8,0). Чтобы получить 10хТБЕ, необходимо разбавить 100 мл концентрированного ТБЕ и добавить 900 мл дистиллированной воды. После всех манипуляций, необходимо довести жидкость до 30 мл, путем добавления дистиллированной воды в смесь из акриламида (29:1) и ТБЕ (10х). В получившийся объем добавляем ТЕМЕД ((СН₃)₂N-СН₂-СН₂-N(СН₃)₂ N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин) – 30 мкл и 10% ПСА (Персульфат аммония) – 266 мкл и заливаем гель.

Перед нанесением на гель необходимо добавить 1 мкл краски, содержащей 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленцианола и 15% фикола, в 5 мкл амплификата (5:1).

Электрофорез образцов размером до 600 п.о. обычно проводили под напряжением до 300В, при помощи 1хТБЕ буфера (0,089 М трис-НСl; 0,089 М борная кислота; 0,002 М ЭДТА, рН=8,0). Длина разгона – 25-30 см. Далее ПААГ-гель помещается в контейнер со специальным раствором бромистого этидия. Результат электрофореза смотрели в гель-документирующей системе QUANTUM-CX5 (Франция).

2.2.5 Секвенирование по Сэнгеру

Секвенирование по Сэнгеру проводилось с использованием прибора 3500 XL Applied Biosystems (США). Для подготовки образцов для секвенирования по Сэнгеру после проверки образцов на электрофорезном геле необходимо очистить образцы ферментами экзонуклеазой (EcoI) и щелочной фосфатазой креветки (Shrimp alkaline phosphatase, SAP).

Расчёты для приготовления смеси EhoSAP и программа для запуска амплификатора приведены в таблице 10 и 11.

Таблица 10 - Пропись для приготовления смеси EhoSAP

Фермент	Количество на реакцию	X+1
EhoI	0,1	0,1 * (X+1)
SAP	0,9	0,9 * (X+1)

- 1) Подготовить смесь EhoSAP, исходя из количества образцов;
- 2) Открутить пробирки с ПЦР-продуктом, чтобы сбросить капли со стен, т.к. смесь наносится одним наконечником;
- 3) Добавить по 1 мкл смеси одним наконечником, не задевая ПЦР-продукт, на стенки тех пробирок, из которых он будет отобран на секвенирование;
- 4) Перемешать на вортексе, открутить, поставить в амплификатор на реакцию.

Таблица 11 - Программа для EhoSAP

1	2	3
37°	80°	4°
20:00	15:00	∞

Реакция

секвенирования ставилась с очищенным продуктом с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, США) (таблица 12).

Таблица 12 - Пропись для реакции секвенирования

Реагент	x1	X + 1
Вода MilliQ	3	3 * (X+1)
BigDye	1	X+1
Буфер BigDye	3	3 * (X+1)
Праймер	2	- / по необходимости
Очищенный образец	1	-

*X + 1 – количество образцов + 1 дополнительный образец для учёта погрешности пипетки.

Праймер добавляется один - прямой или обратный. Далее запускалась программа реакции секвенирования (таблица 13).

Таблица 13 - Программа реакции секвенирования

1*	2	3	4	5	6
95°	95°	52°	60°	ГОТО 2	4°
1:00	0:15	0:10	1:00	34 (35 циклов)	∞

* - Если локус богат GC парами, то 1 шаг можно увеличить до 5 минут

Очистка реакции может осуществляться различными способами, включая очистку с декстраном, гликогеном, соосадителем нуклеиновых кислот Satellite Red, магнитными частицами. Мы в разное время использовали соосадитель нуклеиновых кислот Satellite Red (Евроген, Россия), либо набор для очистки сиквенсовой реакции BigDye (Thermo Fisher Scientific, США), либо магнитные

частицы для очистки ДНК AMPure XP (Beckman Coulter, США). Все манипуляции проводились согласно протоколу фирмы-производителя.

Для очистки реакции с помощью соосадителя Satellite Red нужно открутить пробирки (стрипы). Приготовление смеси было по прописи, представленной в таблице 14.

Таблица 14 - Пропись для приготовления смеси для очистки реакции

Реагент	x1	X + 1
Ацетат натрия или аммония, 5M	1	X+1
Satellite Red	0.2	0.2 * (X + 1)

*X + 1 – количество образцов + 1 дополнительный образец для учёта погрешности пипетки.

Мы совершали следующие действия:

- 1) Добавить на стенки пробирок смесь, не касаясь продуктов реакции, одним наконечником по 1,2 мкл;
- 2) Добавить по 30 мкл 96% этилового спирта, плотно закрыть, перемешать;
- 3) Открутить на центрифуге 14000 об/мин 10 минут;
- 4) Осторожно отобрать супернатант, не задевая и не отбирая красный осадок;
- 5) Добавить 180 мкл 80% этанола (8,5 мл 96% этанола и 1,5 мл воды MilliQ), плотно закрыть, перемешать;
- 6) Открутить на центрифуге 14000 об/мин 10 минут;
- 7) Осторожно медленно отобрать супернатант, не задевая и не отбирая красный осадок так, чтобы спирт не оставался на стенках;
- 8) Высушить хотя бы 10 минут при температуре 37°, но обращать внимание в первую очередь на наличие/отсутствие спирта в пробирке;

9) Добавить в высушенные образцы 12 мкл воды MilliQ, плотно закрыть, перемешать, сбросить капли быстрым центрифугированием на вортексе, подождать 10 минут, снова перемешать и сбросить капли;

10) Перенести очищенные и разбавленные образцы в планшет для секвенирования, закрыть резиновой септой.

Полученные электрофореграммы анализировались в программе Finch TV (Perkin Elmer, США).

2.2.6 Секвенирование нового поколения (NGS)

Секвенирование нового поколения проводилось с использованием различных таргетных панелей.

Панель «несовершенный остеогенез» включала в себя 13 генов (*BMP1*, *COL1A1*, *COL1A2*, *CRTAP*, *FKBP10*, *IFITM5*, *LEPRE1*, *PIIB*, *SERPINF1*, *SP7*, *SERPINH1*, *TMEM38*, *WNT1*), продукты которых участвуют в модификациях коллагена с использованием полупроводникового секвенатора Personal Genome Machine (Ion Torrent, Life Technologies, США) в лаборатории отделения наследственных эндокринопатий ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, г. Москва. Подготовка библиотек и эмульсионная ПЦР проводились в соответствии с рекомендациями производителя. Подготовительный этап - приготовление ДНК-библиотек: амплификация исследуемых участков генома, присоединение к ним адаптеров с 10 штрих-кодами, очистка библиотек; амплификация библиотек на микрочастицах и обогащение микрочастиц, содержащих ДНК-матрицы. Далее проводилась расшифровка последовательности ДНК. Биоинформатическая обработка результатов секвенирования проводилась с помощью программного модуля Torrent Suite 4.2.1 (Ion Torrent, Life Technologies, США) и пакета программ Annovar (<http://www.openbioinformatics.org/annovar>, 12.01.2023).

Панель для NGS-секвенирования 166 генов (*ADAMTSL2, AGPS, ALPL, ANKH, ARSB, ARSE, ATP6V1B, ATP6V0A4, BMP1, CA2, CLCN5, COL10A1, COL11A1, COL11A2, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL9A1, COL9A2, COL9A3, COMP, CREB3L1, CRTAP, CTSA, CYP27B1, CYP2R1, DDR2, DMPLDYM, DYNC2H1, EBP, EHHADH, ENPP1, EVC, EVC2, FAH, FBN1, FGF23, FGFR3, FKBP10, FLNA, FLNB, FUCA1, GAINS, GBLGNPAT, GNPTAB, GNPTG, GNS, GPX4, GUSB, HGSNAT, HNF4A, HSPG2, JDSJ, DUA, INPPL1, LBR, LEPRE1, LIFR, LONP1, LRP5, MAN2B1, MANBA, MATN3, MCOLN1, MMP13, MMP9, NAGLU, NEK1, NME1, NKX3-2, NSDHL, PAPSS2, PEX1, PEX5, JEX6, PEX7, PHEX, PHOSPHO, PLOD2, PLS3, PPIB, PTH1R, RAB33B, RUNX2, SBDS, SERPINF1, SERP1NH1, SGSH, SLC17A5, SLC26A2, SLC2A2, SLC34A1, SLC34A3, SLC35D1, SLC4A1, SLC4A4, SMARCA1, SOX9, SP7, SPARC, SPP1, SUMF1, TCTN3, TMEM38B, TRIP11, TRPV4, TTC21B, VDR, WDR19, WDR34, WDR35, WDR60, WNT1, RMRP, FBN2, MYH3, B77C, GDF6, GNAS, MSX2, TRIM37, FGF23, FGFR2, HOXD13, DLL3, TRAPPC2, ACVR1, ERCC4, HEXB, HEXA, GM2A, AP2S1, CASR, GNAI1, SLC9A3R1, CLCN7, GJA1, HPGD, MTAPL, OSTML, PLEKHM1, PTDSSL, SLC02A1, SNXW, SOST, TBXAS1, TGFB1, TNFRSF11A, TNFSF11B, TNFRSF11, TYROBP*), участвующих в костном метаболизме соединительной ткани у пациентов с отсутствием патогенных изменений на предыдущих этапах исследования. Данный анализ был проведен в Медико-генетическом научном центре (МГНЦ), г. Москва, на приборе ION S5. Глубина прочтения минимум x110.

Панель "Заболевания соединительной ткани" содержит 664 гена, вовлеченные в метаболизм соединительной ткани. Исследование проведено в лаборатории молекулярной патологии «Геномед», г. Москва. Среднее покрытие целевых участков секвенирования в исследуемых генах составляет не менее 70x.

Таргетная NGS-панель «Заболевания соединительной ткани» содержит следующие гены: *AAGAB, ABCA12, ABCB6, ABCC6, ABCC9, ABHD5, ACP5, ACTA2, ACVR2B, ACVRL1, ADAM10, ADAMTS2, ADAMTSL2, ADAR, AGPS, AKT1,*

AKT3, ALDH18A1, ALDH3A2, ALMS1, ALOX12B, ALOXE3, ALPL, ALX4, AMER1, ANKH, ANO5, AP1S1, AP2S1, AP3B1, APCDD1, AQP5, ARSB, ARSE, ATM, ATP2A2, ATP2C1, ATP6V0A2, ATP7A, ATR, AXIN2, B3GALT6, B4GALT7, BANF1, BCS1L, BHLHA9, BLM, BLOC1S3, BLOC1S6, BMP1, BMP2, BMPER, BMPR1B, BRAF, C10ORF11, CA2, CANT1, CARD14, CASR, CBL, CBS, CCBE1, CCDC8, CCM2, CCND2, CDC6, CDH3, CDKN1C, CDSN, CDT1, CENPJ, CEP152, CEP63, CERS3, CFC1, CHST14, CHST3, CLCN5, CLCN7, CLDN1, COL10A1, COL11A1, COL11A2, COL17A1, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COL5A1, COL5A2, COL7A1, COL9A1, COL9A2, COL9A3, COMP, CREBBP, CRELD1, CRTAP, CSTA, CTC1, CTSC, CTSK, CUL7, CYLD, CYP27B1, CYP2R1, CYP4F22, DDB2, DDR2, DHCR24, DHCR7, DKC1, DLL3, DLX3, DMP1, DNA2, DOK7, DSC3, DSE, DSG1, DSG4, DSP, DST, DTNBP1, DYM, DYNC2H1, EBP, ECEL1, EDN3, EDNRB, EFEMP2, EFNBI, EIF2AK3, ELN, ELOVL4, ENG, ENPP1, EP300, EPG5, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, ERF, ESCO2, EVC, EVC2, EXPH5, FAM111A, FAM20C, FAM58A, FAT4, FBLN1, FBLN5, FBN1, FBN2, FERMT1, FGF10, FGF16, FGF23, FGF9, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FKBP10, FKBP14, FLCN, FLG, FLNA, FLNB, FLT4, FOXC2, FOXN1, FREM1, GALNS, GATA2, GDF1, GDF2, GDF3, GDF5, GDF6, GJA1, GJB2, GJB3, GJB4, GJB6, GJC2, GLB1, GLI3, GNA11, GNPAT, GNPTAB, GNPTG, GNS, GORAB, GPC6, GPR143, GSC, GTF2H5, GUSB, HAMP, HFE, HFE2, HGSNAT, HOXA11, HOXD13, HPGD, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, HR, HRAS, HSPG2, IDS, IDUA, IFITM5, IFT122, IFT140, IFT172, IFT43, IFT80, IHH, IKBKG, IL11RA, IMPAD1, INPPL1, ITGA3, ITGA6, ITGB4, JUP, KIF11, KIF22, KIT, KITLG, KRAS, KRIT1, KRT1, KRT10, KRT14, KRT16, KRT17, KRT2, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT74, KRT81, KRT83, KRT86, KRT9, LAMA3, LAMB3, LAMC2, LARP7, LBR, LEFTY2, LEMD3, LIFR, LIPH, LIPN, LMBR1, LMNA, LMX1B, LOR, LPAR6, LRP4, LRP5, LTBP4, LYST, MAP2K1, MAP2K2, MATN3, MBTPS2, MC1R, MEGF8, MEOX1, MFAP5, MGP, MITF, MLH1, MLPH, MMP1, MMP13, MMP9, MPLKIP, MSH2, MSH6, MSX2, MTAP, MYBPC1, MYH11, MYH3, MYH8, MYLK, MYO5A, NAGLU, NEK1, NF1, NF2, NHP2, NIN, NIPAL4, NKX2-5, NKX3-2, NODAL, NOG, NOP10, NPR2, NRAS, NSDHL, OBSL1,

OCA2, OFD1, ORC1, ORC4, ORC6, OSTM1, P3H1, PAPSS2, PAX3, PCNT, PCYT1A, PDCD10, PDE4D, PDGFRB, PEX7, PHEX, PHYH, PIEZO2, PIK3CA, PIK3R2, PKP1, PLEC, PLEKHM1, PLOD1, PLOD2, PLOD3, PLS3, PMS2, PNPLA1, POC1A, POFUT1, POGLUT1, POLD1, POLH, POMP, POR, PORCN, POT1, PPIB, PRDM5, PRKARIA, PRKG1, PTCH1, PTDSS1, PTEN, PTH1R, PTHLH, PTPN11, PYCR1, RAB23, RAB27A, RAB33B, RAF1, RAPSN, RASA1, RBBP8, RBM28, RECQL4, RHBDF2, RIN2, RIT1, RMRP, RNU4ATAC, ROR2, RTEL1, RUNX2, SALL1, SALL4, SBDS, SDHB, SDHD, SERPINB7, SERPINF1, SERPING1, SERPINH1, SF3B4, SGSH, SH3PXD2B, SHOC2, SKI, SLC26A2, SLC27A4, SLC2A10, SLC34A1, SLC34A3, SLC35D1, SLC39A13, SLC40A1, SLC45A2, SLC9A3R1, SLCO2A1, SLURP1, SMAD3, SMARCAL1, SNAI2, SNAP29, SNRPE, SNX10, SOS1, SOST, SOX10, SOX18, SOX9, SP7, SPINK5, SPRED1, ST14, STAMBP, STK11, STS, SUMF1, TAT, TBCE, TBX15, TBX3, TBX5, TBXAS1, TCF12, TCIRG1, TCTN3, TERC, TERT, TFR2, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2, TGM1, TGM5, TINF2, TMEM38B, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFSF11, TNNT2, TNNT3, TNXB, TP63, TPM2, TRAPPC2, TREX1, TRIP11, TRPS1, TRPV3, TRPV4, TSC1, TSC2, TTC21B, TWIST1, TYR, TYROBP, TYRP1, USB1, VDR, VPS33B, WDR19, WDR34, WDR35, WDR60, WISP3, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT5A, WNT7A, WRAP53, WRN, XPA, XPC, XYLT1, ZIC3, ZMPSTE24, ZNF469, ZSWIM6.

Таргетная панель праймеров для генов *COL1A1* и *COL1A2* (Prep&Seq™ U-panel OI300-1) разработана и произведена ООО «ПАРЦЕК ЛАБ». Секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq System (США).

Для работы с панелью праймеров Prep&Seq™ U-panel OI300-1 (гены *COL1A1* и *COL1A2*) необходимо использовать реагенты Prep&Seq™ U-target (ООО «ПАРЦЕК ЛАБ»), либо реагенты AmpliSeq (Thermo Fisher Scientific) или AmpliSeq for Illumina (Illumina). Таргетное обогащение ДНК проводилось с использованием Prep&Seq™ U-panel OI300-1, пулов праймеров 1 и 2 (*COL1A1* и *COL1A2*) и ПЦР смеси из Модуля Prep&Seq™ U-target (либо 5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix из набора реагентов Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0). Объем реакции с каждым пулом составлял 10 мкл.

Для проведения таргетного обогащения готовились мастер-миксы исходя из расчетов на 1 реакцию, которые представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Расчёты для приготовления мастер-миксов

Компонент	Объем, мкл
ПЦР смесь 1	2
Пул праймеров <i>COL1A1</i>	5
ДНК 1 или 10 нг	1-3
H ₂ O	До 10
ПЦР смесь 2	2
Пул праймеров <i>COL1A2</i>	5
ДНК 1 или 10 нг	1-3
H ₂ O	До 10

Подготовленные смеси помещались в амплификатор с заданной программой:

Таблица 16 - Программа для таргетного обогащения

Количество циклов	Температура	Время
1	95°C	15 мин
19 (10 нг)	99°C	15 сек
22 (1 нг)	60°C	4 мин
1	4°C	Хранение

В дальнейшем использовалась двухпульсная смесь для каждого анализируемого образца и проводились следующие этапы:

- отрезание праймеров с восстановлением концов;
- лигирование адапторов с ампликонами (адаптеры для лигирования включают индексы i7 и i5 для платформы Illumina с уникальными 8- нуклеотидными последовательностями для индексирования образцов в запусках секвенирования).

Стратегия двойного индексирования подразумевает использование уникальной пары из двух индексов для каждого образца с учетом непересечения пары в запуске секвенирования. В одной пробирке находится пара адаптеров для двойного индексирования);

- очистка продуктов лигирования;
- амплификация библиотек;
- очистка библиотек после обогащения;
- количественная оценка библиотек (с использованием флуориметра Qubit® и набора Qubit dsDNA HS Assay Kit, 1500–8000 нг/мл для платформы Illumina);

- разведение и пулирование (во время данного этапа библиотеки разводятся водой I типа до оптимальной концентрации и пулируются для последующего высокопроизводительного секвенирования).

Оптимальная концентрация для пулирования библиотек, подготовленных для платформы Illumina, составляет 4000 пМ, что соответствует следующим концентрациям библиотек: – 680 нг/мл для ампликонов длиной до 225 п.о. – 800 нг/мл для ампликонов длиной до 275 п.о. – 1040 нг/мл для ампликонов длиной до 375 п.о.

Обработка данных секвенирования проводится с использованием автоматизированного алгоритма, включающего выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (hg19), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов и фильтрацию вариантов по качеству, а также аннотацию выявленных вариантов по каноническому транскрипту каждого гена и их приоритезацию с учетом рекомендаций ACMG.

2.2.7 Биоинформатический анализ результатов

Оценку функциональной значимости валидированных изменений нуклеотидной последовательности генов проводили, используя различные базы данных и предсказательные программы. Поиск описанных ранее вариантов проводился в базах данных экзомного секвенирования (Exome Aggregation Consortium; Exome Variant Server), геномного и таргетного секвенирования (1000 Genomes Project), однонуклеотидных вариантов (dbSNP) и структурных вариантов (dbVar), специализированной базе по мутациям и полиморфным вариантам при НО (Osteogenesis Imperfecta Variant Database). Если нуклеотидный вариант не был описан в литературе ранее и не представлен в базах данных или сведения о нем недостаточны, для решения о его значимости проводился анализ патогенности выявленных вариантов генов с применением предсказательных программ (SIFT, Polyphen2, MutPred, VarSome, EIGEN, FATHMM, PROVEAN, LRT и т.д.).

Программное обеспечение «VariFind»

Для анализа результатов NGS – секвенирования мы использовали программное обеспечение (ПО) «VariFind», которое позволяет проанализировать данные высокопроизводительного секвенирования, контроль качества и аннотацию генетических вариантов. Данное ПО находится в облачном хранилище и не требует дополнительной биоинформатической подготовки пользователя. VariFind подходит для платформ Illumina, Thermo Fisher Scientific и MGI.

Основная рабочая вкладка показывает все найденные варианты с указанием гена, тривиального названия варианта, номенклатуры HGVS, зиготности, значения ACMG, ссылок на внешние базы данных. Выпадающие вкладки предоставляют опции для фильтрации и гибкого поиска, детали анализа, основную информацию о ходе контроля качества, также имеются кнопки для загрузки данных в формате BAM, BAI, VCF.

Контроль качества выполняется автоматически, и на начальном рабочем столе отображаются параметры: общее качество (%); количество горячих точек в регионах с низким покрытием; количество целевых прочтений; контроль контаминации; пол образца.

Наиболее распространенные варианты интерпретируются в соответствии с требованиями ACMG. Клинически значимые варианты, обнаруженные в регионах с низким покрытием, отмечаются красным цветом. Эта вкладка позволяет вам осуществить двойной контроль и убедиться, что нет вариантов в горячих точках или по-другому «хотспотах».

Встроенный IGV-браузер позволяет быстро визуально оценивать результаты, что может понадобиться при мониторинге вариантов в регионах с низким покрытием.

VariFind автоматически генерирует отчет с указанием анализируемых генов, найденных вариантов и параметров качества. Он прост в использовании, хоть и обладает англоязычным интерфейсом.

Программное обеспечение «NGS Wizard»

Для анализа результатов NGS-секвенирования мы дополнительно использовали ПО «NGS Wizard», которое предназначено для обработки геномных данных и данных таргетных панелей обычными пользователями, не имеющими специальных знаний в техническом анализе геномных данных. NGS Wizard автоматически обрабатывает данные разных платформ (Illumina, Oxford Nanopore, Ion Torrent, SeqLL, BGI). В программу можно загрузить прочтения непосредственно из секвенатора в формате FASTQ, картирования в форматах SAM/BAM или генетические варианты в формате VCF, без дополнительной обработки. Анализировать образцы можно в облачном пространстве, которое развернуто в защищенных российских дата-центрах, а также есть возможность обработки и хранения информации на сервере, чтобы проанализированные данные не покидали пределы организации. В NGS Wizard встроены наиболее популярные базы данных для аннотации, такие как ClinVar, Ensembl, 1KG, dbNSFP, dbSNP, gnomAD3, VarSome, OMIM и другие.

Интерпретация найденных вариантов осуществляется по стандартам ACMG. Имеется автоматический поиск по научным и медицинским публикациям по различным нозологиям, более того, есть возможность, создавать свои комментарии к вариантам. Удобно, что в программе есть наглядная визуализация образцов – цветом выделяются образцы, на которые необходимо обратить внимание. ПО позволяет интегрировать собственную библиотеку из статей и цитат из публичных ресурсов - IGV, Pubmed, HPO, Google Scholar.

Преимуществом NGS Wizard является русскоязычный интерфейс, поддерживаются современные пайплайны обработки соматических и герминальных точечных вариантов (SNV), инделов (indels), изменения числа копий (CNV) и структурных вариаций генома (SV) и инструменты, также предоставляются подробные детали работы пайплайна обработки данных. Есть возможность специализированной обработки и создания отчетов для различных нозологий. Финальный отчет можно скачать в формате .xlsx.

2.2.8 Критерии оценки клинической значимости изменений нуклеотидной последовательности

При оценке варианта на патогенность анализируется информация о гене и заболевании в целом – механизм, частота и распространенность заболевания, характер наследования (аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный, X-сцепленный или вариант *de novo*), пенетрантность и экспрессивность гена, функциональные области и т.д. Также осуществляется поиск описания клинической значимости данного варианта в научной литературе, в специализированных базах данных – в нашем случае мы использовали базу данных вариантов незавершенного остеогенеза (<https://oi.gene.le.ac.uk/home.php>, 12.01.2023). Также для определения клинической значимости варианта используются различные предсказательные программы *In silico*.

Варианты классифицируются по пяти основным категориям: 1. Патогенный 2. Доброкачественный 3. Вероятно патогенный 4. Вероятно доброкачественный 5. Вариант неизвестного (неопределенного) значения.

Данная классификация позволяет установить клиническое значение на основании имеющихся фактических данных.

Патогенным считается вариант, о котором уже известно, что он приводит к проявлению заболевания у пациента или прогнозируется как причинный на основании потери функции белка или значительного повреждения белок/белковых взаимодействий.

Патогенным классифицируется причинный вариант заболевания. Чтобы отнести к этой группе, исследователь должен обладать следующими знаниями о найденном изменении:

1. На основании литературы должно быть четкое понимание для какого этноса характерно изменение (это может быть известный патогенный вариант).
2. Были ли прецеденты, когда данный вариант был идентифицирован у лиц с типичными клиническими проявлениями заболевания.
3. Вариант сегрегации с заболеванием в нескольких семьях.
4. Описание в литературе функциональных исследований, демонстрирующих: 1) снижение или потерю функции белка; 2) отклоняющаяся функция белка (усиление функции); 3) наличие абберрантного сплайсинга в соответствующем функциональном анализе.
5. Если известно, что вариант приводит к потере функции (мутации сдвига рамки считывания, нонсенс-вариант, мутации сайта сплайсинга (в положениях +1, +2, -1 и -2 в интроне).

Ожидаемо патогенным (expected pathogenic) считается вариант до конца неизученный, у которого недостаточно доказательств, чтобы быть патогенным. Однако, он имеет некоторые характеристики, которые представляют его как возможную причину заболевания. У таких вариантов прогнозируется потеря функции – это могут быть мутации сдвига рамки считывания, нонсенс-мутации,

мутации сайта сплайсинга (в положениях +1, +2, -1 и -2 в интроне), также мутации, которые приводит к изменению иницирующего кодона.

Потенциальные остаточные функциональные эффекты укороченных или абберантных белковых продуктов устраняются путем сравнения с аналогичными известными опубликованными патогенными вариантами с таким же прогнозируемым эффектом. Эта категория требует, чтобы потеря функции была установленным механизмом заболевания, приводящим к инвалидности. Новые варианты миссенс-мутации, встречающиеся в тех же локусах, что и известные патогенные миссенс варианты, также могут считаться патогенными при отсутствии противоречивых доказательств.

Доброкачественный вариант не имеет известного клинического значения, таким образом, не может считаться причиной возникновения наследственного заболевания.

Чтобы оценить вариант как доброкачественный, необходимо посмотреть информацию о популяционных данных, связанных с заболеваемостью. Как правило, варианты с частотой аллелей $>1\%$ для аутосомно-доминантных или X-сцепленных рецессивных заболеваний или $>3\%$ для аутосомно-рецессивных заболеваний связаны с противоречивой патогенностью в популяциях более 400 человек и считаются доброкачественными, если нет обратных доказательств.

Для редких заболеваний низкие частоты аллелей, при сравнении с показателями заболеваемости, принимаются в качестве самостоятельных критериев. Сайленс (молчащие) мутации и интронные варианты за пределами канонического соединения сплайсинга (в положениях +1, +2, -1 и -2 в интроне) также считаются доброкачественными, если доступная информация о б исследуемом варианте подтверждают или предсказывают (*in silico* алгоритмы сплайсинга) доброкачественное воздействие.

Вероятно патогенный вариант предсказывается как патогенный на основании информации о сходстве данного варианта с уже известными патогенными вариантами.

Такие изменения могут обладать следующими характеристиками:

а) располагаться в функциональном домене или мутационной «горячей точке», что подтверждается близлежащими известными патогенными вариантами или литературой.

б) в том же локусе имеются известные патогенные варианты.

в) внутренние семейные исследования сегрегации или предполагаемые/известные случаи *de novo*, соответствующие заболеванию.

г) программы предсказания патогенности утверждают, что вариант может быть патогенным из-за наличия высоко эволюционно консервативного нуклеотида или остатка.

д) низкая частота минорного аллеля.

е) изменение в транс-положении с другим патогенным вариантом аутосомно-рецессивного типа заболевания у пациента.

Изменение относят к категории «вероятные доброкачественные», если он обладает соответствующими характеристиками в сравнении с уже известными доброкачественными вариантами:

а) вариант расположен в локусе, в котором нет известных патогенных вариантов или которые указаны в литературе как устойчивые к изменениям.

б) неспособность провести сегрегацию во внутренних исследованиях семейной сегрегации.

в) в этом локусе нет эволюционно законсервированных нуклеотидов или остатков, из-за которых бы алгоритмы патогенности *in silico* оценивали данный вариант как доброкачественный.

г) низкая частота минорного аллеля, соответствующая конкретной этнической группе, не имеющего значительного представления в популяционных базах данных.

д) известна другая молекулярная причина заболевания.

е) идентификация данного варианта у контрольной (здоровой) группы пациентов.

ж) удаления или вставки в повторяющихся областях без известной функции.

Вариант с неизвестной или неопределенной значимостью имеет недостаточные или существенные противоречивые доказательства, которые указывают на то, что он, вероятно доброкачественный или вероятно патогенный для данного генетического заболевания:

а) множественные функциональные тесты с разными результатами.

б. противоречивые исследования семейной сегрегации.

в. данные о низкой частоте аллелей при заболеваниях с уникальными факторами (например, сниженная пенетрантность, неменделевское наследование и т. д.).

г. расположенные в функционально неблагополучных регионах.

д. в литературе нет описания ассоциации исследуемого варианта с наблюдаемым фенотипом.

2.8 Дизайн исследования

Наше исследование было разделено на 5 этапов. На первом этапе было проведено таргетное NGS секвенирование 13 генов, продукты которых участвуют в модификациях коллагена I типа. На втором этапе было проведено таргетное NGS секвенирование 166 генов, участвующих в костном метаболизме соединительной ткани. На третьем - была использована расширенная панель, которая включала 664 гена, участвующих в метаболизме соединительной ткани. 4 этап нашего исследования состоял из создания собственной таргетной панели.

Все данные подвергались биоинформатической обработке и идентифицировались как патогенные изменения, приводящие к развитию НО, так и другие изменения.

Далее проводилось секвенирование по Сэнгеру для валидации результатов NGS-исследования и выявления патогенных мутаций у членов семьи.

Все изменения нуклеотидной последовательности со статусом «патогенный» или «вероятно патогенный» проверялись в контрольной группе.

По результатам, полученным на каждом этапе исследования, проводился анализ гено-фенотипических корреляций с определением типа заболевания и типа наследования у пациентов с НО.

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

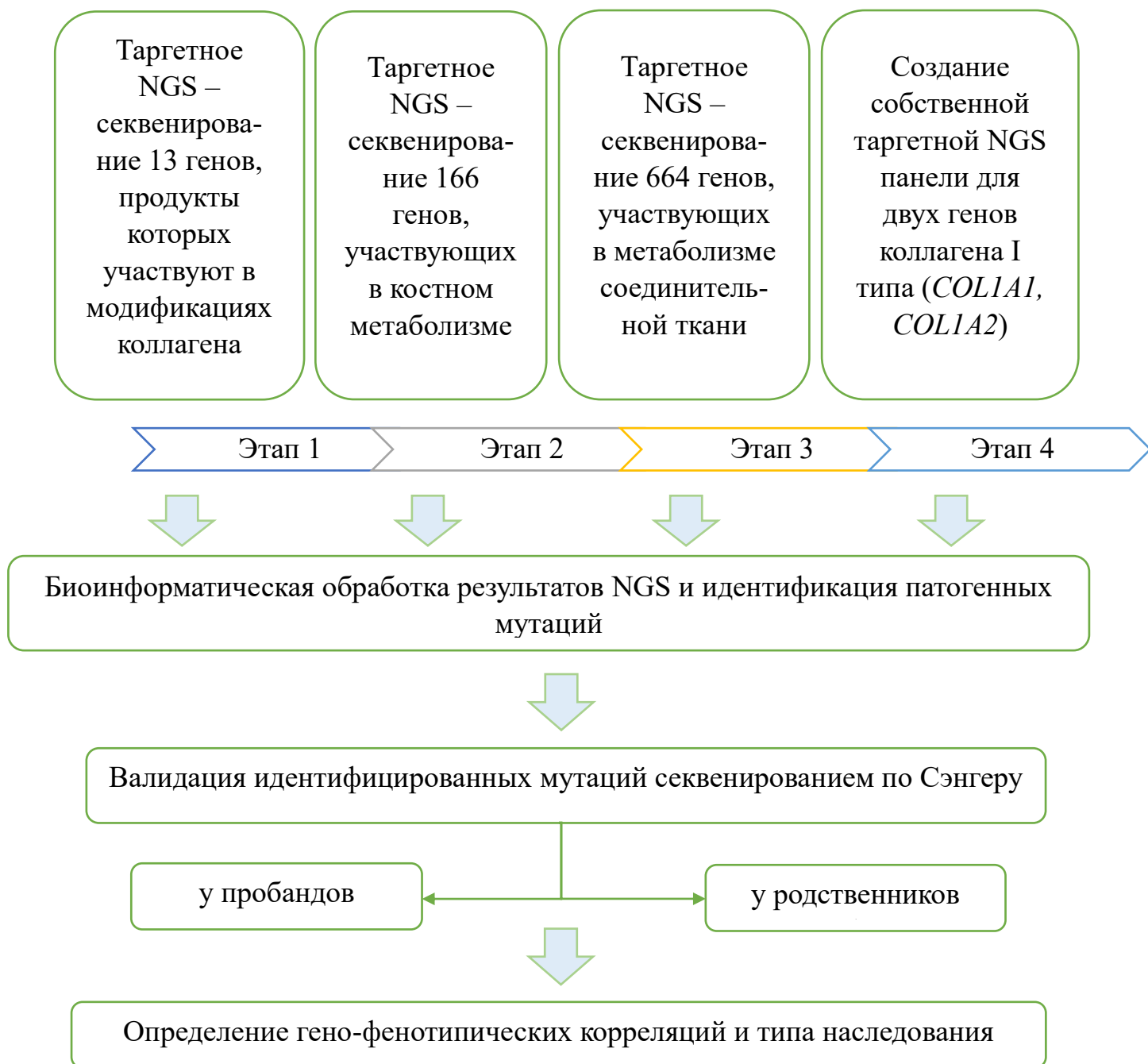


Рисунок 1 - Дизайн исследования незавершенного остеогенеза

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Поиск и идентификация патогенных изменений нуклеотидной последовательности у пациентов с незавершенным остеогенезом

В результате проведенных исследований по поиску патогенных изменений среди 80 пациентов с подозрением на «незавершенный остеогенез», обнаружено 43 мутации в 14 генах (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*, *ERCC4*, *PTH1R*, *ALOX12B*, *ARSB*, *PLEKHM1*, *SGMS2*, *TGFB1*, *CLCN7*, *FGF23*, *LAMB3*) (Приложение А, таблица А.1).

Из них 19 типов мутаций выявлены в гене *COL1A1*, 12 мутаций - в *COL1A2* и по одному типу мутации в генах *IFITM5*, *P3H1*, *ERCC4*, *PTH1R*, *ALOX12B*, *ARSB*, *PLEKHM1*, *SGMS2*, *TGFB1*, *CLCN7*, *FGF23*, *LAMB3*.

Доказано, что гены *COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1* участвуют в патогенезе незавершенного остеогенеза. Гены *COL1A1*, *COL1A2* кодирует цепи про-альфа 1 и про-альфа 2 коллагена типа I, который является основным структурным белком, входящим в состав костной ткани. Ген пролил 3-гидроксилаза 1 (*P3H1*) кодирует фермент, который является членом семейства пролилгидроксилаз коллагена. Эти ферменты локализованы в эндоплазматическом ретикулуме, и их активность необходима для правильного синтеза и сборки коллагена. Ген *IFITM5* (индуцированный интерфероном трансмембранный белок 5) кодирует мембранный белок, который играет роль в минерализации костей.

Мутации в генах *FGF23* (фактор роста фибробластов 23) и *LAMB3* (субъединица ламинина бета 3) встретились как дополнительные мутации у двух пациентов. Мутация в гене *FGF23* (с.212G>C) встретилась у пациента, у которого была идентифицирована мутация в гене *COL1A1* (с.2971G>C, р.Ser71Thr), мутация в гене *LAMB3* (с.1903C>T, р.Arg635*) выявлена у пациента, у которого была обнаружена мутация в гене *IFITM5* (с.-14C>T).

Также у 2 пациентов с 1 типом НО были выявлены сложные гетерозиготы по мутациям в генах *COL1A1* и *COL1A2*. У пациентки русской этнической

принадлежности была идентифицирована мутация с.2869C>T в гене *COL1A1* и сплайсинговая мутация с.1197+5G>A в гене *COL1A2*. Та же самая мутация с.1197+5G>A гена *COL1A2* выявлена в сочетании с мутацией с.579delT гена *COL1A1* у больного татарской этнической принадлежности. Мутации с.579delT, с.2869C>T гена *COL1A1* и с.1197+5G>A гена *COL1A2* ранее были описаны у пациентов с НО и являются патогенными (Swinnen et al., 2009; Zhang et al., 2011; Fuccio et al., 2011; Venturi et al., 2006; Lindahl et al., 2015; Lin et al., 2015; Rolvien et al., 2018).

Остальные 8 типов мутаций, идентифицированы в генах *ERCC4*, *PTH1R*, *ALOX12B*, *ARSB*, *PLEKHM1*, *SGMS2*, *TGFBI*, *CLCN7*, которые ранее были описаны в качестве причинных генов таких заболеваний как: остеопетроз, хондродисплазии, ихтиоз кожи, мукаполисахаридоз, атеросклероз, остеопороз и пигментная ксеродерма (таблица 17).

Таблица 17 - Спектр патогенных изменений, идентифицированных у пациентов из Республики Башкортостан

Ген	Изменение на уровне ДНК	Изменение на уровне белка	При какой патологии описано ранее
<i>COL1A1</i> Коллаген I типа альфа -1 цепи	с.358C>T	p. Arg120*	НО
	с.375dupC	p.Ala126fs	Ранее не описано
	с.407dupG	p.Gly136fs	Ранее не описано
	с.579delT	p.Gly194Valfs	НО
	с.658C>T	p.Arg220*	НО
	с.757C>T	p.Arg253*	НО
	с.858+1G>A	-	НО
	с.967G>T	p.Gly323*	НО
	с.1081C>T	p.Arg361*	НО
	с.1243C>T	p.Arg415*	НО

	c.1265G>C	p.Gly422Ala	НО
	c.1354-12G>A	-	НО
	c.1405C>T	p.Arg469*	НО
	c.2444delG	p.Gly815Alafs	НО
	c.2461G>A	p.Gly821Ser	НО
	c.2569G>T	p.Gly857Cys	НО
	c.2869C>T	p.Gln957*	НО
	c.3076C>T	p.Arg1026*	НО
	c.3792delG	p.Met1264fs	Ранее не описано
<i>COL1A2</i> Коллаген I типа альфа -2 цепи	c.647G>A	p.Arg216His	Ранее не описано
	c.874G>A	p.Gly292Ser	НО
	c.946G>C	p.Gly316Arg	НО
	c.1197+5G>A	-	НО
	c.1826G>A	p.Arg609Gln	Ранее не описано
	c.1897_1902dupG CTGGT	p.Ala633_Gly63 4dup	Ранее не описано
	c.2341G>C	p.Gly781Arg	Ранее не описано
	c.2756G>A	p.Gly919Asp	НО
	c.2971G>C	p.Gly991Arg	Ранее не описано
	c.3034G>A	p.Gly1012Ser	НО
	c.3277G>A	p.Gly1093Ser	Ранее не описано
	c.3977A>G	p.Lys1326Arg	Ранее не описано
<i>P3H1</i> пролил-3- гидроксилаза 1	c.1051G>T	p.Glu351*	Ранее не описано

<i>IFITM5</i> интерферон- индуцированный трансмембранный белок 5	c.-14C>T	-	НО
<i>FGF23</i> фактор роста фибробластов 23	c.212G>C	p.Ser71Thr	Хроническая болезнь почек
<i>LAMB3</i> субъединица ламнина бета 3	c.1903C>T	-	Буллёзный эпидермолиз
<i>ERCC4</i> Экцизионная репарация ERCC 4, каталитическая субъединица эндонуклеазы	c.2395C>T	p.Arg799Trp	Анемия Фанкони
<i>PTH1R</i> Рецептор паратиреоидного гормона 1	c.342C>A	p.His114Gln	Хондродисплазия
<i>ALOX12B</i> ALOX12B арахидонат-12- липоксигеназа, тип 12R	c.526G>A	p.Glu176Lys	Ихтиоз
<i>ARSB</i> арилсульфатаза В	c.454C>T	p.Arg152Trp	Мукополисахари доз VI Тип

<i>PLEKHM1</i> Гомология плекстрина и домен RUN, содержащий M1	c.2902-9C>T	-	Остеопетроз
<i>SGMS2</i> Сфингомиелин синтаза 2	c.148C>T	p. Arg50*	Артериальная кальцификация, атеросклероз и остеопороз
<i>TGFBI</i> трансформирующий фактор роста бета 1	c.945G>C	p.Lys315Asn	Камурати- Энгельмана
<i>CLCN7</i> хлоридный потенциал- зависимый канал 7	c.141+4A>C	-	Остеопетроз

3.1.1. Оценка спектра и частоты патогенных изменений в генах коллагена I типа

Коллаген I типа является наиболее распространенным типом коллагена в человеческом организме и животных, составляет 25% от общего количества белка. Коллаген относится к фибриллярным белкам и является одним из основных компонентов соединительной, костной и хрящевой тканей, а также соединительной ткани, входящей в состав сухожилий. Коллаген I типа представляет собой гетеротример, содержащий две цепи $\alpha 1$ и одну $\alpha 2$, представляет собой молекулы проколлагена с N-концевыми и C-концевыми пропептидами-глобулами. Спиральные домены содержат

непрерывные триплеты Gly-Хаа-Уаа, где X и Y могут быть любыми аминокислотами. Каждый третий аминокислотный остаток - глицин.

Ген *COL1A1* находится на 17 хромосоме и содержит 51 экзон. А ген *COL1A2* находится на 7 хромосоме и содержит 52 экзона. Согласно Лейденской базе данных на 2022 год всего в гене *COL1A1* описано 1415 мутаций, а в гене *COL1A2* - 788 мутаций у пациентов с НО из различных популяций мира (<https://databases.lovd.nl/>, 12.01.2023).

В нашем исследовании найдена всего 31 мутация в двух генах коллагена I типа. Доля патогенных вариантов в генах *COL1A1* и *COL1A2* составила 93,9% (n=31/33) от всех выявленных мутаций в генах, ответственных за развитие НО. На долю структурных мутаций в обоих генах коллагена I типа пришлось 41,9% (n=13/31), а на долю мутаций гаплонедостаточности 58,06% (n=18/31). Из 31 мутации замены глицина на другую аминокислоту с большей боковой цепью встретились в 10 случаях в обоих генах коллагена I типа (3 мутации в гене *COL1A1* и 7 мутаций в гене *COL1A2*), что составило 32,2% (n=10/31).

В нашем исследовании семейные случаи заболевания, при которых выявлены патогенные изменения в генах, вовлеченных в патогенез НО, составили 30,5% (11 семей, n=11/36). По литературным данным, семейные случаи в популяции китайцев встречаются в 33% случаях (Zhang et al., 2012), у итальянцев – 32% (Venturi et al., 2006) и 53% - у вьетнамцев (Lin al., 2015).

В нашей выборке среди всех замен глицина наиболее распространенный вариант был – замена глицина на серин – 28,5% (n=4/14), затем замены аргинина – 21,4% (n=3/14), аланина – 14,2% (n=2/14), аспарагина – 7,1% (n=1/14).

Структурные мутации приводят к изменениям в структуре зрелых молекул проколлагена I типа и возникают в результате аминокислотных замен, содержащих пептидные остатки глицина вдоль полипептидной цепи. Из-за таких мутаций появляется коллаген с аномальной структурой или менее эффективный коллаген. Такие мутации приводят к задержке в сворачивании альфа цепей тройной спирали с эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), в результате чего происходит сильная модификация цепей коллагена из-за более длительного

воздействия посттрансляционно-модифицирующих ферментов. Деформированные молекулы коллагена потом собираются в аномальные фибриллы. Таким образом получается дефектный костный матрикс, который потом станет причиной переломов у человека с НО. Бывает так, что аномальный коллаген не выводится, а остается в ЭР и вызывает его стресс, в результате которого может произойти следующее: стимуляция аутофагии, активация апоптоза или нарушение дифференцировки остеобластов. Такие процессы плохо влияют на синтез коллагена из-за чего происходит снижение костной массы (Marini et al., 2017).

Кабрал с соавторами обнаружили, что если случится дупликация или делеция одного или двух триплетов Gly-X-Y в спиральной части коллагена, то такие мутации могут вызвать сдвиг рамки считывания цепей в молекуле коллагена I типа и привести к летальному или тяжелому типу НО у носителя такой мутации (Cabral et al., 2003).

Тип НО, к которому приведет та или иная мутация в гене коллагена I типа, зависит от ряда факторов. Во-первых, место мутации. Нам достоверно известно, что застёжка молнии молекулы коллагена движется по направлению от С-конца к N-концу всех трех альфа цепей. Мутации на N-конце не сильно нарушают структуру спирали и ассоциированы с нелетальными фенотипами НО. А вот мутации в С-концевой спиральной области могут вызвать как летальный, так и умеренный тип НО. Во-вторых, природа замещающей аминокислоты. Если замена аминокислоты произошла во время сворачивания цепи или же заменились заряженные аминокислоты, то такие мутации приводят к тяжелым фенотипам у больных НО. В-третьих, цепь, в которой произошла замена. Известно, что область, в которой появляются мутации, в альфа 1 цепи составляет 75%, а в альфа-2 цепи – 50%. MLBR3 – лиганд, связывающий молекулу коллагена с белками внеклеточного матрикса. Замена на С-конце α -1 цепи коллагена в области лиганда MLBR3 препятствуют правильной организации внеклеточного матрикса и обычно вызывают летальный тип НО (Sweeney et al., 2008; Orgel et al., 2011). Если в С-пропептиде произошла мутация, которая

привела к проблемам в распознавании α -цепи, то в таком случае происходит деградация белка, связанного с ЭР, что в свою очередь приведет к удалению всех цепей, которые не успели вступить в процесс сборки коллагена (Ishida, 2009). Статистически установлено, что летальный исход при мутациях в гене *COL1A2* бывает значительно реже, чем при мутациях в *COL1A1*.

3.1.1.1 Поиск мутаций в гене альфа-1 цепи коллагена I типа.

Нами в гене *COL1A1* было найдено 19 патогенных изменений, 3 из которых описаны впервые. Характеристика пациентов, у которых обнаружены изменения, представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Спектр мутаций в гене *COL1A1* у пробандов и их родственников и их характеристика

Семья	Пациент	Мутация	Тип НО	Пол	Возраст	Переломы
1	1	c.358C>T, p. Arg120*	1	ж	68	18
2	2	c.375dupC, p.Ala126fs	1	ж	54	11
3	3	c.407dupG, p.Gly136fs	1	ж	5	3
4	4	c.579delT, p.Gly194Valfs	1	м	26	15
	5	c.579delT, p.Gly194Valfs	1	ж	59	3
5	6	c.579delT, p.Gly194Valfs	1	м	19	33
6	7	c.658C>T, p.Arg220*	1	м	9	11

7	8	c.757C>T, p.Arg253*	1	ж	43	>5
8	9	c.858+1G>A	1	м	32	15
9	10	c.967G>T, p.Gly323*	1	ж	30	8
	11	c.967G>T, p.Gly323*	1	ж	52	20
10	12	c.1081C>T, p.Arg361*	3	м	29	19
	13	c.1081C>T, p.Arg361*	3	м	52	не было
11	14	c.1243C>T, p.Arg415*	1	ж	28	10
12	15	c.1265G>C, p.Gly422Ala	3	м	5	3
13	16	c.1265G>C, p.Gly422Ala	3	ж	20	>10
14	17	c.1354-12G>A	1	ж	36	3
	18	c.1354-12G>A	1	м	10	6
15	19	c.1405C>T, p.Arg469*	4	ж	35	>7
16	20	c.2444delG, p.Gly815Alafs	1	ж	27	13
17	21	c.2461G>A, p.Gly821Ser	3	ж	28	15
18	22	c.2569G>T, p.Gly857Cys	3	ж	12	50

19	23	c.2869C>T, p.Gln957*	1	ж	17	14
19	24	c.2869C>T, p.Gln957*	1	м	46	не было
20	25	c.3076C>T, p.Arg1026*	1	м	9	7
21	26	c.3076C>T, p.Arg1026*	1	м	17	12
22	27	c.3792delG, p.Met1264fs	4	м	6	4

В гене *COL1A1* всего нами было идентифицировано 9 нонсенс – мутаций, 5 мутаций сдвига рамки считывания, 3 миссенс-мутации, 2 мутации сайта сплайсинга. Мутации c.375dupC (p.Ala126fs), c.407dupG (p.Gly136fs), c.3792delG (p.Met1264fs) были выявлены впервые и не встречаются в известных базах данных (gnomAD, Ensemble, ClinVar и т.д.) (Приложение А, таблица А.1).

Структурных мутаций было найдено всего 3 (3/19=15,7%), мутаций гаплонедостаточности, приводящих к количественному уменьшению белка – 16 (16/19=84,2%).

Мутации в генах коллагена I типа делят на структурные и количественные (гаплонедостаточности). Количественные мутации (нонсенс-мутации, сплайсинговые и мутации сдвига рамки считывания) приводят к уменьшению количества белка, что в свою очередь ведет к легкому течению заболевания (Marom et al., 2020).

В популяции китайцев на долю структурных изменений приходится 54%, а на мутации гаплонедостаточности – 46% (Zhang, 2011), в украинской популяции соотношение ровно 49%/51% (Zhytnik, 2019), что отличается от нашей выборки пациентов.

Наиболее частые структурные мутации, вызывающие нарушения в структуре коллагена, являются однонуклеотидные замены, когда заменяется глицин в повторе Gly-X-Y более крупной аминокислотой. В 20-25% случаев структурные мутации в генах *COL1A1* и *COL1A2* происходят в 3' или 5' сайтах сплайсинга, которые отвечают за пропуск экзонов. В таком случае, обычная последовательность триплета Gly-X-Y остается неизменной, однако, выравнивание цепи может сместиться и это, в результате, может повлиять на фолдинг и секрецию коллагена (Wilcox, 2003).

В нашей выборке пациентов все три миссенс-мутации явились заменами глицина на другие аминокислоты: аланин, серин и цистеин.

Исследования трехспирального пептида показали, что простая замена Gly в среде (Gly-Pro-Hyp)₈ сильно дестабилизирует цепь и влияет на клиническую тяжесть незавершенного остеогенеза. Также было обнаружено, что на степень дестабилизации пептида влияет то, какая именно аминокислота замещает глицин (Gly). Порядок потери стабильности от наименьшей к наибольшей является следующим: Ala ≤ Ser < Cys < Arg < Val < Glu ≤ Asp (Beck et al., 2000; Bryan et al., 2011). Замены глицина на аланин и серин оказывают наименьшее влияние на конформацию и стабильность пептида и, соответственно, приводят к более легкому течению заболевания (Bryan et al., 2011). Также степень дестабилизации зависит от местоположения сайта мутации (Makareeva et al., 2008).

При летальных типах НО замены глицина на Val, Asp, Glu и Arg наблюдаются чаще, напротив, замены глицина на серин и цистеин встречаются редко у пациентов с летальными случаями НО (Marini et al., 2007; Persikov et al., 2004; Xiao et al., 2011).

По литературным данным остатки Gly наиболее часто заменяются на Ser или Cys, что согласуется с нашими данными (Bryan et al., 2011).

Мутации с.358C>T, с.375dupC, с.407dupG, с.579delT, с.658C>T, с.757C>T, с.858+1G>A, с.967G>T, с.1243C>T, с.1265G>C, с.1354-12G>A, с.2444delG, с.2869C>T, с. 3076C>T в нашей выборке приводили к проявлению лёгкого типа НО (1 тип). Мутации с.1081C>T, с.2461G>A, с.2569G>T гена *COL1A1* приводили

к тяжелому 3 типу НО. Мутации с.1405C>T, с.3792delG в гене *COL1A1* приводили к умеренному 4 типу НО.

Мутации с.358C>T, с.658C>T, с.1243C>T, с.2869C>T, с. 3076C>T, с.858+1G>A, с.1354-12G>A, с.3208-1G>C выявлены у пациентов с 1 типом НО, больные из других популяций имели те же клинические признаки, схожие с пациентами из РБ. Исключение составили мутации с.1081C>T, с.2461G>A и с.2569G>T, выявленные в гене *COL1A1*, которые приводили к отличающимся фенотипам у больных НО (Приложение А, таблица А.1).

Так, замена цитозина на тимин в 1081 положении кДНК, приводящая к стоп кодону у пробанда из РБ приводила к тяжелым клиническим проявлениям заболевания с 3 типом НО. У него наблюдались множественные переломы, которые привели к деформациям конечностей и инвалидизации. У отца с этой же мутацией клиника соответствовала 1 типу НО. Это изменение описано 11 раз и авторы сообщают о легком течении заболевания с 1 типом НО (Körkkö et al., 1998; Benušienė and Kucinskas, 2003; Roschger et al., 2008; Zhang et al., 2011; Lindahl et al., 2015; van Dijk et al., 2011; Zhytnik et al., 2019).

Мутация с.2461G>A была зарегистрирована в базе данных 31 раз и описана у пациентов с 1, 2, 3 и 4 типами НО (www.oi.gene, 12.01.2023). Kloen с соавторами подробно описали пациента с этой мутацией, который имел множественные переломы с плохим заживлением, прогрессирующую деформацию нижних и верхних конечностей, компрессионные переломы позвоночника. Больной не мог самостоятельно передвигаться (Kloen et al., 2018). У нашего больного также наблюдаются множественные переломы и деформации конечностей, что соотносится с 3 типом НО.

Мутация с.2569G>T в гене *COL1A1* описана 8 раз, фенотипы больных также отличались (2, 3, 4 типы НО). У нашего пациента данное изменение приводит к 3 типу НО. У пациентки отмечены множественные переломы, низкий рост и деформации костной системы.

Замена цитозина на тимин в 757 положении кДНК (с.757C>T) была описана 11 раз, фенотипы больных отличались: встречались с 1, 3 и 4 типами НО. Пациент из нашей выборки имел легкую форму с 1 типом НО.

Мутация с.1265G>C описана 1 раз у пациента с 3 типом НО (Marini et al., 2007). Наш пациент башкирской этнической принадлежности имела 10 переломов, множественные деформации и голубые склеры.

У нашего пациента с мутацией с.1405C>T наблюдался 4 тип НО, однако другими исследователями данная мутация описана 4 раза у больных с 1 типом НО.

В целом, в гене *COL1A1* было выявлено 19 патогенных мутаций у 27 человек из 22 семей, из них 7 спорадических случаев, 5 семей с АД типом наследования, в 10 случаях невозможно установить тип наследования. В нашем исследовании семейные случаи с мутациями в гене *COL1A1* составили 22,7% (5/22).

Проанализировав данные нашего исследования, было обнаружено, что в семьях с мутациями с.579delT, с.967G>T, с.1354-12G>A в гене *COL1A1* наблюдались одинаковые клинические проявления I типа НО у пробандов и их родителей.

Помимо семейных случаев со схожими признаками заболевания, были выявлены единичные мутации в семьях, в которых симптомы болезни отличались у её членов. Например, мутации с.1081C>T, с.2869C>T в гене *COL1A1* приводили к тяжелому типу НО у пробанда, а у родителей болезнь никак не проявлялась.

Современные знания не отражают всех нюансов гено-фенотипических корреляций, т.к. к различным клиническим проявлениям может привести одна и та же мутация, даже между членами одной семьи. В ряду поколений при одинаковых мутациях гена *COL1A1* у членов семей также наблюдается эффект утяжеления клинических проявлений заболевания.

Многие мутации у пациентов из нашей выборки явились уникальными для каждой отдельной семьи, за исключением трех патогенных вариантов

(с.3076C>T, с.1265G>C, с.579delT) в гене *COL1A1*, каждая из которых встретилась сразу в двух неродственных семьях татарской этнической принадлежности (таблица 19).

Таблица 19 – Патогенные варианты, повторяющиеся в неродственных семьях с НО

№	Семья	Пациент	Мутация	Тип НО
<i>2 неродственные семьи</i>				
1	20 семья	Пациент 25	<i>COL1A1</i> с. 3076C>T, p.Arg1026*	1
	21 семья	Пациент 26	<i>COL1A1</i> с. 3076C>T, p.Arg1026*	1
<i>2 неродственные семьи</i>				
2	12 семья	Пациент 15	<i>COL1A1</i> с.1265G>C, Gly422Ala	3
	13 семья	Пациент 16	<i>COL1A1</i> с.1265G>C, Gly422Ala	3
<i>2 неродственные семьи</i>				
3	4 семья	Пациент 4	<i>COL1A1</i> с.579delT, p.Gly194Valfs	1
		Пациент 5	<i>COL1A1</i> с.579delT, p.Gly194Valfs	1
	5 семья	Пациент 6	<i>COL1A1</i> с.579delT, p.Gly194Valfs	1

Несмотря на то, что мажорных мутаций при данном заболевании не наблюдается, однако некоторые изменения описаны часто. Так, мутации, встречающиеся в нашей популяции больных НО наблюдались и в других популяциях: мутация с.579delT описана 25 раз, с.757C>T – 11 раз, с.1081C>T –

11 раз, с.1243C>T – 16 раз, с.2461G>A – 31 раз, с.3076C>T – 14 раз (<https://oi.gene.le.ac.uk/>, 12.01.2023, Приложение А, таблица А.1).

Миссенс-мутации (часто замены глицина) или сплайсинговые мутации (не сдвигающие рамку считывания) в *COL1A1* или *COL1A2* обычно приводят к летальному, тяжелому или умеренному НО (типы II, III или IV соответственно) (Marom et al., 2020).

Известно, что менее 5% структурных изменений случаются в С - пропептидном домене проколлагена. Изменения в этой области могут разорвать связь между цепями или стимулировать задержку фолдинга белка (Symoens, 2014).

3.1.1.2 Поиск мутаций в гене альфа-2 цепи коллагена I типа

В гене *COL1A2* было найдено 12 патогенных изменений, 7 из которых ранее не описаны.

Спектр мутаций и характеристика пациентов представлена в таблице 20.

Таблица 20 – Спектр мутаций в гене *COL1A2* и их характеристика у пробандов и их родственников

Семья	Пациент	Мутация	Тип НО	Пол	Возраст	Передачи
23	28	с.647G>A, p.Arg216His	1	м	12	3
24	29	с.874G>A, p.Gly292Ser	1	м	20	7
15	30	с.946G>C, p.Gly316Arg	1	ж	1	нет данных
5	6	с.1197+5G>A	1	м	20	33
25	31	с.1826G>A, p.Arg60429Gln	1	м	11	5
25	32	с.1826G>A, p.Arg609Gln	1	м	41	нет данных

26	33	c.1897_1902dupGCTGGT, p.Ala633_Gly634dup	1	ж	20	5
27	34	c.2341G>C, p.Gly781Arg	1	м	4	5
28	35	c.2756G>A, p.Gly919Asp	3	м	23	10
28	36	c.2756G>A, p.Gly919Asp	3	ж	52	нет данных
29	37	c.2971G>C, p.Gly991Arg	4	м	34	7
29	38	c.2971G>C, p.Gly991Arg	4	м	58	нет данных
30	39	c.3034G>A, p.Gly1012Ser	3	ж	32	7
30	40	c.3034G>A, p.Gly1012Ser	3	ж	6	5
31	41	c.3277G>A, p.Gly1093Ser	3	ж	15	90
32	42	c.3977A>G, p.Lys1326Arg	4	м	4	4
32	43	c.3977A>G, p.Lys1326Arg	4	м	45	нет данных

В гене *COL1A2* всего нами было идентифицировано 10 миссенс-мутаций и 2 мутации сайта сплайсинга. Мутации c.647G>A, c.1826G>A, c.1897_1902dupGCTGGT, c.2341G>, c.2971G>C, c.3277G>A, c.3977A>G были выявлены впервые и не встречаются в известных базах данных (gnomAD, Ensemble, ClinVar и т.д.) (Приложение А, таблица А.1).

Структурных мутаций было найдено всего 10 (10/12=83,3%), мутаций гаплонедостаточности, приводящих к количественному уменьшению белка – 2 (2/12=16,6%).

Среди всех замен в гене *COL1A2* наиболее часто встречалась замена глицина на: аргинин – 3 раза (p.Gly316Arg, p.Gly781Arg, p.Gly991Arg), серин – 3 раза (p.Gly1093Ser, p.Gly292Ser, p.Gly1012Ser) и на аспарагин – 1 раз (p.Gly919Asp).

Мутации с.874G>A, с.946G>C, с.1897_1902dupGCTGGT, с.2341G>C, с.3277G>A в гене *COL1A2* в нашей выборке приводили к проявлению лёгкого типа НО (1 тип). Мутации с.1826G>A, с.2756G>A, с.3034G>A гена *COL1A2* приводили к тяжелому 3 типу НО. Мутации с.647G>A, с.2971G>C, с.3977A>G в гене *COL1A2* приводили к умеренному 4 типу НО.

Мутация с.874G>A, выявленная в гене *COL1A2*, была опубликована 6 раз и приводила к 1 типу у 5 пациентов из Швеции и Германии (Rolvien 2018; Lindahl 2015), также как и у больного из РФ. Однако Duy описал, что данное изменение приводило у пациента из Вьетнама к 3 типу НО (Duy, 2016).

Мутация с.2756G>A гена *COL1A2* была ранее опубликована у пациента с внутриутробными переломами и различными аномалиями со 2 типом НО (Barkova, 2014). У нашего пациента наблюдались низкий рост, голубые склеры, множественные переломы, которые привели к инвалидизации пациента и прогрессирующим деформациям конечностей и 3 типу НО.

Мутация с.3034G>A опубликована 26 раз в базе данных по НО (www.oi.gene, 12.01.2023). Пациенты с этим изменением имели 3 и 4 типы НО. Наша пациентка по клиническим признакам была отнесена к 3 типу НО с голубыми склерами, множественными деформирующими переломами.

В гене *COL1A2* было выявлено 12 патогенных мутаций у 17 человек из 12 семей. Из них 3 спорадических случаев, с аутосомно-доминантным типом наследования – 6 семей, в 3 случаях невозможно установить тип наследования.

В гене *COL1A2* описано 788 мутаций. По данным международной базы по незавершенному остеогенезу, подавляющее большинство мутаций в гене *COL1A2* составляют миссенс-мутации, на долю которых приходится примерно 74%.

Мутации в различных цепях коллагена I типа отличаются по своему фенотипическому эффекту. В цепи $\alpha 1$ коллагена I типа замены заряженными или разветвленными боковыми цепями нарушают стабильность спирали и являются преимущественно летальными. Замены в двух основных областях связывания лиганда вблизи карбоксильного конца $\alpha 1$ цепи имеют

исключительно летальные исходы, указывая на важные взаимодействия между мономером коллагена и белками неколлагенового матрикса. В цепи $\alpha 2$ коллагена I типа замены в основном не летальны; однако восемь летальных кластеров вдоль цепи выравниваются с сайтами связывания протеогликанов на фибриллах коллагена. Наконец, менее 5% мутаций, вызывающих классический незавершенный остеогенез, происходят в С-пропептиде проколлагена, нарушая ассоциацию цепи или фолдинг.

По литературным данным, мутации гаплонедостаточности в генах *COL1A1/COL1A2*, являющиеся следствием мутаций сайта сплайсинга, нонсенс-мутаций, делеций или вставок, обычно создают кодон преждевременной терминации. Эти aberrантные РНК обычно разлагаются нонсенс-опосредованным распадом мРНК (NMD). При нормальных альфа-цепях коллагена типа I, продуцируемых аллелем дикого типа, гаплонедостаточность обычно приводит к умеренному фенотипу НО (Marini et al., 2007). С другой стороны, доминантные негативные эффекты являются результатом миссенс-мутаций или мутаций преждевременного терминирующего кодона, которые позволяют избежать нонсенс-опосредованный распад мРНК; связывание мутировавшей альфа-цепи с нормальными альфа-цепями, продуцируемыми аллелем дикого типа, приводит к аномальному типу коллагена I. Классически известные мутации НО с доминантно-негативным эффектом представляют собой замену аминокислоты на один из обязательных остатков глицина, встречающуюся в каждом третьем положении в цепи *COL1A1* и другие мутации, такие как дефекты пропуска экзонов или делеции в рамке считывания. Большинство случаев НО с доминирующими негативными эффектами обычно более серьезны, чем случаи гаплонедостаточности (Ben Amor et al., 2013).

3.2. Идентификация патогенных изменений в неколлагеновых генах, вовлеченных в развитие незавершенного остеогенеза

Кроме двух генов коллагена I типа, нами обнаружены патогенные изменения в двух неколлагеновых генах, которые являются причинными генами незавершенного остеогенеза.

В гене пролил-3-гидроксилазы-1 (*P3H1*) идентифицирована мутация с.1051G>T (p.Glu351*) у одного больного башкирской этнической принадлежности и одна мутация с.-14C>T выявлена в интерферон-индуцированном трансмембранном белке 5 (*IFITM5*) сразу у трех неродственных пациентов.

Гены *P3H1* и *IFITM5* не отвечают за синтез коллагена, однако продукты данных генов участвуют в посттрансляционной модификации белка и минерализации костей, таким образом, непосредственно влияя на костную ткань. И дефекты этих генов приводят к нарушениям прочности костей, вызывая переломы, которые являются основным фактором, ухудшающим качество жизни пациентов.

3.2.1. Идентификация патогенного варианта в гене интерферон индуцированного трансмембранного белка 5 (*IFITM5*)

IFITM5 – ген интерферон-индуцированный трансмембранный белок 5, кодирует белок BRIL (ограниченный костями Ifitm-подобный белок), представляющий собой трансмембранный белок, экспрессируемый в остеобластах. Ген *IFITM5* вовлечен в патогенез V типа НО с отличительными клиническими признаками у пациентов. На сегодняшний день известно по миру всего 200 больных с данным типом НО (Maranda et al., 2022).

Классический вариант НО V типа характеризуется образованием гиперпластического каллуса после переломов, кальцификацией межкостной

мембраны предплечья, вывихом головки лучевой кости и сетчатым рисунком ламеллирования, наблюдаемого при гистологическом исследовании кости, однако ни один из этих признаков не является патогномоничным для данного типа НО, что определяет его выраженную клиническую гетерогенность. В 2012 году гетерозиготная мутация (с.-14С>Т) в 5'-нетранслируемой области (UTR) гена *IFITM5* была идентифицирована как основная причина незавершенного остеогенеза V типа, что значительно упростило постановку диагноза, а в 2014 году была идентифицирована мутация с.119С>Т, имеющая незначительные отличия в фенотипе. Наконец, недавно был идентифицирован третий возможный патогенный вариант гена *IFITM5*. Ву и др. идентифицирует *de novo* гетерозиготный патогенный вариант *IFITM5* (с.-9С>А), которую несет новорожденная с переломом правой ключицы. В соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики (ACMG) с небольшими изменениями вариант *IFITM5* с. -9С>А был классифицирован как вероятно патогенный. Подобно рекуррентному варианту с.-14С>Т, этот вариант был локализован в эволюционно консервативном аллеле 5'-UTR *IFITM5*, что привело к мутации белка *IFITM5* с дополнительными аминокислотами (MEP-*IFITM5*) (Wu et al., 2020).

По современной классификации для V типа НО характерен аутосомно-доминантный тип наследования.

В нашем исследовании была идентифицирована мутация с.-14С>Т (rs587776916) в гене *IFITM5* сразу у трех неродственных пациентов. У всех пациентов мутация возникла *de novo* (таблица 21).

Таблица 21 – Характеристика семей с мутациями в гене *IFITM5*

Семья	Па-циент	Мутация	Тип НО	Пол	Воз-раст	Перело-мы
33 семья	44	с.-14С>Т,	5	м	10	10
34 семья	45	с.-14С>Т	5	ж	26	50
35 семья	46	с.-14С>Т,	5	ж	27	15

У пациента женского пола (пациент 46), 1994 г.р., смешанной этнической принадлежности (метис), было выявлено одновременно 2 патогенные мутации – одну в гетерозиготном состоянии в гене *IFITM5*, которая является причинной мутацией НО V типа, вторую – с.1903C>T (p.Arg635*, rs80356682) в гене *LAMB3* в гетерозиготном состоянии, отвечающая за проявление буллезного эпидермолиза. Вариант *LAMB3* с.1903C>T приводит к преждевременному терминирующему кодону, который, по прогнозам, приведет к усечению либо полному отсутствию белка *LAMB3* из-за нонсенс-опосредованного распада, который является широко известным механизмом заболевания. Известные программы патогенности считают оба варианта патогенными (MutationTaster, FATHMM, Polyphen2, etc.)

Ген ламинина В-3 (*LAMB3*) относится к семейству белков базальной мембраны. Мутации в гене *LAMB3* были идентифицированы, как причина различных типов буллезного эпидермолиза и несовершенного амелогенеза.

Несовершенный амелогенез (НА) — это врожденное заболевание, которое характеризуется редким аномальным образованием эмали или внешнего слоя коронки зубов, не связанным с какими-либо системными или генерализованными состояниями. Клинически проявляется зубами с аномальным цветом эмали и гипоплазией эмали. Зубы имеют более высокий риск возникновения кариеса и гиперчувствительны к изменениям температуры, а также к быстрому истиранию, чрезмерному отложению камней и гиперплазии десны.

У пациента отсутствуют проблемы с кожей, аномалии зубного ряда имеют место, со слов – состояние зубов не требовало медицинского вмешательства до последнего года, когда появился кариес нескольких локализаций. Для многих типов НО характерен несовершенный дентиногенез, возможно, в основе молекулярного патогенеза данного состояния лежит дефект в гене *LAMB3*. Сочетанного носительства мутаций в генах *IFITM5* и *LAMB3* в литературе не описано.

Мы наблюдали следующие клинические проявления заболевания у этого пациента: 15 переломов, голубые склеры, бочкообразная грудная клетка, треугольное лицо, кифосколиотическая деформация позвоночника, деформация голеней и несовершенный дентиногенез. Обращает на себя внимание отсутствие гиперостозов (гипертрофического каллуса) в области переломов трубчатых костей, а также позднее и незначительное окостенение межкостной мембраны предплечья и голеней. Возможно, это можно объяснить отсутствием терапии препаратами из группы бисфосфонатов (рисунок 2).

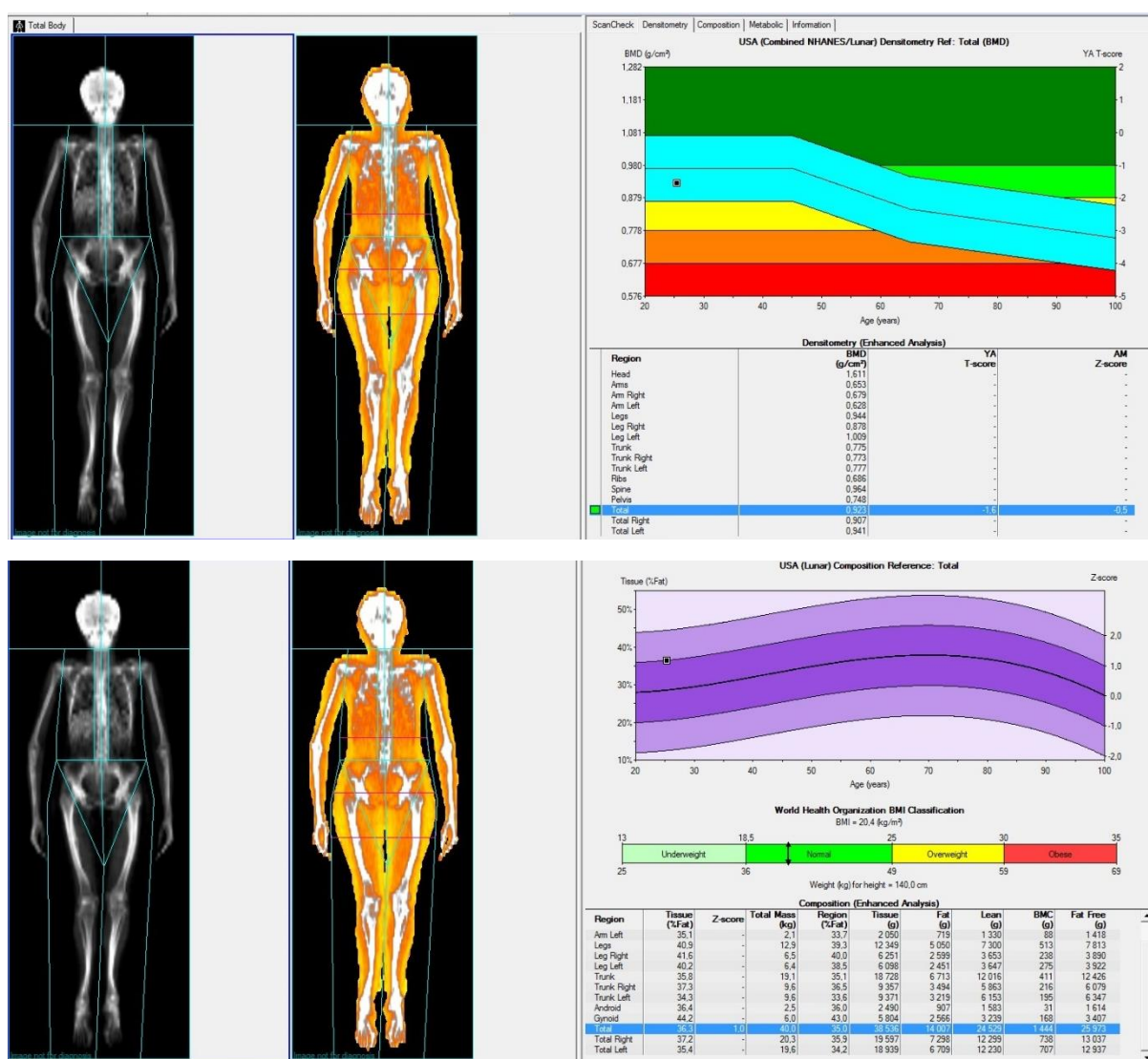


Рисунок 2 – Показатели денситометрии пациентки 46

У данной пациентки были обнаружены два полиморфных варианта в гене *IFITM5*: с.80G>C (rs57285449) и в регуляторном регионе гена – с.-96T>C (rs56069858).

У пациента 7 лет мужского пола башкирской этнической принадлежности также обнаружена мутация с.-14С>Т в промоторной области гена *IFITM5* в гетерозиготном состоянии, приводящая к появлению нового стартового кодона и добавлению 5 аминокислот (Met-Ala-Leu-Glu-Pro) в N-конец белка, приводя к НО типа V. Клиническая картина заболевания полностью соответствовала НО типа V. Пациент весил 17 кг, рост – 110 см (низкий). Диагноз был поставлен в возрасте 2,5 лет. Первый перелом в 1,5 года (левое бедро со смещением, упал с высоты собственного роста), всего в анамнезе 10 переломов, пациент с 2,5 лет на терапии Помегарой (памидроновая кислота). Отмечается укорочение левой нижней конечности на 3 см, вальгусная деформация левого бедра за счет гиперпластической костной мозоли. У пациента плоское лицо с выступающими лобными буграми, плоская переносица, высокий голос, короткая шея, склеры тонкие с просвечивающими сосудами, голубоватые, на зубах тонкая эмаль и кариес, тонкая кожа, сгибательные контрактуры локтевых суставов, коническая грудная клетка, гипермобильность межфаланговых суставов, выраженная синусовая аритмия, общее недоразвитие речи III уровня, слуховая функция не нарушена (рисунок 3 и 4).

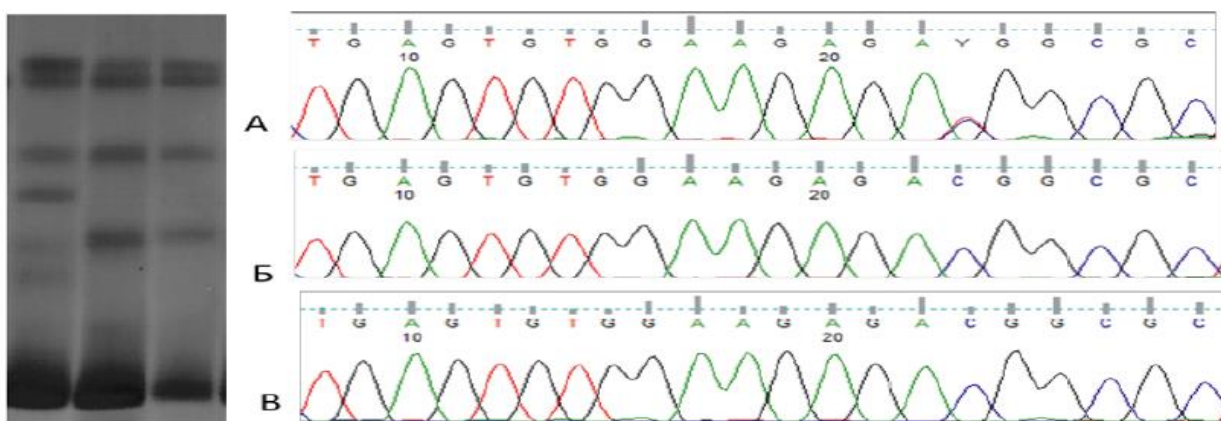


Рисунок 3 – Мутация с.-14С>Т в промоторной области гена *IFITM5* (А-пробанд, Б – отец, В – мать).



Рисунок 4 – Пробанд с мутацией с.-14С>Т в гене *IFITM5* имеет гиперпластическую костную мозоль на левой бедренной кости.

У другого пациента женского пола, 1995 г.р., русской этнической принадлежности была идентифицирована та же мутация с.-14С>Т в промоторной области гена *IFITM5* в гетерозиготном состоянии. У пациентки наблюдалось более 50 переломов, выраженная саблевидная деформация берцовых костей, кифосколиотическая деформация позвоночника и грудной клетки. Сгибательные контрактуры локтевых, коленных, голеностопных суставов. На рентгенограмме костей правой и левой нижних конечностей в 2-х проекциях определяется укорочение и дугообразное искривление бедренных костей, костей голени обеих конечностей, деформация коленных суставов. Костная структура порозно разряжена. У пациентки отсутствуют внешние признаки, характерные для пациентов с незавершенным остеогенезом, в том числе V типа. Слух не нарушен, склеры обычной окраски, нет гиперэластичности кожного покрова и гипермобильности суставов. Есть признаки поражения эмали

зубов, часто развивается кариес. Другая особенность данной пациентки – полное отсутствие болевого синдрома, несмотря на значительные скелетные деформации. Также отсутствуют признаки формирования гиперпластического каллуса в местах переломов. Лечение препаратами из группы бисфосфонатов не получала (рисунок 5).

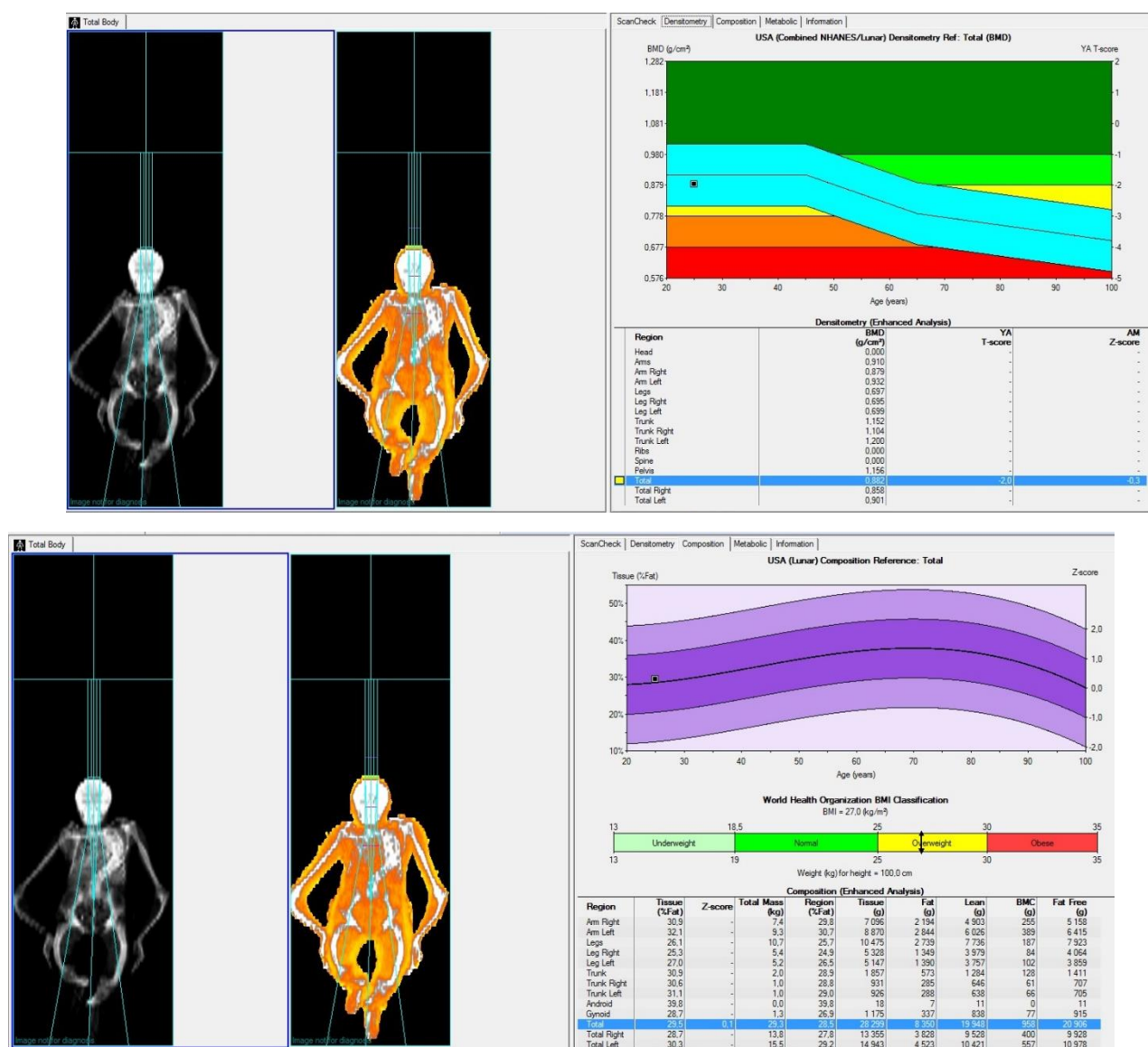


Рисунок 5 – Показатели денситометрии

У данной пациентки было найдено 2 полиморфных варианта: rs57285449 (с.80G>C) и rs2293745 (с.187-45C>T), которые будут описаны ниже.

Таким образом, у трех неродственных пациентов была найдена одинаковая мутация с.-14C>T в промоторной области гена *IFITM5* в гетерозиготном

состоянии. У всех случаи *de novo*. У одной пациентки была найдена дополнительно мутация в гене *LAMB3*, сочетание с которой привело к стертой клинической манифестации НО V типа. Данное сочетание не описано в литературе.

Общая частота НО V типа в нашем исследовании составила 3,75%. Это в целом согласуется с результатами, полученными другими исследователями. У 50 больных из Индии НО V типа выявлен в 2 случаях (4%) (Mrosk et al., 2018), среди 29 больных Малайзии — 1 случай (3,4%) (Nawawi et al., 2018), среди 53 больных японской популяции — 1 случай (1,8%) (Ohata et al., 2019) и среди 39 пациентов из Турции — 2 случая (5,13%) (Demir et al., 2021).

3.2.2. Идентификация патогенного варианта в гене пролил-3-гидроксилазы-1 (*P3H1*)

Ген *P3H1* синтезирует фермент, который является членом семейства коллагенпролилгидроксилаз. Эти ферменты локализованы в эндоплазматическом ретикулуме, и их активность важна для правильного синтеза и сборки коллагена. Мутации в этом гене связаны с незавершенным остеогенезом III типа (по другой классификации – VIII типа НО).

В гене *P3H1*, который участвует в посттрансляционной модификации коллагена, нами обнаружена ранее неописанная мутация с.1051G>T (p.Glu351*) с вероятно патогенным клиническим значением у больного мужского пола башкирской этнической принадлежности. Пробанд был рожден в кровнородственном браке и характеризовался белыми склерами, круглым лицом, деформациями нижних конечностей и не способностью к самостоятельному хождению (передвигается на инвалидном кресле с раннего детства). Родители пробанда и сибс здоровы. Фенотип нашего пациента схож с пациентами, описанными Болдриджом, которые отметили, что мутации в этом гене приводят

к иным клиническим характеристикам, по сравнению с больными, имеющими мутации в генах коллагена I типа (Baldrige et al., 2008).

Также у пробанда и его матери была найдена ранее неописанный вариант сайта сплайсинга с.1720+4G>A в гене *P3H1* (<https://www.ensembl.org>, 12.01.2023) у больного НО татарского этнического происхождения, клиническая картина характерна для НО III типа (VIII типа под другой классификации). На рентгеновских снимках визуализируются тонкие, избыточно минерализованные ребра и длинные трубчатые кости. Мутацию предсказывают как «вероятно доброкачественную» множественные алгоритмы *in silico* и она имеет частоту встречаемости, не соответствующую заболеванию (<https://varsome.com/>, 12.01.2023).

Согласно литературным источникам, пациенты с мутацией в гене *P3H1* характеризуются белыми склерами, круглым лицом, деформациями нижних конечностей. Как отмечают исследователи, нулевые мутации в гене *P3H1* вызывают НО типа 3 типа и являются тяжелыми или летальными и приводят к чрезмерной модификации всей спиральной области коллагена. Сам фермент P3H1 вызывает 3-гидроксилирование $\alpha 1$ (I) Pro986 в коллагене I типа в составе комплекса из трех белков P3H1, CRTAP и CypB в соотношении 1:1:1. P3H1 является каталитически активным компонентом, тогда как CRTAP является вспомогательным белком, но не имеет каталитического домена. Пролил-3-гидроксилирование является одной из нескольких модификаций про-цепей, которые способствуют правильному укладыванию, стабильности и секреции проколлагена. Пролил-4-гидроксилирование важно для термостабильности тройной спирали, в то время как гидроксилирование лизила и гидроксилизилгликозилирование вносят вклад во внеклеточную стабильность поперечных связей между молекулами (Lamande and Bateman, 1999; Myllyharju and Kivirikko, 2004). Нулевые мутации гена *P3H1* фактически отменяют 3-гидроксилирование коллагена I типа. Отсутствие гидроксилирования $\alpha 1$ (I) Pro986 и / или прямого шаперонного эффекта *P3H1* приводит к задержке сворачивания спирали коллагена (Cabral et al., 2007). Пациенты с мутациями в

этом гене описаны у афроамериканцев, африканцев, пакистанцев, арабов. Исследователи отмечают, что чаще всего мутации в этом гене возникали у кровнородственных пациентов. Пепин и др. 2013 описали мутации с эффектом основателя в популяции африканцев (Cabral et al., 2007, Pepin et al., 2013, Baldrige et al., 2008). Нулевые мутации в *P3H1* или *CRTAP* приводят к отсутствию обоих белков в мутантных клетках, потому что эти белки являются взаимоподдерживающими в комплексе, и, в конечном счете, приводят к сходным клиническим признакам у пациентов с НО.

3.3. Идентификация патогенных изменений в генах, не вовлеченных в патогенез незавершенного остеогенеза

Как известно в патогенез НО вовлечены гены, ответственные за первичные дефекты в структуре или процессинге коллагена (*COL1A1*, *COL1A2* и *BMP1*), ответственные за нарушения в посттрансляционной модификации и фолдинге коллагена (*CRTAP*, *P3H1*, *PPIB* и *TMEM38B*), связанные с дефектами сворачивания и сшивкой коллагена (*SERPINH1*, *FKBP10* и *PLOD2*), участвующие в окостенении или минерализации костной ткани (*IFITM5* и *SERPINF1*) и те, которые приводят к нарушению развития остеобластов с недостаточностью коллагена (*WNT1*, *CREB3L1* и *SP7*). То есть все гены, участвующие в патогенезе НО, влияют на костную ткань, приводя к ее хрупкости и, соответственно, переломам. Однако, нами у 7 пациентов были идентифицированы мутации в гетерозиготном состоянии в генах *CLCN7*, *ALOX12B*, *PLEKHM1*, *ERCC4*, *ARSB*, *PTH1R*, *SGMS2*, *TGFB1*, нарушения в которых обуславливают развитие других заболеваний (таблица 22). У всех этих пациентов диагноз «незавершенный остеогенез» впоследствии был снят.

Таблица 22 – Клинические характеристики пациентов с мутациями в неколлагеновых генах

№	Пациенты	Мутация	Возраст	Пол	Голубые склеры	Количество переломов	Клиника
1	43	<i>ALOX12B</i> с.526G>A, р.Glu176Lys	12	м	-	4	Гиперкератоз, переломы плюсневых и пястных костей
2	44	<i>PLEKHM1</i> с.2902- 9C>T	15	ж	+	>9	Нейросенсорная тугоухость, снижение МПКТ, миопия, артропатии
3	45	<i>ERCC4</i> с.2395C>, р.Arg799Trp	5	ж	+	нет	Простой дальнозоркий астигматизм, анемия легкой степени
4	46	<i>ARSB</i> с.454C>T, р.Arg152Trp	12	м	+	нет	Походка прихрамывает. Видимых деформаций нет.
5	47	<i>PTH1R</i> с.342C>A, р.His114Gln	8	м	+	>5	Снижение МПКТ, кифосколиотическая деформация грудной клетки, переломы пястных костей
6	48	<i>CLCN7</i> с.141+4A>C	31	м	+	>11	Выраженной снижение МПКТ, лицевые фенотипы, переломы костей кисти, стопы

7	49	<i>TGFBI</i> с.945G>C, р.Lys315As n	29	ж	+	>17	Низкий рост, варусная деформация конечностей. Саблевидная деформация голеней, кифосколиотическая деформация грудной клетки. Искривление левого предплечья, высокое небо.
8	49	<i>SGMS2</i> с.148C>T, р. Arg50*					

Нами были идентифицированы патогенные изменения с.141+4A>G в гене *CLCN7* и с.2902-9C>T в гене *PLEKHM1* у двух пациентов, у которых отмечались множественные переломы, а также нейросенсорная тугоухость, миопия, артропатии и поражения связочного аппарата. Гены *CLCN7* и *PLEKHM1* ответственны за развитие остеопетроза. Мутации с.141+4A>G в гене *CLCN7* и с.2902-9C>T в гене *PLEKHM1* являются ранее неописанными.

Остеопетроз – группа наследственных метаболических заболеваний костей, характеризующаяся увеличением костной массы из-за дефектов функции или формирования остеокластов, приводящие к нарушениям резорбтивной их функции и, в конечном счете, к переломам (Nadyrshina et al., 2022). На сегодняшний день известно 23 гена, которые участвуют в патогенезе остеопетроза, ответственных за развитие соответствующих клинических остеопетрозных состояний.

Ген *CLCN7* (хлоридный потенциалзависимый канал 7) кодирует 2Cl⁻/H⁺антипортеры, регулируемые потенциал зависимым механизмом, экспрессируемый на «гофрированных краях» остеокластов и на мембранах поздних эндосом и лизосом. Белки семейства CLCN переносят ионы хлора через клеточные мембраны для поддержания мембранного потенциала, регулируют

трансэпителиальный транспорт Cl^- и контролируют pH между различными органеллами. Мутации в гене *CLCN7* ответственны за 17% случаев аутосомно-рецессивного остеопетроза и за большинство случаев аутосомно-доминантного остеопетроза (70%) (Penna et al., 2021). Биаллельные мутации вызывают очень тяжелую форму заболевания, при которой костные дефекты и гематологическая недостаточность сочетаются у некоторых больных с первичной нейродегенерацией, напоминающей лизосомную болезнь накопления, церебральной атрофией, спастичностью, аксиальной гипотонией и периферической гипертонией. И наоборот, одноаллельные мутации *CLCN7* приводят к аутосомно-доминантному остеопетрозу и связаны с более легкими симптомами и более поздним началом.

Ген *PLEKHM1* (член 1 семейства M, содержащий домен гомологии плекстрина) кодирует цитозольный белок, участвующий в путях переноса в эндосомы посредством взаимодействия с малыми GTP-азами RAB7 и ARL8 (Coudert et al., 2015). Кроме того, *PLEKHM1* участвует в слиянии аутофагосом и лизосом, необходимых для клиренса разнообразных белковых агрегатов. Соответственно, разрушение специфических доменов *PLEKHM1* ухудшает распределение пузырьков, секрецию и образование гофрированных краев, тем самым подрывая резорбтивную функцию остеокластов.

У пациента с мутацией с.945G>C в гене *TGFBI* (трансформирующий фактор роста бета 1), ассоциированной с болезнью Камурати-Энгельмана, отмечался умеренный остеопороз наряду с мышечным болевым синдромом.

Болезнь Камурати-Энгельмана (OMIM: 31300), или прогрессирующая диафизарная дисплазия, представляет собой редкую склерозирующую дисплазию костей, характеризующуюся переваливающейся походкой, болью в конечностях, мышечной слабостью и кортикальным утолщением диафизов длинных костей (Cromer et al., 2012; Wallace et al., 2004). Если поражения затрагивают череп, они приведут к повреждению черепных нервов, например к нарушению слуха и потере зрения (Janssens et al., 2006; Van Hul et al., 2019). Некоторые случаи имеют системные проявления или имитируют

некоторые синдромы, сопровождающиеся, например, анемией, лейкопенией и гепатоспленомегалией (Crisp and Brenton, 1982). Известно, что доминантно наследуемые гетерозиготные мутации в *TGFB1* вызывают данное заболевание (Tao et al., 2022). На сегодняшний день во всем мире зарегистрировано 300 случаев с болезнью Камурати-Энгельмана (Baroncelli et al., 2017; Castro et al., 2005; Hughes et al., 2019; Janssens et al., 2000; Janssens et al., 2006; Saraiva, 1997). Диагностика данного заболевания является сложной задачей для клиницистов из-за его редкости и обширных фенотипических вариаций.

У данного пациента была дополнительно выявлена мутация с.148С>Т в гене *SGMS2*, который отвечает за развитие артериальной кальцификации, атеросклероза и остеопороза. *SGMS2* (сфингомиелин синтаза 2) - сфингомиелин, основной компонент клеточных мембран и мембран Гольджи, образуется путем переноса фосфохолина с фосфатидилхолина на церамид с диацилглицерином в качестве побочного продукта. Белок, кодируемый этим геном, представляет собой фермент, катализирующий эту реакцию преимущественно на клеточной мембране. Синтез обратим, и этот фермент может катализировать реакцию в любом направлении. Кодируемый белок необходим для роста клеток (Pekkinen, M. et al., 2019).

Нами также была выявлена мутация с.526G>A в гене *ALOX12B* (арахидонат-12-липоксигеназа) у пациента с такими клиническими признаками, как переломы, ороговение кожного покрова и врожденный гидронефроз.

Мутации в гене *ALOX12B* вызывают самоизлечивающийся коллодиевый ихтиоз. *ALOX12B* и *ALOXE3* кодируют эпидермальные липоксигеназы арахидонат-12-липоксигеназу, т.е. тип 12R (12R-LOX), и липоксигеназу-3 эпидермального типа (eLOX3) соответственно. Липоксигеназы (LOX) представляют собой семейство негемовых железосодержащих диоксигеназ. LOX катализируют оксигенацию субстратов полиненасыщенных жирных кислот, содержащих (Z,Z)-1,4-пентадиеновые структуры (Brash et al., 1999). Дефицит 12R-LOX и eLOX3 нарушает функцию эпидермального барьера и приводит к аномальному развитию кожи.

Аутосомно-рецессивный врожденный ихтиоз (АРВИ) представляет собой основную подгруппу несиндромальных форм врожденного ихтиоза, характеризующихся патологическим ороговением кожи с гиперкератозом, диффузным шелушением и различной степенью эритродермии. АРВИ является редким заболеванием, распространенность которого колеблется от 1:33 000 до 1:300 000. АРВИ имеет разнообразные клинические проявления. На сегодняшний день мутационный спектр охватывает десять генов, кодирующих белки (ферменты, транспортные белки), ответственные за формирование рогового слоя. Подтипы АРВИ традиционно включают ламеллярный ихтиоз (ЛИ) с крупными темными пластинчатыми чешуйками без эритродермии и врожденную ихтиозиформную эритродермию (ВИЭ) с генерализованным мелким шелушением и эритродермией. Хотя ЛИ и ВИЭ считаются двумя отдельными клиническими проявлениями, у пациентов часто проявляются перекрывающиеся признаки. Наиболее тяжелым подтипом АРВИ является ихтиоз Арлекина (ИА), который провоцируется инактивирующими мутациями гена *ABCA12*. Около 70–90% новорожденных с АРВИ рождаются заключенными в пергаментную мембрану, называемую коллодиевой мембраной. Примечательно, что распространенность может быть даже выше, так как из-за иногда легкой клинической картины большинство случаев могут оставаться незарегистрированными. В большинстве случаев отслоение коллодиевой мембраны сопровождается развитием ЛИ или ВИЭ. Около 10–20% пациентов имеют чистую кожу или только легкие симптомы ихтиоза позже, который ранее назывался самоизлечивающимся коллодиевым ихтиозом (Anker et al., 2021).

В гене *ERCC4* нами была идентифицирована мутация с.2395C>T у носительницы с анемией Фанкони, у нее не было выраженных клинических проявлений, что вероятнее всего связано с маленьким возрастом больной (на момент обследования которой было 5 лет).

Ген *ERCC4* (эксцизионная репарация *ERCC4*, каталитическая субъединица эндонуклеазы) кодирует белки, которые связываются с

образованием нуклеазы, которая участвует в репарации ДНК и поддержании стабильности хромосом. Мутации в гене приводят к пигментной ксеродерме или анемия Фанкони— редкому заболеванию, связанному с нестабильностью генома, характеризующееся прогрессирующей недостаточностью костного мозга и предрасположенностью к раку (Bogliolo et al., 2013).

Пациент с мутацией с.342С>А в гене *PTH1R* (рецептор паратиреоидного гормона 1) имел множественные проявления поражения соединительной ткани, такие как разрыв связок коленного сустава, врожденные пороки клапанов сердца, остеопороз и сколиоз, что, в целом, характерно для хондродисплазий. Мутация с.342С>А в гене *PTH1R* является ранее неописанной.

PTH1R представляет собой 7-спиральный трансмембранный рецептор, связанный с G-белком, который активируется при связывании с 2 различными лигандами: паратиреоидным гормоном (ПТГ) и пептидом, родственным паратиреоидному гормону (ПТГрП) (Datta and Abou-Samra, 2009). Известно, что как ПТГ, так и ПТГрП регулируют гомеостаз кальция и метаболизм костей, но они также выполняют другие разнообразные функции (Stewler, 2000). В то время как ПТГ продуцируется исключительно паращитовидными железами, ПТГрП продуцируется несколькими тканями, включая кожу, эндотелий, гладкие мышцы, хондроциты пластинки роста, кости, почки, нейрональные/глиальные ткани и развивающиеся зачатки зубов. В свою очередь, *PTH1R* экспрессируется там, где ПТГ и ПТГрП являются биологически активными, в частности, в остеобластах и клетках почечных канальцев (Lavi-Moshayoff et al., 2010).). ПТГ и ПТГрП имеют только 16% гомологии последовательностей, а гомологичная область находится на N-конце, где, как считается, происходит связывание с рецептором. В то время как ПТГ регулирует системный метаболизм кальция и костей, ПТГрП, вероятно, действует теми же путями, но на локальном уровне (Корниш, 2010). Таким образом, для нормального развития скелета необходима тесная координация экспрессии *PTH/PTHrP/PTH1R*.

Известно, что дефекты этого рецептора являются причиной метафизарной хондродисплазии.

Аутосомно-рецессивные мутации в гене рецептора паратиреоидного гормона (*PTH1R*) вызывают летальные состояния, включая остеохондродисплазию Бломстранда (OMIM: 215045), генетическое заболевание, характеризующееся ускоренным созреванием эндохондральной кости и летальностью. Кроме того, метафизарная хондродисплазия Янсена (OMIM: 156400), энхондроматоз (OMIM: 166000) и синдром Эйкана (OMIM: 600002), все из которых включают хрящевую или скелетную дисплазию, вызываются аутосомно-рецессивными или доминантными мутациями в *PTH1R* (Jobert et al., 1998; Duchatelet et al., 2005; Frazier-Bowers et al., 2014).

В гене *ARSB* у пациента была обнаружена мутация с.454C>T (арилсульфатаза В), у которой отмечался остеопороз и множественные переломы периферических костей.

Н-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза или арилсульфатаза В (*ARSB*) представляет собой сульфогидролазу, которая специфически удаляет 4-сульфатную группу из остатков N-ацетилгалактозамин-4-сульфата, таких как остатки на невозстанавливаемом конце сульфатированного гликозаминогликановые (GAG) цепи хондроитин-4-сульфата (C4S) и дерматансульфата (DS). Этот фермент необходим для деградации этих гликозамингликанов.

Наследственные мутации *ARSB* являются причиной мукополисахаридоза (МПС) VI (синдром Марото-Лами, фенотип MIM номер 253200), который характеризуется накоплением дерматансульфата и хондроитин-4-сульфат (C4S) по всему телу. Проявления включают низкий рост, деформации скелета, гепатомегалию, дыхательную недостаточность, помутнение роговицы, зубные аномалии, снижение ожидаемой продолжительности жизни и нормальный интеллект. (Tobacman and Bhattacharyya, 2022).

Таким образом, обнаруженные нами мутации в генах, которые в настоящее время не признаны ответственными за НО, приводят к развитию заболеваний, которые также ухудшают качество костной ткани и переломы являются вторичными проявлениями основного заболевания.

Среди 13 пациентов, у которых не были найдены мутации, у двух пациентов были выявлены вторичные поражения костной ткани при эндокринологической патологии – заболеваниях щитовидной железы и сахарном диабете I типа, еще у двух были признаки ювенильного остеопороза без системного поражения соединительной ткани. У пяти пациентов в процессе динамического наблюдения диагноз НО не подтвердился, а у четырех пациентов с яркой клинической картиной поражения необходимо продолжить исследования по выявлению молекулярной причины заболевания.

Таким образом, у 9 пациентов диагноз НО был исключен в результате ретроспективного клинического наблюдения в совокупности с отсутствием патогенных изменений в таргетных генах костного метаболизма. Учитывая, что у 7 пациентов выявлены изменения в генах, не описанных в качестве причинных генов НО, они также находятся под динамическим наблюдением клинических генетиков без установленного диагноза НО. Это свидетельствует о необходимости более детального подхода к клиническому этапу диагностики.

3.4. Идентификация сочетанных вариантов мутаций у пациентов с незавершенным остеогенезом

При помощи технологии секвенирования нового поколения нами были идентифицированы сочетанные варианты мутаций.

Выявлены мутация с.2869C>T в гене *COL1A1* и сплайсинговая мутация с.1197+5G>A в гене *COL1A2* у пробанда русской этнической принадлежности с 1 типом НО. Эта же мутация с.1197+5G>A в гене *COL1A2* в сочетании с мутацией с.579delT гена *COL1A1* были выявлены у больного с 1 типом НО татарской этнической принадлежности.

Мутации с.579delT, с.2869C>T гена *COL1A1* и с.1197+5G>A гена *COL1A2* ранее были описаны у пациентов с НО и являются патогенными (Swinnen et al., 2009; Zhang et al., 2011; Fuccio et al., 2011; Venturi et al., 2006; Lindahl et al., 2015; 107ine t al., 2015; Rolvien et al., 2018; Zhytnik et al. 2019; Nicholls et al., 1996; Marini et al., 2007; Ries-Levavi et al., 2004). У пациента русского происхождения с IV типом НО была выявлена сочетанная мутация с.2971G>C в гене *COL1A1* и с. 212G>C, p.S71T в гене *FGF23* (таблица 23).

Мутация с.579delT (p.Gly194Valfs) была найдена у двух неродственных пробандов 2002 г.р. и 1995 г.р. У обоих пациентов наблюдались голубые склеры, множественные деформации, гипермобильность суставов. У одного пациента дополнительно обнаружены брахицефалия и несовершенный дентиногенез. Это изменение последовательности создает сигнал преждевременной остановки трансляции (p.Gly194Valfs) в гене *COL1A1*. Данная мутация с.579delT была описана 25 раз в базе данных по НО и выявлена в популяциях испанцев, итальянцев, шведов, украинцев, китайцев и тайванцев (Swinnen et al., 2009; Zhang et al., 2011; Fuccio et al., 2011; Venturi et al., 2006; Lindahl et al., 2015; 107ine t al., 2015; Rolvien et al., 2018; Zhytnik et al. 2019). Данная мутация приводит к 1 типу НО с относительно легким течением заболевания.

Таблица 23 – Клинико-генетическая характеристика пациентов с сочетанными вариантами мутаций

№	Пациент	Мутация 1	Мутация 2	Тип наследования	Возраст	Тип НО	Пол	Голубые	Переломы
1	23	<i>COL1A1</i> с.2869C>T, р.Gln957*	<i>COL1A2</i> с.1197+5G>A	AD	17	1	ж	+	14
2	6	<i>COL1A1</i> с.579delT, р.Gly194Valfs	<i>COL1A2</i> с.1197+5G>A	<i>de novo</i>	19	1	м	+	33
3	38	<i>COL1A2</i> с.2971G>C, р.Gly991Arg	FGF23 с.212G>C	AD	58	4	м	-	-

3.5 Анализ полиморфных вариантов с неизвестной клинической значимостью в таргетных генах

В процессе идентификации патогенных вариантов в генах, вовлеченных в патогенез НО, нами обнаружены 14 полиморфных вариантов в генах *COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*, которые представляют определенный интерес для анализа их частоты и распространенности. Четыре из них расположены в промоторных регионах генов: два в гене *COL1A2* (rs140452715, rs151000015), два – в гене *IFITM5* (rs57285449, rs56069858); пять – в экзонах, три из них в гене *COL1A1* (rs72645362, rs762042426, rs1906604888), два в гене *COL1A2* (rs58882596, rs42524); четыре – в интронных областях, один из них в гене *COL1A1* (rs193922146), три – в гене *COL1A2* (rs189041834, rs111331487, rs141980217), один – в гене *P3H1* (rs371232413).

3.5.1 Изучение спектра и частоты полиморфных вариантов в гене *COL1A1*

В гене *COL1A1* выявлено 4 вариантов изменений нуклеотидной последовательности с неустановленной клинической значимостью, для которых был проведен сравнительный анализ распределения частоты минорного аллеля у пациентов с НО из Республики Башкортостан с международными базами данных.

Нами был идентифицирован ранее описанный вариант rs72645362 (с.1045G>T, р.Val349Phe) в гене *COL1A1*. В нашей выборке данный вариант встретился у одного пациента. Данный вариант описан в литературе у двух пациентов с незавершенным остеогенезом и у одного пациента с синдромом Элерса-Данло. Лocus расположен в 16 экзоне гена *COL1A1* и приводит к замене валина на фенилаланин в 349 положении в С-терминальном регионе белка и может привести к нестабильности тройной спиральной структуры коллагена. Однако, при данном изменении в гетерозиготном состоянии часть пула мономеров проколлагена альфа-1 может быть правильной и формировать

правильно уложенные тройные спиральные мономеры проколлагена, поэтому расценивается как вариант с неизвестным клиническим значением (Witecka et al., 2008). Согласно исследованию Witecka, у пробанда 25% молекул коллагена показали снижение термостабильности, что может говорить о том, что при данном типе изменения мутируют сразу 2 цепи коллагена альфа-1. Компьютерное моделирование свойств цепи коллагена альфа-1 вокруг области мутации и последующее моделирование с созданием линейной модели заполнения пространства выявило заметное изменение этой области по сравнению со структурами альфа- и бета-поворота и спиральной пептидной цепи, которые несомненно, ставят под угрозу или полностью отменяют формирование правильной тройной спирали, приводя в этой части коллагена к образованию пухов. Данная мутация в обоих случаях – у пробанда и его отца – была в гетерозиготном состоянии, поэтому у пациента также образовывались и правильно уложенные спиральные мономеры коллагена.

Вариант rs72645362 (с.1045G>T) в гене *COL1A1* обнаружен нами у пробанда мужского пола, 2001 года рождения, пациент имеет в анамнезе 7 переломов. У него голубые склеры, выраженная гипотония и гипермобильность суставов, кифосколиотическая деформация позвоночника и килевидная деформация грудной клетки – 1 стадия. Также у пациента имеется правосторонний грудно-поясничный сколиоз 1 степени. Фенотип соответствует НО типа I, других патогенных изменений в генах, вовлеченных в метаболизм соединительной ткани, у него не обнаружено. Учитывая, что обнаруженный вариант не имеет доказанную патогенную значимость, продолжается поиск молекулярной причины заболевания.

Нами был идентифицирован полиморфный вариант rs193922146 (с.2236-17C>G) в гене *COL1A1*. В нашей выборке данный вариант встретился у одного пациента. Данный вариант описан у двух пациентов с незавершенным остеогенезом и как случайная находка при полногеномном секвенировании у двух людей. В ClinVar нет функциональных доказательств для этого варианта и ему присвоен статус «неопределенного значения»

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000029564/>, 12.01.2023). У нашего пациента мужского пола, 1997 года рождения, в анамнезе более 5 переломов, низкий рост и множественные скелетные деформации – грудная клетка, бедра, выражены лобные бугры. Наблюдаются голубые склеры и череп гидроцефальной формы. Других патогенных вариантов в таргетных генах у него не обнаружено.

Нами был идентифицирован полиморфный вариант rs1906604888 (с.3531+3A>T) в гене *COL1A1*. В нашей выборке данный вариант встретился у одного пациента. Это изменение последовательности приходится на интрон 47 гена *COL1A1*. Он напрямую не изменяет аминокислотную последовательность белка *COL1A1*, но влияет на нуклеотид в консенсусном сайте сплайсинга интрона. Этот вариант отсутствует в популяционных базах данных (ExAC), описан у пациента с незавершенным остеогенезом типа I. Нуклеотидные замены в консенсусном сайте сплайсинга являются относительно частой причиной aberrантного сплайсинга (Buratti et al., 2007, Zhang et al., 1998). Алгоритмы, разработанные для предсказания влияния изменений последовательности на сплайсинг РНК, предполагают, что этот вариант может нарушать консенсусный сайт сплайсинга, но это предсказание не было подтверждено опубликованными исследованиями транскрипции, что не позволяет определить роль этого варианта в патогенезе заболевания. Поэтому он был классифицирован как вариант неопределенного значения.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV001232603/>, 12.01.2023). У пациента женского пола, 2010 года рождения, у которой был обнаружен полиморфный вариант rs1906604888 в гене *COL1A1*, было более 5 переломов, молекулярная причина заболевания не установлена, находится под наблюдением врача-генетика.

Нами был идентифицирован полиморфный вариант rs762042426 (с.4149C>T) в гене *COL1A1*. В нашей выборке данный вариант встретился у одного пациента. В базе данных SNP зарегистрирован 1 случай данного варианта у индивида из Южной Азии при экзомном секвенировании. Данный вариант не

описан в ClinVar, однако, VarSome предсказывает данный вариант как «вероятно доброкачественный» (<https://varsome.com>, 12.01.2023). У нашего пациента голубые склеры, низкий рост, микроглия, гипермобильность локтевых и коленных суставов, щелочная фосфатаза выше нормы, изменений нуклеотидной последовательности с установленным патогенным эффектом не идентифицировано.

Все полиморфные варианты с неизвестной клинической значимостью, найденные в гене *COL1A1*, указаны в таблице 24.

Таблица 24 – Полиморфные варианты с неизвестной клинической значимостью в гене *COL1A1*, выявленные у пациентов с НО из РБ

№ п/п	Локус	Ген	Клиническая значимость
1	rs72645362 (c.1045G>T, p.Val349Phe)	<i>COL1A1</i>	Неизвестная
2	rs193922146 (c.2236-17C>G, p.Ala1075=)	<i>COL1A1</i>	Неизвестная
3	rs1906604888 (c.3531+3A>T)	<i>COL1A1</i>	Неизвестная
4	rs762042426 (c.4149C>T, p.Asn1383=)	<i>COL1A1</i>	Вероятно доброкачественная

Таким образом, выявленные полиморфные варианты представляют интерес для дальнейшего анализа их функциональной значимости при НО.

3.5.2 Изучение спектра и частоты полиморфных вариантов в гене *COL1A2* у пациентов с незавершенным остеогенезом

В гене *COL1A2* было идентифицированы 7 полиморфных вариантов, которые не соответствовали критерию «патогенный», но вызвали определенный интерес из-за различий в распространенности в популяциях мира по сравнению с нашими данными.

Нами был идентифицирован интронный вариант rs140452715 (с.70+674A>G в гене *COL1A2*), который в нашей выборке встретился у трех пациентов. Частота данного варианта в среднем по миру составляет 0,2% (G), варьируя в разных регионах мира от 0 до 3% в популяции финнов, которая прошла через «бутылочное горлышко», когда численность упала до очень маленького размера, а в последствии восстановилась, что привело к сокращению генетического разнообразия и дрейфу генов. Кроме финнов, вариант с.70+674A>G обнаружен у 1 человека из Пуэрто-Рико и 1 человека из Италии. Данный вариант ClinVar описывает как «вероятно доброкачественный» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000831949/>, 12.01.2023).

Нами был идентифицирован интронный вариант (с.1765-109T>G в гене *COL1A2*) rs189041834 у одного пациента, у которого также выявлена мутация в гене *PLEKHM1*, ответственного за другое заболеваний костной ткани – остеопетроз. Частота данного варианта по миру составляет <1%, выявлен один случай в Колумбии и 3 случая в Финляндии. Данный вариант ClinVar описывает как «вероятно доброкачественный» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV001587974/>, 12.01.2023).

Нами был идентифицирован интронный вариант rs111331487 (с.1558-135C>T в гене *COL1A2*), который в нашей выборке встретился у одной пациентки. Частота данного варианта по миру составляет <1% (G): в Африке – 0,005, единичные варианты обнаружены в Барбадосе, Гамбии, Кении, Нигерии, 1 случай у Мексиканцев, 7 – в Европе (Испания – 3, Италия – 1, американцы

европейского происхождения – 3), по одному случаю в Пакистане и Бангладеш. Данный вариант ClinVar описывает как «вероятно доброкачественный» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000839531/>, 12.01.2023). У нашей пациентки выявлен V тип НО с установленной мутацией в гене *IFITM5* в сочетании с мутацией в гене *LAMB3*, у нее наблюдается стертая клиническая картина V типа заболевания, вероятно, обусловленная множеством модифицирующих генетических факторов, в число которых может входить и вариант с.1558-135C>T в гене *COL1A2*.

Идентифицирован вариант rs151000015 (с.70+804T>C в гене *COL1A2*), который в нашей выборке встретился у трех пациентов. Частота данного варианта по миру составляет <1% (С). Данный вариант встретился в Пуэрто-Рико – 1, в Италии – 1 случай и 6 случаев в Финляндии. Данный вариант ClinVar описывает как «вероятно доброкачественный» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000831950/>, 12.01.2023). Учитывая высокую его частоту, необходимо провести поиск этого изменения в популяциях коренных народов Республики Башкортостан.

Нами был идентифицирован интронный вариант rs141980217 (с.279+149T>C) в гене *COL1A2*. В нашей выборке данный вариант встретился у двух пациентов. Частота встречаемости данного варианта по миру 1%. Всего известно 30 случаев по миру. В популяциях Африки – 1 (0,01%) – у афроамериканца. В популяциях Европы – 19 (1,9%) (популяция Юты в Северной и Западной части в популяциях Европы – 2, Финляндия – 6, Британцы из Англии и Шотландии – 3, Испания – 5, Италия – 3). В популяциях Южной Азии – 10 (1%) (индейцы Гуджарати в Америке – 3, индейцы Телугу в Великобритании – 2, Пакистан – 4, Шри-Ланка – 1). Данный вариант в базе ClinVar описан как «вероятно доброкачественный» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV001575201/>, 12.01.2023).

Нами также идентифицированы два частых варианта – rs42524 (с.1645C>G, p.Pro549Ala) и rs58882596 (с.3106-56_3106-55del) в гене *COL1A2*.

Полиморфный вариант rs42524 (с.1645C>G, р.Pro549Ala) в нашей выборке встретился у 96% пациентов, частота минорного аллеля составила 48%, тогда как в популяциях мира его частота составляет 18%, самая высокая частота наблюдается в Европе – 24%. Этот вариант считается вероятным доброкачественным или доброкачественным из-за популяционной частоты, несовместимой с болезнью. Учитывая высокую его частоту в выборке наших пациентов, необходимо провести поиск этого изменения в популяциях коренных народов Республики Башкортостан.

Вариант rs58882596 встретился у 80% пациентов, частота в мире варьирует в зависимости от варианта аллеля delAAA / delAA / delA / dupA / dupAAA. В нашем случае идентифицирован вариант с.3106-56_3106-55del, в литературе очень мало данных про функциональную значимость этого полиморфного локуса, анализ в предсказательных программах *in silico* предполагает «вероятно доброкачественную» значимость. Необходимы дальнейшие исследования.

Частота полиморфных вариантов гена *COL1A2* с неустановленной клинической значимостью есть в таблице 25.

Таблица 25 – Частота полиморфных вариантов гена *COL1A2* с неустановленной клинической значимостью у пациентов с НО из РБ и в популяциях мира

№ п/п	Локус	Ген	Частота MAF у пациентов	Частота MAF в мире	Клиническая значимость
1	rs140452715 с.70+674A>G	<i>COL1A2</i>	0,075	В среднем 0,002, у финнов 0,03	Вероятно доброкачественная
2	rs189041834 с.1765-109T>G	<i>COL1A2</i>	0,025	<0,01	Вероятно доброкачественная
3	rs111331487 с.1558-135C>T	<i>COL1A2</i>	0,075	<0,01	Вероятно доброкачественная
4	rs151000015 с.70+804T>C	<i>COL1A2</i>	0,075	0,002	Вероятно доброкачественная
5	rs141980217 с.279+149T>C	<i>COL1A2</i>	0,05	0,01	Вероятно доброкачественная
6	rs58882596 с.3106-56_3106-55del	<i>COL1A2</i>	0,40	От 0,01 до 0,60	Вероятно доброкачественная
7	rs42524 с.1645C>G, р.Pro549Ala	<i>COL1A2</i>	0,48	0,178	Вероятно доброкачественная

3.5.3. Изучение спектра и частоты полиморфных вариантов с неизвестной клинической значимостью в генах *P3H1* и *IFITM5*

В гене *P3H1* были найден полиморфный вариант rs371232413 (с.1720+4G>A) у одного пациента мужского пола, 1999 года рождения, в анамнезе более 5 переломов, зубы с прозрачной эмалью. Это изменение последовательности приходится на интрон 11 гена *P3H1*. Он напрямую не изменяет аминокислотную последовательность белка *P3H1*. Он влияет на нуклеотид в консенсусном сайте сплайсинга. Этот вариант не описан в литературе у лиц, страдающих заболеваниями, связанными с *P3H1* и выявлены в единичных случаях при скрининговых исследованиях популяций. Варианты, которые нарушают консенсусный сайт сплайсинга, являются относительно частой причиной aberrантного сплайсинга. Алгоритмы, разработанные для предсказания влияния изменений последовательности на сплайсинг РНК, предполагают, что этот вариант вряд ли повлияет на сплайсинг РНК. Таким образом, имеющихся данных в настоящее время недостаточно для определения роли этого варианта в заболевании.

Нами был идентифицирован полиморфный вариант с.-96T>C (rs56069858) в гене *IFITM5*. В нашей выборке данный вариант встретился практически у всех пациентов. Частота встречаемости данного варианта в среднем по миру составляет 0,49, варьируя от 0,29 в Европе до 0,81 в популяциях Юго-Восточной Азии. В базе ClinVar данный вариант описан как «вероятно доброкачественный», учитывая популяционные различия и наличие мутации в промоторном регионе гена *IFITM5*, ответственном за v тип НО, представляется интересным оценить частоту данного варианта в популяциях РБ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000834213/>, 12.01.2023).

Нами был идентифицирован полиморфный вариант rs57285449 (с.80G>C, p.Gly27Ala,) в гене *IFITM5*. Частота данного варианта сопоставима со средними значениями его частоты в популяциях мира, несмотря на изменение аминокислотной последовательности белка. Самая высокая частота наблюдается

в европейских популяциях – 0,65, реже встречается в Юго-Восточной Азии – 0,37. В популяциях России данный вариант не анализировался. Учитывая, что ген *IFITM5* является малоизученным при незавершенном остеогенезе, наши результаты по частоте встречаемости различных вариантов гена вносят вклад в расширение базы данных.

Частоты полиморфных вариантов в генах *P3H1* и *IFITM5* с неизвестной клинической значимостью указаны в таблице 26.

Таблица 26 – Частота полиморфных вариантов генов *P3H1* и *IFITM5* с неизвестной клинической значимостью у пациентов с НО из Республики Башкортостан и в популяциях мира

№ п/п	Локус	Ген	Частота у пациентов НО	Частота в мире	Клиническая значимость
1	rs371232413 с.1720+4G>A	<i>P3H1</i>	1 пациент	<0,01	Неизвестная
2	rs56069858 с.-96T>C	<i>IFITM5</i>	0,525	0,49	Вероятно доброкачественная
3	rs57285449 с.80G>C, p.Gly27Ala	<i>IFITM5</i>	0,4	0,41	Вероятно доброкачественная

Таким образом, полученные нами данные по частотам полиморфных вариантов с неустановленной функциональной значимостью при незавершенном остеогенезе расширяют представление о генетических вариантах таргетных генов, вовлеченных в патогенез заболевания.

3.6. Разработка алгоритмов диагностики незавершенного остеогенеза

Полученные нами результаты показали, что для большинства пациентов с незавершенным остеогенезом из Республики Башкортостан характерны патогенные изменения в двух генах коллагена первого типа *COL1A1* и *COL1A2*, кодирующих цепи альфа-1 и альфа-2, что согласуется с общемировыми тенденциями, однако для пациентов изученного региона характерен свой уникальный спектр мутаций и высокий процент случаев *de novo*. Учитывая наличие приборного парка, специалистов и контрольных образцов с известными мутациями, нами было принято решение внедрить таргетное NGS секвенирование для этих двух генов для молекулярно-генетической диагностики незавершенного остеогенеза. По нашему запросу таргетная панель праймеров для генов *COL1A1* и *COL1A2* (Prep&Seq™ U-panel OI300-1) разработана и произведена ООО «ПАРСЕК ЛАБ».

Панель праймеров включает все кодирующие регионы и сайты сплайсинга генов *COL1A1* и *COL1A2* (таблица 27).

Таблица 27 - Панель праймеров Prep&Seq™ U-panel OI300

Панель	Prep&Seq™ U-panel OI300-1
Целевые регионы	CDS и сайты сплайсинга генов <i>COL1A1</i> и <i>COL1A2</i>
Число генов	2
ПО для дизайна панели	TOR v1.3-dev
Число пулов	2
Число ампликонов (пул 1 + пул 2)	129 (64 + 65)
Диапазон длин ампликонов	125–324 п.н.
Диапазон длин ампликонов VID	242–324 п.н.
Геном	Homo sapiens (hg38)
Совместимые платформы	Illumina, Ion Torrent, MGI

Таргетная панель обладает рядом следующих характеристик: идентифицирует клинически-значимые варианты, а также редкие и ранее неизвестные варианты; имеет ссылки на внешние источники аннотации; есть автоматический контроль качества образца, включая определение пола и контаминацию, и гибкий поиск.

Панель праймеров не содержит адаптерные последовательности, поэтому может использоваться с любой совместимой платформой для секвенирования при условии использования соответствующей пробоподготовки. Панель праймеров Prep&Seq™ U-panel OI300-1 (гены *COL1A1* и *COL1A2*) содержит урацил-содержащие праймеры и совместима с Системой модулей Prep&Seq™ U-target (ООО «ПАРСЕК ЛАБ»), предназначенной для создания библиотек ампликонов, совместимых с платформами для секвенирования Illumina, Ion Torrent и MGI, для последующего высокопроизводительного секвенирования, а также с линейками реагентов AmpliSeq (Thermo Fisher Scientific) и AmpliSeq for Illumina (Illumina).

В пулы праймеров включены биологические идентификаторы (BID) – это дополнительная панель, состоящая из 13 пар праймеров на высокополиморфные участки генома. Биологические идентификаторы позволяют осуществлять контроль качества и определять уникальную природу каждого образца в запуске секвенирования (гаплотип по биологическим идентификаторам); контаминацию образца; родство на уровне родитель-ребенок; идентичные образцы с различным идентификатором; пол образца.

Длина прочтения при секвенировании библиотек на платформе Illumina MiSeq System составила 300 циклов в режиме одно-концевых прочтений.

Расчетная глубина покрытия не менее 500 и не менее 193500 прочтений на образец.

Как и для других панелей для NGS, существует ряд ограничений;

- детектируются только герминативные мутации;

- детекция генетических вариантов возможна только в пределах таргетных регионов;

- детекция протяженных треков из коротких тандемных повторов (STR) и гомополимерных вариантов невозможна;

- детекция CNVs невозможна;

- в некоторых случаях пациент может быть носителем редкой или возникшей *de novo* мутации, попадающей на сайт посадки праймера. Это может привести к ложноположительным или ложноотрицательным результатам ввиду подавления амплификации данного региона.

Обработка полученных результатов проводится с использованием программного обеспечения VariFind, который исполнен в виде web-приложения, доступ к которому осуществляется путем авторизации на сайте <https://varifind.parseq.pro>.

Программа обладает следующими функциональными возможностями:

- импорт “сырых” прочтений и метаданных секвенирования;

- удаление последовательностей адаптеров и низкокачественных оснований по краям прочтений;

- удаление из прочтений последовательностей праймеров для таргетного обогащения;

- выравнивание прочтений на референсный геном GRCh37 (hg19);

- автоматическая оценка метрик качества;

- идентификация пола образца;

- идентификация контаминации;

- идентификация и аннотация генетических вариантов;

- экспорт результатов.

Аннотация включает номенклатуру HGVS, ссылки на общие и популяционные базы данных.

Результаты анализа, доступные для экспорта, включают следующие файлы:

- выравнивания на референсный геном в формате BAM и индекс в формате BAI,
- идентифицированные варианты в формате VCF,
- результаты анализа покрытия в форматах TSV и JSON,
- отчет в формате PDF.

Анализ и хранение данных осуществляются в “облачной” вычислительной инфраструктуре.

Данный набор показал свою высокую чувствительность и специфичность при анализе контрольных образцов с идентифицированными мутациями и будет использоваться для ДНК диагностики незавершенного остеогенеза с последующей валидацией выявленных изменений методом секвенирования по Сэнгеру.

Кроме этого, при отсутствии патогенных изменений в генах коллагена I типа (*COL1A1* и *COL1A2*), рекомендуется провести анализ мутации с.-14С>Т в гене *IFITM5*, даже при отсутствии выраженной клинической манифестации НО типа V. Если мутации не идентифицированы, пациент должен находиться под динамическим наблюдением у врача генетика в течение нескольких лет, при нарастании клинических проявлений заболевания, рекомендуется экзомное секвенирование.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, НО является тяжелым наследственным заболеванием с частыми переломами, которые приводят к инвалидизации пациентов.

Исследование заболевания осложняется из-за его клинической и генетической гетерогенности.

Определение мутаций, вызывающие заболевание, полезно пациентам с клиническим диагнозом «незавершенный остеогенез», поскольку оно дает информацию о риске рецидива в семье и позволяет идентифицировать пораженных членов семьи.

В последнее десятилетие произошел значительный скачок в изучении генетических причин НО, накопились знания о молекулярных механизмах, лежащих в основе заболевания за счет открытия новых генов, дефекты которых обуславливают его развитие.

Фундаментальное понимание механизмов, лежащих в основе патогенеза НО, улучшает диагностику пациентов и необходимо для разработки алгоритма ДНК-диагностики и лечения заболевания.

Проведенное исследование по поиску патогенных вариантов генов, приводящих к развитию незавершенного остеогенеза (НО) и определение молекулярной гетерогенности заболевания в Республике Башкортостан (РБ) позволило идентифицировать молекулярную причину заболевания у 58,7% пациентов.

В нашем исследовании семейные случаи заболевания составили 30,5%.

В генах *COL1A1* и *COL1A2* было найдено всего 31 патогенная мутация. Доля патогенных вариантов в генах *COL1A1* и *COL1A2* составила 93,9% в нашей выборке пациентов.

В гене *COL1A1* было найдено 19 патогенных изменений, 16 из которых являются мутациями гаплонедостаточности и составили 84,2% от общего числа обнаруженных мутаций в данном гене (n=16/19). В гене *COL1A2* было найдено 12 патогенных изменений, из которых 10 мутаций нарушают структуру

трехцепочечной молекулы коллагена I типа. Их доля от общего числа найденных в данном гене мутаций составила 83,3% (n=10/12)

В гене *COL1A1* всего нами было идентифицировано 9 нонсенс – мутаций, 5 мутаций сдвига рамки считывания, 3 миссенс-мутации, 2 мутации сайта сплайсинга, а в гене *COL1A2* – 10 миссенс-мутаций и 2 сайта сплайсинга.

В двух генах коллагена I типа 10 мутаций были выявлены впервые и не встречаются в известных базах данных (gnomAD, Ensemble, ClinVar и т.д.).

Все выявленные мутации являются уникальными кроме трех патогенных вариантов с.3076C>T, с.1265G>C, с.579delT в гене *COL1A1*, каждая из которых встретила в двух неродственных семьях пациентов татарской этнической принадлежности.

Обнаружено, что в семьях с мутациями с.579delT, с.967G>T, с.1354-12G>A в гене *COL1A1* наблюдались одинаковые клинические проявления I типа НО у пробандов и их родителей. В семье с мутацией с.3034G>A в гене *COL1A2* наблюдался 3 тип НО (у пробанда и его матери). В другой семье мутация с.3977A>G привела к проявлению 4 типа НО у пробанда и его родителя.

Помимо семейных случаев со схожими признаками заболевания, были выявлены единичные мутации в семьях, в которых симптомы болезни отличались у её членов. Например, мутации с.1081C>T, с.2869C>T в гене *COL1A1* и с.1826G>A, с.2756G>A с.2971G>C в гене *COL1A2* приводили к тяжелому типу НО у пробанда, а у родителей болезнь никак не проявлялась.

Таким образом, обнаружена клиническая гетерогенность заболевания при одинаковом генетическом дефекте, что, вероятно, связано с существованием модифицирующих факторов, в том числе генетических, что еще предстоит выяснить.

В гене *P3H1*, который участвует в посттрансляционной модификации коллагена, нами обнаружена мутация с.1051G>T (p.Glu351*) у больного мужского пола башкирской этнической принадлежности. Данная мутация выявлена впервые.

В гене *IFITM5* идентифицирована мутация с.-14С>Т у трех неродственных пациентов. У всех пациентов мутация возникла *de novo*. У двух пациентов наблюдали все клинические признаки НО, характерные для данного типа: кальцификация межкостной мембраны, смещение головки лучевой кости, деформации голеней, бедренных костей и коленных суставов. У одного пациента русской этнической принадлежности мы выявили одновременно 2 мутации: одну в гене *IFITM5*, который является причинной мутацией НО V типа, и другую – с.1903С>Т (р.Arg635*) в гене *LAMB3*, отвечающая за проявление буллезного эпидермолиза. Сочетанного носительства мутаций в генах *IFITM5* и *LAMB3* в литературе не описано.

В процессе идентификации патогенных вариантов в генах, вовлеченных в патогенез НО, нами обнаружены 14 полиморфных вариантов в генах *COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*, которые представляют интерес для дальнейшего анализа.

У 7 пациентов были идентифицированы мутации в гетерозиготном состоянии в 8 генах *CLCN7*, *ALOX12B*, *PLEKHM1*, *ERCC4*, *ARSB*, *PTH1R*, *TGFBI*, *SGMS2*, которые вовлечены в патогенез других заболеваний. У всех пациентов отмечались низкотравматичные переломы.

Так как молекулярные дефекты в 93,9% случаев заболевания встречаются в генах *COL1A1* и *COL1A2*, кодирующих цепи альфа-1 и альфа-2 коллагена первого типа, создана таргетная панель для высокопроизводительного секвенирования нового поколения, включающая эти два гена для поиска патогенных изменений у пациентов с НО.

Таким образом, проведенные нами исследования, направленные на идентификацию патогенных вариантов при НО, не только позволяют определить спектр и частоты мутаций в изучаемых популяциях, но также вносят понимание в гено-фенотипические корреляции при заболевании. Мутации, уже описанные у больных с НО, позволяют предотвратить рождение больных детей вотягощенных семьях.

ВЫВОДЫ

1. Молекулярный дефект заболевания идентифицирован у 58,7% пациентов с незавершенным остеогенезом. Патогенные изменения нуклеотидной последовательности выявлены в 4 генах, вовлеченных в патогенез незавершенного остеогенеза.

2. Обнаружен 31 патогенный вариант изменений нуклеотидной последовательности в двух генах коллагена I типа (*COL1A1* и *COL1A2*), 10 из которых ранее не были описаны в литературе, что составило 93,9% от всех выявленных патогенных изменений в генах, вовлеченных в развитие незавершенного остеогенеза.

3. Все выявленные мутации в генах коллагена I типа являются уникальными кроме трех патогенных вариантов с.3076C>T, с.1265G>C, с.579delT в гене *COL1A1*, каждая из которых идентифицирована в двух неродственных семьях пациентов татарской этнической принадлежности.

4. Обнаружена ранее неописанная мутация с.1051G>T (p.Glu351*) в гене пролил-3-гидроксилаза-1 (*P3H1*) у пациента башкирской этнической принадлежности.

5. Идентифицирована мутация с.-14C>T в гене *IFITM5* у трех неродственных пациентов с V типом незавершенного остеогенеза.

6. Выявлены мутации в генах *CLCN7*, *ALOX12B*, *PLEKHM1*, *ERCC4*, *ARSB*, *PTH1R*, *TGFB1*, *SGMS2*, не описанных в качестве причинных генов незавершенного остеогенеза.

7. Оптимизирован алгоритм ДНК диагностики незавершенного остеогенеза с разработкой таргетной NGS панели на основе анализа двух генов коллагена первого типа, кодирующих цепи альфа-1 и альфа-2 (*COL1A1* и *COL1A2*).

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
НО	Незавершенный остеогенез
МПКТ	Минеральная плотность костной ткани
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ЭР	Эндоплазматический ретикулум
NGS	Секвенирование нового поколения
MAF	Частота редкого аллеля
chr	Хромосома

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аганов Д.С. Роль цитокиновой системы RANKL/RANK/OPG в регуляции минерального обмена костной ткани / Д.С. Аганов, В.В. Тыренко, Е.Н. Цыган, и др. // Гены и клетки. - 2014. – Т.9 - № 4. - С. 50–52.
2. Алимова Х. П. Случай несовершенного остеогенеза / Х. П. Алимова, Г. Ш. Хамраева, Г. С. Нуралиева, Ф. З. Мансурова, А. Х. Рахимов // Вестник экстренной медицины. - 2019. – Т.12. - №2. – С. 100-103.
3. Багрова, С.Г. Использование остеомодифицирующих агентов - №ома для профилактики и лечения патологии костной ткани при злокачественных новообразованиях / С.Г. Багрова, М.В. Копп, С.И. Кутукова, и др. // Злокачественные опухоли. - 2019. - Т. 9. - № 352 . – С. 576-584. doi: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-38
4. Балычевцева И.В. Случай несовершенного остеогенеза -клиническое наблюдение. / И.В. Балычевцева, С.Г. Гадецкая // Здоровье ребенка. – 2008 - №4. - С. 126-128.
5. Бурцев М.Е. Современный подход к диагностике и лечению детей с несовершенным остеогенезом / М.Е. Бурцев, А.В. Фролов, А.Н. Логвинов, и др. // Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. - 2019. - Т. 7. - №2. - С. 87-102.
6. Войтович Т.Н. Несовершенный остеогенез / Т.Н. Войтович, Е.А. Баранаева, Ж. А. Безлер, М.В. Чанчикова // Медицинский журнал. - 2009. – Т. 28- №2. - С. 138- 140.
7. Гребенникова Т.А. Канонический сигнальный путь Wnt/ β -катенин: от истории открытия до клинического применения / Гребенникова Т.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А. // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88. – №10. – С. 74–81.
8. Зарипова А.Р. Современная классификация и молекулярно-генетические аспекты незавершенного остеогенеза / Зарипова А.Р., Хусаинова Р.И. // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2020. - Т. 24. - № 2. - С.219-227. doi: 10.18699/VJ20.614

9. Мазуренко, С.О. Искусство лечения остеопороза : бисфосфонаты / С.О. Мазуренко. // Современная ревматология. - 2012 - Т.6. –№1 – С.49-56.
10. Мамедова Е.О. Антитела к склеростину как новая анаболическая терапия остеопороза. / Е.О. Мамедова, Т.А. Гребенникова, Ж.Е. Белая, Л.Я. Рожинская // Остеопороз и остеопатии. – 2018. - Т.21. -№3. – С. 21-29. doi: 10.14341/osteo10127
11. Надыршина, Д.Д. Эпидемиологическое и молекулярно-генетическое исследование несовершенного остеогенеза : диссертация кандидата биологических наук : 03.02.07 / Надыршина Дина Даяновна. – V. [Место защиты: Ин-т биохимии и генетики Уфим. науч. центра РАН].- Уфа, 2011.- С. 167.
12. Рудой А. С. Tgf-beta-зависимый патогенез синдрома Марфана и родственных наследственных нарушений соединительной ткани / А. С. Рудой. // 2009. - Т.15. - №2. – С.223-226. doi: 10.18705/1607-419X-2009-15-2-223-226
13. Рябых С.О. Несовершенный остеогенез: современные аспекты этиологии, патогенеза, классификации - №систематический обзор / С.О. Рябых, Д.А. Попков, Е.Н. Щурова, П.В. Очирова, Т.В. Рябых// Гений ортопедии. - 2021. – Т. 27. - №4. – С. 453-460.
14. Сорокина В. А. Клинический случай синдрома Бролика - №несовершенного остеогенеза II типа у девочки / В. А. Сорокина, Р. О. Цуцаев, Т. М. Вдовина и др. // Вестник молодого ученого. – 2017. – Т. 16. – № 1. – С. 49-56.
15. Яхяева Г.Т. Несовершенный остеогенез у детей в российской федерации: результаты аудита федерального регистра / Г.Т. Яхяева, Л.С. Намазова-Баранова, Т.В. Маргиева, О.В. Чумакова // Педиатрическая фармакология. – 2016 – Т. 13. - №1. – С. 44-48.
16. Adair-Dighton, C. Four generations of blue sclerotic / C. Adair-Dighton // Ophthalmoscope - 1912. - №10. - P.188-189.
17. Ali TM. The recurrent homozygous translation start site variant in CCDC134 in an individual with severe osteogenesis imperfecta of non-Moroccan ancestry / Ali TM, Linnenkamp B., Yamamoto GL, et al. // Am J Med Genet A. – 2022 -V.188- №5. – P.1545-1549. doi:10.1002/ajmg.a.62651.

18. Anker, P., Report of a Novel *ALOX12B* Mutation in Self-Improving Collodion Ichthyosis with an Overview of the Genetic Background of the Collodion Baby Phenotype / Anker, P., Kiss, N., Kocsis, I et al. // *Life* - №Basel, Switzerland. -2021. – V.11. – P. 624. doi:10.3390/life11070624
19. Arantes C. Osteogenesis imperfecta type III: Oral, craniofacial characteristics and atypical radiographic findings oral / Arantes C, Sica I, Bezerra M. et al. // *J Clin Exp Dent*. 2021. - V.13. - №10. - P.e1053-e1056. doi:10.4317/jced.58263
20. Axmann, E. Murkwürdige Fragilität der Kknochen ohne dyskrasische ursache als Krankhafte Eigenthümlichkeit dreier Geschwister / E. Axmann // *Annalen Geschichte Heilkunde*. – V. 4. – P. 58-68.
21. Baljet, B. Aspects of the history of osteogenesis imperfecta - №Vrolik's syndrome / B. Baljet // *Ann Anat*. –2002. – V. 187. - №1. – P.1-7. doi: 10.1016/S0940-9602- №0280023-1
22. Barnes A.M. Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta / Barnes AM, Chang W, Morello R. et al. // *N Engl J Med*. – 2006. – V.355. – P. 2757–2764. doi: 10.1056/NEJMoa063804.
23. Barnes AM. Kuskokwim syndrome, a recessive congenital contracture disorder, extends the phenotype of FKBP10 mutations / Barnes AM, Duncan G, Weis M, et al. // *Hum Mutat*. – 2013. – V.34. - № 9. – P.1279-1288. doi:10.1002/humu.22362
24. Baron R. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments / Baron R, Kneissel M. // *Nat Med*. 2013. - V.19. - №2. - P.179-192. doi:10.1038/nm.3074
25. Battle, W. A remarkable case of diffuse cancellous osteoma of the femur following a fracture, in which similar growths afterwards developed in connection with other bones / W. Battle and S. Shattock // *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. – 1908. – V.1.-P. 83-115. doi:10.1177/003591570800101007
26. Besio, R. Bone biology: insights from osteogenesis imperfecta and related rare fragility syndromes / R. Besio, C. Chow, F. Tonelli, J. Marini and, A. Forlino // *FEBS J*. – V. 286. – P. 3033-3056. doi: 10.1111/febs.14963.

27. Bogliolo, M. Mutations in *ERCC4*, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia / Bogliolo, M., Schuster, B., Stoepker, C. et al. // *American journal of human genetics.* – 2013. – V. 92. – P. 800–806. doi:10.1016/j.ajhg.2013.04.002
28. Boonekamp P.M. Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix / P.M. Boonekamp, L. van der Wee-Pals., M. van Wijk—van Lennep et al. // *Bone Miner.* – 1986. – V. 1. – P. 27-39.
29. Borah B. Risedronate reduces intracortical porosity in women with osteoporosis. / B. Borah, T. Dufresne, J. Nurre et al. // *J. Bone Miner.* – 2009. – V. 25. – P. 41-47. doi: 10.1359/jbmr.090711.
30. Botor M. Osteogenesis Imperfecta: Current and Prospective Therapies / M. Botor, A. Fus-Kujawa, M. Uroczynska et al. // *Biomolecules.* – 2021. – V. 11. - №10. – P. 1493. doi: 10.3390/biom11101493.
31. Boyce AM. Denosumab: an Emerging Therapy in Pediatric Bone Disorders / AM Boyce // *Curr Osteoporos Rep.* – 2017. - V. 15. - №4. – P. 283-292. doi:10.1007/s11914-017-0380-1
32. Brailsford, J. F. Osteogenesis Imperfecta / J. F. Brailsford // *The British Journal of Radiology.* – 1943. - V. 16. - №185. – P. 129–136. doi:10.1259/0007-1285-16-185-129
33. Brash A.R. Lipoygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. / A.R. Brash et al. // *J. Biol. Chem.* - 1999. – V.274 – P.23679–23682. doi: 10.1074/jbc.274.34.23679.
34. Bregou B. Osteogenesis imperfecta: From diagnosis and multidisciplinary treatment to future perspectives. / B. Bregou, B. Aubry-Rozier, L. Bonafé, L. Laurent-Applegate, D. Pioletti, P. Zambelli // *Swiss Med.* – 2016. – V. 146. - w14322. doi:10.4414/smw.2016.14322
35. Buratti E. Aberrant 5' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization / Buratti E, Chivers M, Královicová J, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35. – P. 4250-4263. doi: 10.1093/nar/gkm402.

36. Burchardt, A. Hyperplastic Callus Formation in Osteogenesis Imperfecta / A. Burchardt, A. Wagner and P. Basse // *Acta Radiologica*. – 1994. – V. 36. - №5. – P. 426-428. doi: 10.1177/028418519403500505
37. Byers, P. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta - №OI type II: a biochemically heterogeneous disorder usually due to new mutations in the genes for type I collagen / P. Byers, P. Tsipouras, J.F. Bonadio, B.J. Starman, R.C. Schwartz // *Am J Hum Genet*. – 1988 - V. 42.– P. 237–248. doi: 10.1177/028418519403500505
38. Cabral, W. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta / W. A. Cabral, W. Chang, A. Barnes et al. // *Nature Genet*. – 2008. - V. 39.– P. 359-365. doi: 10.1038/ng1968.
39. Cabral, W. Type I collagen triplet duplication mutation in lethal osteogenesis imperfecta shifts register of alpha chains throughout the helix and disrupts incorporation of mutant helices into fibrils and extracellular matrix / W. A. Cabral, W. Mertts., M. Makareeva, et al. // *Nature Genet*. – 2003. - V. 278.–№12. - P. 10006–10012. doi: 10.1074/jbc.M212523200
40. Capitani M. The KDEL receptor: new functions for an old protein / Capitani M, Sallese M. // *FEBS Lett*. - 2009. - V.583. - №23. - P.3863-3871. doi:10.1016/j.febslet.2009.10.053
41. Carriero A. Altered lacunar and vascular porosity in osteogenesis imperfecta mouse bone as revealed by synchrotron tomography contributes to bone fragility / A. Carriero, M. Doube, M. Vogt, et al. // *Bone*. – 2014. – V. 61 – P. 116-124. doi:10.1016/j.bone.2013.12.020
42. Chen P. Patient-reported outcomes in a Chinese cohort of osteogenesis imperfecta unveil psycho-physical stratifications associated with clinical manifestations / P. Chen, Z. Tan, A. Qiu, et al. // *Orphanet J Rare Dis*. – 2022. – V. 17. - №1 – P. 249. doi: 10.1186/s13023-022-02394-7
43. Cho, T. A single recurrent mutation in the 5'-UTR of IFITM5 causes osteogenesis imperfecta type V / T. Cho, K. Lee, S. Lee, et al. // *Am. J. Hum. Genet*. - 2012. – V. 91. - P. 343–348. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.06.005.

44. Christiansen H. Homozygosity for a missense mutation in *SERPINH1*, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta / Christiansen HE, Schwarze U, Pyott SM, et al. // *Am J Hum Genet.* -2010. – V. 86. - №3. – P.389-398. doi:10.1016/j.ajhg.2010.01.034
45. Chu, M. Internal deletion in a collagen gene in a perinatal lethal form of osteogenesis imperfecta / M. Chu, C. Williams, G. Pepe // *Nature.* – 1983. – V.304. – P. 78-80. doi: 10.1038/304078a0.
46. Dagdeviren D. Dental and craniofacial characteristics caused by the p.Ser40Leu mutation in *IFITM5* / D. Dagdeviren, F. Tamimi, B. Lee et al. // *Am J Med Genet.* – 2019. – V.179. – P.65-70. doi: 10.1002/ajmg.a.40383.
47. De Malebranche N. De la recherche de la verité / N. De Malebranche // *Henry Desbordes.* - 1674-1688. – V. 2. – P. 148-167.
48. Deguchi M. Current Overview of Osteogenesis Imperfecta / M. Deguchi, S. Tsuji, D. Katsura et al. // *Medicina.* – 2021. – V. 57. - №5. - P.464. doi: 10.3390/medicina57050464
49. Demir S. Targeted High-Throughput Sequencing Analysis Results of Osteogenesis Imperfecta Patients from Different Regions of Turkey / Demir, S. Yalçintepe, S., Atlı, E. İ. et al. // *Genet. Test. Mol. Biomark.* – 2021 – V. 25.- P. 59–67. doi: 10.1089/gtmb.2020.0169.
50. Dimori M. Respiratory defects in the *Crtap*KO mouse model of Osteogenesis Imperfecta / M. Dimori, M. Heard-Lipsmeyer, S. Byrum et al. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2020.- V. 318. - №4. -P. 592-605. doi: 10.1152/ajplung.00313.2019.
51. Doyard, M. FAM46A mutations are responsible for autosomal recessive osteogenesis imperfecta / M. Doyard, S. Bacrot, C. Huber, et al. // *J Med Genet.* - 2018. - № 3. - P. 1–7. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104999.
52. Dubail, J. Homozygous Loss-of-Function Mutations in *CCDC134* Are Responsible for a Severe Form of Osteogenesis Imperfecta / J. Dubail, P. Brunelle, G. Baujat, et al. // 2020. - V. 35. - № 8. - P. 1470–1480. doi: 10.1002/jbmr.4011.
53. Durkin A. Expanding the phenotype of SPARC-related osteogenesis imperfecta:

- clinical findings in two patients with pathogenic variants in SPARC and literature review / A. Durkin, C. DeVile, P. Arundel // *J. Med. Genet.* - 2021. - V. 59. - № 8. - P. 810-816. doi: 10.1136/jmedgenet-2021-107942.
54. Eddowes, A. Dark sclerotics and fragilitas ossium et al. // *Br. Med. J.* – 1900. - V. 222.
55. Edelu B. Osteogenesis Imperfecta: a case report and review of literature / B. Edelu, I. Ndu, I. Asinobi // 2014. - V. 4. - № 1. - P. 1–5. doi: 10.4103/2141-9248.131683.
56. Efthymiou, S. Two novel bi-allelic KDELR2 missense variants cause osteogenesis imperfecta with neurodevelopmental features / S. Efthymiou, I. Herman, N. Anwar, et al. // 2021. - V. 185. - №7. - P. 2241–2249. doi: 10.1002/ajmg.a.62221
57. Erlebacher A. Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype / A. Erlebacher, R. Derynck // *J Cell Biol.* – 1996. – V. 132. - № 1-2 – P. 195-210. doi: 10.1083/jcb.132.1.195.
58. Etich, J. Osteogenesis imperfecta — pathophysiology and therapeutic options / J. Etich, L. Leßmeier, M. Rehberg, et al. // *Mol. Cell. Pediatr.* - 2020. - V. 9. doi: 10.1186/s40348-020-00101-9.
59. Evolution of vertebrate interferon inducible transmembrane proteins / Hickford D., Frankenberg S., Shaw G., Renfree M.B. // *BMC Genom.* – 2012 – V.13. - P. 155. doi: 10.1186/1471-2164-13-155.
60. Faqeih E. WNT1 mutation with recessive osteogenesis imperfecta and profound neurological phenotype / Faqeih E, Shaheen R, Alkuraya FS. // *J Med Genet.* - 2013. - V.50. - №7. - P.491-492. doi:10.1136/jmedgenet-2013-101750
61. Farber, C.R. A novel IFITM5 mutation in severe atypical osteogenesis imperfecta type VI impairs osteoblast production of pigment epithelium-derived factor. / C.R. Farber, A. Reich, A.M. Barnes et al. // *J Bone Miner Res.* - 2015. - V. 29. - № 6. - P. 1402–1411. doi:10.1002/jbmr.2173.
62. Fisaletti, M. Novel variant in Sp7 / Osx associated with recessive osteogenesis imperfecta with bone fragility and hearing impairment / M. Fisaletti, A. Biggin, B. Bennetts, et al. // *Bone.* - 2018. - V. 110. - P. 66–75. doi: 10.1016/j.bone.2018.01.031

63. Fleisch, H. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo / H. Fleisch, R. G. Russell, M. D. Francis et al. // *Science*. – 1969. - V. 165. - P. 1262–1264. doi: 10.1126/science.165.3899.1262.
64. Fleming, F. Cyclic bisphosphonate therapy in osteogenesis imperfecta type V / F. Fleming, H.J. Woodhead, J.N. Briody, et al. // 2005. -V.41. - №3. - P.147–151. doi: 10.1111/j.1440-1754.2005.00567.x
65. Forlino A. Osteogenesis imperfecta / Forlino A, Marini JC. // *Lancet*. - 2016. - V.387. - №10028. - P.1657-1671. doi:10.1016/S0140-6736. - №15)00728-X
66. Forlino, A. New perspectives on osteogenesis imperfecta / A. Forlino, W.A. Cabral, A.M. Barnes, et al. // *Nat. Rev. Endocrinol.* - 2011. - V. 7. - № 9. - P. 540–557. doi: 10.1038/nrendo.2011.81.
67. Fratzl-Zelman N. Unique micro- and nano-scale mineralization pattern of human osteogenesis imperfecta type VI bone / N. Fratzl-Zelman, I. Schmidt, P. Roschger, et al. // *Bone*. – 2015. – V. 73 - P. 233-241. doi: 10.1016/j.bone.2014.12.023.
68. Fratzl-Zelman, N. Bone matrix hypermineralization in prolyl-3 hydroxylase 1 deficient mice / N. Fratzl-Zelman, H.P. Bächinger, J.A. Vranka, et al. // *Bone*. - 2016. - V. 85. - P. 15–22. doi:10.1016/j.bone.2016.01.018
69. Fratzl-Zelman, N. Classification of osteogenesis imperfecta / N. Fratzl-Zelman, B. M. Misof, P. Roschger et al. // *Wien Med Wochenschr.* - 2015. - V. 165. - P. 264–270. doi: 10.1007/s10354-015-0368-3.
70. Frazier-Bowers, S. Novel mutations in *PTH1R* associated with primary failure of eruption and osteoarthritis / Frazier-Bowers, S. A., Hendricks, H. M., Wright et al. // *Journal of dental research*. -2014. – V. 93. – P. 134–139. doi:10.1177/0022034513513588
71. Friedenstein, A. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers / A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhyan, U.V. Gerasimov et al. // *Cell Tissue Kinet.* – 1987. – V. 20. – P. 263-272. doi: 10.1111/j.1365-2184.1987.tb01309.x.
72. From the American Association of Neurological Surgeons . - №AANS). Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for

- Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke / From the American Association of Neurological Surgeons . - №AANS), American Society of Neuroradiology . - №ASNR), Cardiovascular and Interventional Radiology Society of Europe . - №CIRSE) et al.// Int J Stroke. – 2018. – V.13. - №6. - P.612-632. doi:10.1177/1747493018778713
73. Garibaldi, N. Dissecting the phenotypic variability of osteogenesis imperfecta / N. Garibaldi, R. Besio, R. Dalgleish // Disease models & mechanisms. – 2022. – V.15. - №5. doi: 10.1242/dmm.049398.
74. Gistelink C. Abnormal Bone Collagen Cross-Linking in Osteogenesis Imperfecta/Bruck Syndrome Caused by Compound Heterozygous PLOD2 Mutations / Gistelink C. Gistelink, M. Weis, J. Rai // JBMR Plus. – 2021. – V. 5. - №3. doi: 10.1002/jbm4.10454.
75. Gistelink C. Abnormal Bone Collagen Cross-Linking in Osteogenesis Imperfecta/Bruck Syndrome Caused by Compound Heterozygous PLOD2 Mutations / Gistelink C, Weis M, Rai J, et al. // JBMR Plus. – 2021. V.5. - №3:e10454. doi:10.1002/jbm4.10454
76. Glorieux F.H. Osteogenesis imperfecta / F.H. Glorieux // Best Pr. Res. Clin. Rheumatol. – 2008. – V.22. - P.85–100. doi: 10.1016/j.berh.2007.12.012.
77. Glorieux F.H. Type V osteogenesis imperfecta: a new form of brittle bone disease / F.H. Glorieux, F. Rauch, H. Plotkin, et al. // J Bone Miner Res. – 2000.- V.15.- P. 1650–1658. doi:10.1359/jbmr.2000.15.9.1650
78. Götherström, C. Stem Cell Therapy as a Treatment for Osteogenesis Imperfecta / C. Götherström and L. Walther-Jallow // Curr Osteoporos Rep. - 2020. - P. 337–343. doi: 10.1007/s11914-020-00594-3.
79. Grafe, I. Excessive transforming growth factor- β signaling is a common mechanism in osteogenesis imperfecta / I. Grafe, T. Yang, S. Alexander, et al. // Nat Med. - 2014. - V. 20. - № 6. - P. 670–675. doi: 10.1038/nm.3544.
80. Gray, P.H. A case of osteogenesis imperfecta, associated with dentinogenesis imperfecta, dating from antiquity /P.H. Gray. // Clin Radiol. - 1969. – V.20 - P. 106–108.

81. Guillén-Navarro E., Two Mutations in IFITM5 Causing Distinct Forms of Osteogenesis Imperfecta / E. Guillén-Navarro, M.J. Ballesta-Martínez, M. Valencia et al. // *Am J Med Genet.* - 2014. - P. 1136–1142. doi: 10.1002/ajmg.a.36409.
82. Hadjidakis, D.J. Bone Remodeling / D.J. Hadjidakis, I.I. Androulakis. // *Ann N Y Acad Sci.* - 2006. - V. 396. - P. 385–396. doi: 10.1196/annals.1365.035.
83. Hald, J. Bisphosphonates for the prevention of fractures in osteogenesis imperfecta: meta-analysis of placebo-controlled trials / J.D. Hald, E. Evangelou, B.L. Langdahl // *J Bone Miner Res.* – 2015 – V.30. – P.929-933. doi: 10.1002/jbmr.2410.
84. Hanagata, N. Characterization of the osteoblast-specific transmembrane protein IFITM5 and analysis of IFITM5-deficient mice / N. Hanagata, X. Li., H. Morita et al. // *Journal of Bone and Mineral Metabolism.* - 2011. -V.29.- P. 279–290. doi:10.1007/s00774-010-0221-0
85. Hanagata, N. *IFITM5* mutations and osteogenesis imperfecta / N. Hanagata. // *J. Bone Miner. Metab.* – 2016 – V. 34. – P.123–131. doi: 10.1007/s00774-015-0667-1.
86. Hanagata, N. Phenotype and gene expression pattern of osteoblast-like cells cultured on polystyrene and hydroxyapatite with pre-adsorbed type-I collagen / N. Hanagata, T. Takemura, A. Monkawa, et al. // *JBiomed Mater Res A.* - 2007. – V.83- №2 – P.362-371. doi: 10.1002/jbm.a.31240.
87. Hanagata, N. Phenotype and gene expression pattern of osteoblast-like cells cultured on polystyrene and hydroxyapatite with pre-adsorbed type-I collagen / N. Hanagata, T. Takemura, A. Monkawa, et al. // *JBiomed Mater Res A.* - 2007. – V.83. - №2. - 362–371. doi: 10.1002/jbm.a.31240.
88. Hedjazi G. Alterations of bone material properties in growing ifitm5/BRIL p.S42 knock-in mice, a new model for atypical type VI osteogenesis imperfecta / G. Hedjazi, G. Guterman-Ram, S. Blouin // *Bone.* – 2022. – V.162. doi: 10.1016/j.bone.2022.116451
89. Higuchi Y. Genetic analysis in Japanese patients with osteogenesis imperfecta: Genotype and phenotype spectra in 96 probands / Higuchi Y, Hasegawa K, Futagawa N // *Mol Genet Genomic Med.* – 2021.- V. 9 - №6. – P.1675. doi: 10.1002/mgg3.1675.

90. Holcomb DY. A fragile boned family. / Holcomb DY. // *J Hered.* – 1931. -V.22.- P.105.
91. Holick, M. Fetal fractures in an infant with maternal Ehlers-Danlos syndrome, CCDC134 pathogenic mutation and a negative genetic test for osteogenesis imperfecta / Holick, M. F., Shirvani, A., Charoenngam, N. // *Children - №Basel* -2021. -V.8.- P.512. doi: 10.3390/children8060512
92. Hoyer-Kuhn H. Two years' experience with denosumab for children with osteogenesis imperfecta type VI / Hoyer-Kuhn H, Netzer C, Koerber F, et al. // *Orphanet J Rare Dis.* – 2014. -V.9. – P.145. doi: 10.1186/s13023-014-0145-1.
93. Hoyer-Kuhn, H. A nonclassical IFITM5 mutation located in the coding region causes severe osteogenesis imperfecta with prenatal onset / Hoyer-Kuhn H., Semler O., Garbes L. et al. // *J Bone Miner Res.* – 2014.- V. 29. – P. 1387–1391. doi: 10.1002/jbmr.2156.
94. Ishida, Y. Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection / Ishida, Y. et al. // *Mol. Biol. Cell.* - 2009. – V. 20. – P. 2744–2754. doi: 10.1091/mbc.e08-11-1092.
95. Joeng KS. Osteocyte-specific WNT1 regulates osteoblast function during bone homeostasis / Joeng KS, Lee YC, Lim J // *J Clin Invest.* – 2017. – V. 127- №7. – P. 2678-2688. doi: 10.1172/JCI92617.
96. Key, J. A. Brittle bones and blue sclera. Hereditary hypoplasia of the mesenchyme / J. A Key // *Arch. Surg.* – 1926. -V.13. – V. 523
97. Kuurila K. Hearing loss in Finnish adults with osteogenesis imperfecta: A nationwide survey / Kuurila K, Kaitila I, Johansson R. // *Ann Otol Rhinol Laryngol.* – 2002. – V.111. - P. 939–946. doi: 10.1177/000348940211101014.
98. Laine CM, Joeng KS, Campeau PM, et al. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med.* 2013. - V.368. - №19. - P.1809-1816. doi:10.1056/NEJMoa1215458
99. Lalu M. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells - №SafeCell: a systematic review and meta-analysis of clinical trials / Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, et al. // *PLoS One.* – 2012. -V.7. - №10: e47559. doi: 10.1371/journal.pone.0047559

100. Lapunzina P. Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta / Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, et al. // *Am J Hum Genet.* - 2010. - V.87. - №1. - P.110-114. doi:10.1016/j.ajhg.2010.05.016
101. Leali PT. Efficacy of teriparatide vs neridronate in adults with osteogenesis imperfecta type I: a prospective randomized international clinical study / Leali PT, Balsano M, Maestretti G, et al. // *Clin Cases Miner Bone Metab.* - 2017. – V.14- №2 - P.153–156. doi: 10.11138/ccmbm/2017.14.1.153.
102. Lee, D. Clinical and Radiological Manifestations of Osteogenesis Imperfecta Type V / Lee, D., Cho, T., Choi, I. // *Journal of Korean Medical Science.* – 2006. – V. 21- №4. - P.709. doi:10.3346/jkms.2006.21.4.709
103. Lim, J. Y. A novel Ser40Trp variant in *IFITM5* in a family with osteogenesis imperfecta and review of the literature / Lim, J. Y., Bhatia, N. S., Vasanwala et al. // *Clinical Dysmorphology.* - 2019. V.28 - №3 - P.118–123. doi:10.1097/mcd.0000000000000279
104. Lindahl K. Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta / Lindahl K, Åström E, Rubin C, et al. // *Eur J Hum Genet.* – 2015. – V. Aug. – V.23- №8 - P.1042-1050. doi: 10.1038/ejhg.2015.81. 6
105. Luckman S.P. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit mevalonate pathway and prevent posttranslational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. / Luckman S.P., Hughes D.E., Coxon F.P. et al. // *J Bone Miner Res.* - 1998. – V.13: - P.581—589. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.4.581.
106. Lund AM. Dental manifestations of osteogenesis imperfecta and abnormalities of collagen I metabolism / Lund AM, Jensen BL, Nielsen LA. et al. // *J Craniofac Genet Dev Biol.* - 1998. – V.18- №1 - P.30-37
107. Maranda V. The Osteogenesis Imperfecta Type V Mutant BRIL/IFITM5 Promotes Transcriptional Activation of MEF2, NFATc, and NR4A in Osteoblasts / Maranda V, Gaumond MH, Moffatt P. et al. // *Int J Mol Sci.* - 2022. – V.23- №4 - P.2148. doi: 10.3390/ijms23042148.

108. Marini JC. Components of the collagen prolyl 3-hydroxylation complex are crucial for normal bone development / Marini JC, Cabral WA, Barnes AM et al. // *Cell Cycle*. - 2007. – V.6 - №14 - P.1675-1681. doi: 10.4161/cc.6.14.4474.
109. Marini JC. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans / Marini JC, Forlino A, Cabral WA et al. // *Hum Mutat*. – 2007. – V.28. – P. 209-221. doi: 10.1002/humu.20429.
110. Marini JC. Null mutations in *LEPRE1* and *CRTAP* cause severe recessive osteogenesis imperfecta / Marini JC, Cabral WA, Barnes AM // *Cell Tissue Res*. - 2010. – V.339 - P.59-70. doi: 10.1007/s00441-009-0872-0.
111. Marini JC. Osteogenesis imperfecta / Marini JC, Forlino A, Bächinger HP et al. // *Nat Rev Dis Primers*. 2017 18. – V.3 - P.17052. doi: 10.1038/nrdp.2017.52.
112. Marini, J. C. Osteogenesis imperfecta / Marini, J. C., Forlino, A., Bächinger, H. P. et al. // *Nat. Rev. Dis. Primers*. – 2017. – V.3, 17052. doi: 10.1038/nrdp.2017.52
113. Marini, J.C. Components of the collagen prolyl 3-hydroxylation complex are crucial for normal bone development / J.C. Marini, W.A. Cabral, A.M. Barnes, et al. // *Cell Cycle*. - 2007. - V. 6. - № 14. - P. 1675–1681. doi: 10.4161/cc.6.14.4474.
114. Marom R. Osteogenesis imperfecta: an update on clinical features and therapies / Marom R, Rabenhorst BM, Morello R. // *Eur J Endocrinol*. - 2020. – V.183- №4: - P.95-106. doi: 10.1530/EJE-20-0299.
115. Marom R. Pharmacological and biological therapeutic strategies for osteogenesis imperfecta / Marom R, Lee YC, Grafe I // *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. - 2016. – V.172 - №4: - P.367–83. doi: 10.1002/ajmg.c.31532
116. Marr C. Managing the patient with osteogenesis imperfecta: a multidisciplinary approach / Marr C, Seasman A, Bishop N. // *J Multidiscip Healthc*. - 2017. – V.10: - P.145–155. doi: 10.2147/JMDH.S113483.
117. Martínez-Glez V. Identification of a mutation causing deficient BMP1/mTLD proteolytic activity in autosomal recessive osteogenesis imperfecta / Martínez-Glez V, Valencia M, Caparrós-Martín JA, et al. // *Hum Mutat*. - 2012. - V.33. - №2. - P.343-350. doi:10.1002/humu.21647

118. McClung M.R. Bisphosphonates / McClung M.R. // *Endocrinol Metab Clin North Am.* - 2003. – V.32: - P.253—271. doi: 10.1016/s0889-8529(02)00079-8.
119. Messineo D. New 3D Cone Beam CT Imaging Parameters to Assist the Dentist in Treating Patients with Osteogenesis Imperfecta / Messineo D., Luzzi V., Pepe F., et al. // *Healthcare.* - 2020. – V.8 - P.546. doi: 10.3390/healthcare8040546.
120. Moffatt P. Bril: a novel bone-specific modulator of mineralization / Moffatt P, Gaumont MH, Salois P // *J Bone Miner Res.* - 2008. – V.23- №9- P.1497–508. doi: 10.1359/jbmr.080412.
121. Montpetit K. Multidisciplinary treatment of severe osteogenesis imperfecta: functional outcomes at skeletal maturity / K. Montpetit, T. Palomo, F.H. Glorieux, F. Fassier, F. Rauch et al. // *Arch. Phys. Med. Rehabil.* - 2015. -V. 96. - № 10.- P. 1834-1839. doi: 10.1016/j.apmr.2015.06.006.
122. Moosa S. Autosomal-Recessive Mutations in *MESD* Cause Osteogenesis Imperfecta / Moosa S, Yamamoto GL, Garbes L et al. // *Am J Hum Genet.* - 2019. - V.105. - №4 - P.836–43. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.08.008
123. Morello R. cDNA cloning, characterization and chromosome mapping of *Crtap* encoding the mouse cartilage associated protein / Morello R, Tonachini L, Monticone M. et al. // *Matrix Biol* -1999. – V.18 - P.319-24. doi: 10.1016/s0945-053x(99)00002-5.
124. Morello R. *CRTAP* is required for prolyl 3- hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta / Morello R, Bertin TK, Chen Y// *Cell* . – 2006. – V. 127. - P.291-304. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.039.
125. Morello R. Osteogenesis imperfecta and therapeutics / Morello R // *Matrix Biol.* - 2018. – V.71–72 - P.294–312. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.010.
126. Morello R. Osteogenesis imperfecta and therapeutics / Morello R. // *Matrix Biol.* – 2018. - P. 294–312. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.010.
127. Mrosk, J. Diagnostic strategies and genotype-phenotype correlation in a large Indian cohort of osteogenesis imperfecta / Mrosk, J., Bhavani, G.S.L. Shah, H. et al. // *Bone.* – 2018. -V. 110. – P. 368–377. doi: 10.1016/j.bone.2018.02.029.

128. Murakami T. Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation / Murakami T, Saito A, Hino S, et al. // *Nat Cell Biol.* - 2009. - V.11. - №10. - P.1205-1211. doi:10.1038/ncb1963
129. Nadyrshina D. Osteogenesis Imperfecta: Search for Mutations in Patients from the Republic of Bashkortostan (Russia) / Nadyrshina D, Zaripova A, Tyurin A. et al. // *Genes.* - 2022. – V.13. - №1. - P.124. doi: 10.3390/genes13010124.
130. Nasomyont N. Intravenous bisphosphonate therapy in children with spinal muscular atrophy / Nasomyont N., Hornung L., Wasserman H. et al. // *Osteoporos. Int.* – 2019. – V.31.- P.995–1000. doi: 10.1007/s00198-019-05227-9
131. Nawawi, N. Genotype-phenotype correlation among Malaysian patients with osteogenesis imperfecta / Nawawi, N. Selveindran, N.M., Rasat, R. et al. // *Clin. Chim. Acta.* – 2018 – V. 484- P. 141–147. doi: 10.1016/j.cca.2018.05.048.
132. Nijhuis W. Current concepts in osteogenesis imperfecta: bone structure, biomechanics and medical management. / Nijhuis WH, Eastwood DM, Allgrove J et al. // *J Child Orthop.* – 2019. – V.13 - №1- P.1-11. doi: 10.1302/1863-2548.13.180190.
133. Niyibizi C, Li F. Potential implications of cell therapy for osteogenesis imperfecta. *Int J Clin Rheumtol.* – 2009 . – V. Feb 1. – V.4- №1- P.57-66. doi: 10.2217/17584272.4.1.57.
134. Niyibizi C. Gene therapy approaches for osteogenesis imperfecta / Niyibizi C., Wang S., Mi Z., Robbins P.D. // *Gene Ther.* – 2004.– V.11- P.408–416. doi: 10.1038/sj.gt.3302199.
135. Ohata, Y. Comprehensive genetic analyses using targeted next-generation sequencing and genotype-phenotype correlations in 53 Japanese patients with osteogenesis imperfecta / Ohata, Y. Takeyari, S. – V. Nakano, Y. et al. et al. // *Osteoporos. Int.* – 2019. V.30 – P.2333–2342. doi: 10.1007/s00198-019-05076-6.
136. Orgel, J. P. Molecular and structural mapping of collagen fibril interactions / Orgel, J. P., San Antonio, J. D., Antipova, O. et al. // *Connect. Tissue Res.* - 2011.- V.52. – P. 2–17. doi: 10.3109/03008207.2010.511353

137. Orwoll ES. Evaluation of teriparatide treatment in adults with osteogenesis imperfecta / Orwoll ES, Shapiro J, Veith S, et al. // *J Clin Invest.* – 2014.– V.124- №2- P.491–498. doi: 10.1172/JCI71101
138. Pekkinen, M. Osteoporosis and skeletal dysplasia caused by pathogenic variants in *SGMS2* / Pekkinen, M., Terhal, P. A., Botto, L. D. et al. // *JCI insight.* – 2019. – V.4. - №7:e126180.
139. Patoine A. The osteogenic cell surface marker BRIL/IFITM5 is dispensable for bone development and homeostasis in mice. et al. // *PLOS ONE.* -2017. - V.12.: e0184568. doi: 10.1371/journal.pone.0184568.
140. Patoine A. Topological mapping of BRIL reveals a type II orientation and effects of osteogenesis imperfecta mutations on its cellular destination / Patoine A, Gaumond MH, Jaiswal PK, Fassier F, Rauch F, Moffatt P. et al. // *J Bone Miner Res.* – 2014. - V. 29. P. 2004–2016. doi: 10.1002/jbmr.2243.
141. Perreira JM. IFITMs restrict the replication of multiple pathogenicviruses / Perreira JM, Chin CR, Feeley EM et al. // *J Mol Biol.* - 2013. – V. 425- №24- P.4937–4955. doi: 10.1016/j.jmb.2013.09.024.
142. Pittenger MF. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. / Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. // *Science.* - 1999. – V.284- P.143–147. doi: 10.1126/science.284.5411.143
143. Plotkin H. Syndromes with congenital brittle bones / Plotkin H. // *BMC Pediatr.* – 2004.– V.4. - P.16. doi: 10.1186/1471-2431-4-16
144. Plotkin L.I. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin / Plotkin L.I., Weinstein R.S., Parfitt A.M. et al. // *J Clin Invest.* - 1999. – V.104. - P.1363—1374. doi: 10.1172/JCI6800.
145. Pollitt RC. Phenotypic variability in patients with osteogenesis imperfecta caused by BMP1 mutations / Pollitt RC, Saraff V, Dalton A, et al. // *Am J Med Genet A.* - 2016. - V.170. - №12. - P.3150-3156. doi:10.1002/ajmg.a.37958
146. Pyott S. Mutations in *PPIB* (cyclophilin B) delay type I procollagen chain association and result in perinatal lethal to moderate osteogenesis imperfecta

- phenotypes / Pyott SM, Schwarze U, Christiansen HE, et al. // *Hum Mol Genet.* -2011. – V.20. - №8. – P.1595-1609. doi:10.1093/hmg/ddr037
147. Ralston SH. Management of Osteogenesis Imperfecta / Ralston SH, Gaston MS. // *Front Endocrinol.* - 2020. – V.10 - P.924. doi: 10.3389/fendo.2019.00924.
148. Rauch, F. Osteogenesis imperfecta / Rauch, F. and Glorieux, F.// *The Lancet.* – 2004. – P. 363-418. doi:10.1016/S0140-6736- №0416051-0
149. Renard, J. C. Versuch, die Entstehung und ErnBhrung, das Wachstum und alle Ubrigen Veranderungen der Knochen im gesunden und kranken Zustande zu erkhren / Renard, J. C. // Leipzig, SchBfer. – 1803.
150. Ribeiro A. Alendronate-associated esophagitis: endoscopic and pathologic features / A. Ribeiro, K.R. DeVault, J.T. Wolfe. et al. // *Gastrointest Endosc.* – 1998. - V.47- P.525-528. doi: 10.1016/s0016-5107(98)70256-1.
151. Ríos-Rodenas M. A cephalometric method to diagnosis the craniovertebral junction abnormalities in osteogenesis imperfecta patients / Ríos-Rodenas M, de Nova J, Gutiérrez-Díez MP, et al. // *J Clin Exp Dent.* – 2015. – V. 7 - №1. - P.153–158. doi: 10.4317/jced.52126.
152. Roberts, J. Bilateral hyperplastic callus formation in osteogenesis imperfecta. / J. Roberts // *The Journal of Bone & Joint Surgery.* – 1976. – V. 58. - №8.- P.1164-1166. doi:10.2106/00004623-197658080-00025
153. Robichon J. Pathogenesis of osteogenesis imperfecta / Robichon J, Germain JP. // *Can Med Assoc J.* - 1968. – V.99- P.975–979.
154. Rodriguez Celin M. Uncommon IFITM5 mutation associated with severe skeletal deformity in osteogenesis imperfecta / Rodriguez M, Moosa S, Fano V et al. // *Ann Hum Genet.* – 2018. – V.82- P.477–481. doi: 10.1111/ahg.12275.
155. Rossi V. Osteogenesis imperfecta: advancements in genetics and treatment / Rossi V, Lee B, Marom R. // *Curr Opin Pediatr.* – 2019. – V. Dec. – V.31- №6- P.708-715. doi: 10.1097/MOP.0000000000000813.
156. Sałacińska K. The first glycine-to-tryptophan substitution in the *COL1A1* gene identified in a patient with progressively-deforming osteogenesis imperfecta /

Sałacińska K, Michałus I, Pinkier I., et al. // *Mol Genet Genomic Med.* - 2022. doi: 10.1002/mgg3.1996.

157. Schwarze U. Mutations in FKBP10, which result in Bruck syndrome and recessive forms of osteogenesis imperfecta, inhibit the hydroxylation of telopeptide lysines in bone collagen / Schwarze U, Cundy T, Pyott SM, et al. // *Hum Mol Genet.* – 2013. – V.22. - №1. – P.1-17. doi:10.1093/hmg/ddt371

158. Seedorf KS. Osteogenesis imperfecta. A study of clinical features and heredity based on 55 Danish families comprising 18 affected members. Copenhagen, Denmark: Universitetsforlaget Aarhus. – V. 1949.

159. Semler O. A mutation in the 5'-UTR of IFITM5 creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus / Semler O., Garbes L., Keupp K, et al. // *Am. J. Hum. Genet.* - 2012. – V.91- P.349–357. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.06.011.

160. Shapiro JR. Phenotypic variability of osteogenesis imperfecta type V caused by an IFITM5 mutation / Shapiro JR, Lietman C, Grover M, et al. // *J Bone Miner Res.* - 2013. – V.28- №7- P.1523-1530. doi: 10.1002/jbmr.1891.

161. Shoulders MD. Collagen structure and stability. / Shoulders MD, Raines RT. // *Annu Rev Biochem.* - 2009. – V.78 - P.929-58. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.

162. Sillence D. O. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta / Sillence D. O., Senn A., Danks D. // *J Med Genet.* – 1979 - V.16 - №2 - P. 101–116. doi: 10.1136/jmg.16.2.101.

163. Sillence D. Osteogenesis imperfecta type II delineation of the phenotype with reference to genetic heterogeneity / Sillence DO, Barlow KK, Garber AP. et al. // *Am J Med Genet.* - 1984. - V.17. - №2. - P.407-423. doi:10.1002/ajmg.1320170204

164. Sillence D. Osteogenesis imperfecta: an expanding panorama of variants / Sillence D. // *Am J Med Genet.* - 1984 – V.17 - №2- P.407–23.

165. Sillence DO. Osteogenesis imperfecta nosology and genetics / Sillence DO. // *Ann N Y Acad Sci.* - 1988. - V.543 - P.1-15. doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb55311.x.

166. Sillence, DO. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta / Sillence DO, Senn A, Danks DM. et al. // *J Med Genet.* - 1979. – V.16.-№2. – P.101-116. doi: 10.1136/jmg.16.2.101.
167. Sinikumpu JJ. Severe osteogenesis imperfecta Type-III and its challenging treatment in newborn and preschool children. A systematic review / Sinikumpu JJ, Ojaniemi M, Lehenkari P. // *Injury.*– 2015. – V.46 - №8- P. 1440–6. doi: 10.1016/j.injury.2015.04.021.
168. Sponer P. Challenges of total knee arthroplasty in osteogenesis imperfecta: case report and literature review / Sponer P, Korbel M, Kucera T. // *J Int Med Res.* – 2022 – V.50 - №5. doi: 10.1177/03000605221097369.
169. Spranger, J. Osteogenesis imperfecta: a pasture for splitters and lumpers / Spranger, J et al. // *Am. J. Med. Genet.* – 1984. – V.17. – P.425-428. doi: 10.1002/ajmg.1320170205.
170. Spurway, J. Hereditary tendency to fracture / Spurway, J. et al. // *Br. Med. J.* – 1986. – V. 11. – P.844. doi: 10.1136/bmj.2.1865.844.
171. Steiner RD, Basel D. *COL1A1/2 Osteogenesis Imperfecta.* / GeneReviews® [Internet] // Steiner RD, Basel D. - 1993-2022. URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1295/ (Дата обращения:12.01.2023)
172. Stephen LX. Osteogenesis imperfecta type III in South Africa: Psychosocial challenges / Stephen LX, Roberts T, Van Hayden E. et al. // *S Afr Med J.* 2016. - V.106. - №6. - P.S90-S93. doi:10.7196/SAMJ.2016.v106i6.11005
173. Strack, C. Beobachtung von Fragilitat der Knochen in der Jugend, ein Beitrag zu der Lehre von den Knochenkrankheiten. / Strack, C. et al. // *J. Pract. Heilk.* - 1807. - V. 25 – P.163.
174. Sweeney, S. M. Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates / Sweeney, S. M. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2008.- V.283. P. 21187–21197. doi: 10.1074/jbc.M709319200.
175. Swinnen F.K. Osteogenesis imperfecta: The audiological phenotype lacks correlation with the genotype / Swinnen FK, Coucke PJ, De Paepe AM et al. // *Orphanet J Rare Dis* – 2011. – V. 6. – P.88. doi: 10.1186/1750-1172-6-88.

176. Symoens S. Deficiency for the ER-stress transducer OASIS causes severe recessive osteogenesis imperfecta in humans / Symoens S, Malfait F, D'hondt S, et al. // *Orphanet J Rare Dis.* -2013. - V.8:154. doi:10.1186/1750-1172-8-154
177. Symoens, S. et al. Type I procollagen C-propeptide defects: study of genotype–phenotype correlation and predictive role of crystal structure. / Symoens S. et al // *Hum. Mutat.* – 2014.– V. 35. P.1330–1341. doi: 10.1002/humu.22677.
178. Tainmont J. History of osteogenesis imperfecta or brittle bone disease: a few stops on a road 3000 years long / Tainmont J. // *B-ENT.* - 2007. – V.3- №3- P.157-73.
179. Takagi M. A novel mutation in LEPRE1 that eliminates only the KDEL ER retrieval sequence causes non-lethal osteogenesis imperfecta / Takagi M, Ishii T, Barnes AM, et al. // *PLoS One.* - 2012. – V.7: e36809. doi: 10.1371/journal.pone.0036809.
180. Tan W. Mutational Screening of Skeletal Genes in 14 Chinese Children with Osteogenesis Imperfecta Using Targeted Sequencing / Tan W, Ji Y, Qian Y, Lin Y et al. // *J Immunol Res.* – 2022 – V.19. – V. 5068523. doi: 10.1155/2022/5068523.
181. Tobacman, J. Profound Impact of Decline in N-Acetylgalactosamine-4-Sulfatase - №Arylsulfatase B on Molecular Pathophysiology and Human Diseases / Tobacman, J. K., Bhattacharyya, S. et al. // *International journal of molecular sciences.* – 2022 – V. 23, 13146. doi:10.3390/ijms232113146
182. Trejo P. Hypercalcemia and hypercalciuria during denosumab treatment in children with osteogenesis imperfecta type VI / Trejo P, Rauch F, Ward L., et al. // *J Musculoskelet Neuronal Interact.* - 2018. – V.18- №1- P.76-80.
183. Tyurin, A. Does the c.-14C>T Mutation in the *IFITM5* Gene Provide Identical Phenotypes for Osteogenesis Imperfecta Type V? Data from Russia and a Literature Review / Tyurin, A.; Merkuryeva, E.; Zaripova, A. et al. // *Biomedicines.* – 2022. – V. 10. - P.2363. doi: 10.3390/biomedicines10102363.
184. U.C. Lange. The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice / Lange UC, Saitou M, Western PS, et al. // *BMC Dev Biol.* -2003 - V.3. - P.1–11. doi: 10.1186/1471-213x-3-1.

185. Vahle JL. Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1–34) for 2 years and relevance to human safety / Vahle JL, Sato M, Long GG, et al // *Toxicol Pathol.* - 2002. – V.30- №3- P.312–321. doi: 10.1080/01926230252929882.
186. Van der Hoeve, J. Blaue Sclera, Knochenbrüchigkeit und Schwerhörigkeit / van der Hoeve, J., and de Kleyn, A.: // *Ned. Tijdschr. Geneesk.* - 1917. – V. 1. – P. 1003.
187. Van der Slot, J. Identification of PLOD2 as Telopeptide Lysyl Hydroxylase, an Important Enzyme in Fibrosis / Annemarie J. van der Slot, Anne-Marie Zuurmond, Alfons F. J. // *The Journal Of Biological Chemistry.* – 2003. – V.278. - №42. - P. 40967–40972. doi: 10.1074/jbc.M307380200
188. Van Dijk F. Interaction between KDELR2 and HSP47 as a Key Determinant in Osteogenesis Imperfecta Caused by Bi-allelic Variants in KDELR2 / F. van Dijk, O. Semler, J. Etich, et al. // *Am J Hum Genet.* 2020. – V.107- №5- P.989-999. doi:10.1016/j.ajhg.2020.09.009
189. Van Dijk F. Interaction between KDELR2 and HSP47 as a Key Determinant in Osteogenesis Imperfecta Caused by Bi-allelic Variants in KDELR2 / van Dijk FS, Semler O, Etich J, et al. // *Am J Hum Genet.* - 2020. - V.107. - №5. - P.989-999. doi:10.1016/j.ajhg.2020.09.009
190. Van Dijk F. Osteogenesis imperfecta: Clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment / Van Dijk FS, Sillence DO. // *Am J Med Genet.* – 2014. - V.164A - P.1470– 1481. doi: 10.1002/ajmg.a.36545.
191. Van Dijk FS. Classification of osteogenesis imperfecta revisited / van Dijk FS, Semler O, Etich J et al. et al. // *Eur J Med Genet.* – 2010. – V.53 - P.1–5. doi: 10.1016/j.ejmg.2009.10.007.
192. Van Dijk FS. Osteogenesis imperfecta, normal collagen folding, and lack of cyclophilin B / Van Dijk FS, Cobben JM, Pals G et al. // *N Engl J Med.* – 2010. – V. 362- №20. - P. 1940-1941. doi: 10.1056/NEJMc1002797.
193. van Dijk, F. *PP1B* mutations cause severe osteogenesis imperfecta / F. van Dijk, I. Nesbitt, E. Zwikstra et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2009. - V.85.- P.521–527. doi: 10.1093/hmg/ddr037.

194. van Dijk, F. S. Interaction between KDELR2 and HSP47 as a Key Determinant in Osteogenesis Imperfecta Caused by Bi-allelic Variants in KDELR2 / van Dijk, F. S., Semler, O., Etich, J. et al. // *Am J Hum Genet.* – 2020. – V.5 – P. 989-999. doi: 10.1016/j.ajhg.2020.09.009.
195. Vranka, J. A. Prolyl 3-hydroxylase 1, enzyme characterization and identification of a novel family of enzymes / Vranka, J. A., Sakai, L. Y., Bachinger, H. P. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279- P. 23615-23621. doi: 10.1074/jbc.M312807200.
196. Vrolik W. Tabulae ad illustrandam embryogenesis hominis et mammalium, tam naturalem quam abnormem — De Vrucht van den Mensch en van de Zoogdieren afgebeeld en beschreven in hare regelmatige en onregelmatige Ontwikkeling Illustrations of human and mammalian embryogenesis, both normal and abnormal - *Noin Latin and Dutch* / Vrolik W et al. // G.M.P. Londonck. -1849. – P. 562–566.
197. Vrolik. Tabul. ad Must, embryo-genesin hominis et mammalium. Tab. 91. Amsterdam, 1845
198. Wang X.F. The role of the serum RANKL/OPG ratio in the healing of intertrochanteric fractures in elderly patients. / Wang X.F., Zhang Y.K., Yu Z.S., et al. // *Mol. Med. Rep.* 2013. – V. 7- №4. -P.1169-1172. doi: 10.3892/mmr.2013.1335
199. Ward L. Osteogenesis Imperfecta Type VI in Individuals from Northern Canada / Ward L, Bardai G, Moffatt P, et al. / *Calcif Tissue Int.* – 2016. – V.98. – P. 566–572. doi: 10.1007/s00223-016-0110-1.
200. Warman ML. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision / Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C et al. // *Am J Med Genet A.* – 2011 - V.5. - P.943-968. doi: 10.1002/ajmg.a.33909.
201. Warman ML. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision / ML Warman, V Cormier-Daire, C Hall, et al. // *Am J Med Genet A.*–2011.- V.5. – P.943-68. doi: 10.1002/ajmg.a.33909
202. Weil UH. Osteogenesis imperfecta: historical background. / Weil U.H. et al. // *Clin Orthop Relat Res.* – 1981. – V. 159. - P.6-10.

203. Weinstein RS. Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy / Weinstein RS, Robertson PK, Manolagas SC, et al. // N Engl J Med. – 2009. - V.360. - P. 53-62. doi: 10.1056/NEJMoa0802633.
204. Wilcox WR. Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects / Wilcox WR. et al. // Am J Hum Genet. – 2003. V.72. – P.503–504.
205. Witecka, J. Two novel *COL1A1* mutations in patients with osteogenesis imperfecta - *№OI* affect the stability of the collagen type I triple-helix / Witecka, J., Auguściak-Duma A.M., Kruczek, A. et al. // J Appl Genet - 2008. – V. 49 – P. 283–295. doi:10.1007/BF03195625
206. Wu, D. A novel variant of the *IFITM5* gene within the 5'-UTR causes neonatal transverse clavicular fracture: Expanding the genetic spectrum / Wu, D., Wang, Y., Huang, H. et al. // Mol. Genet. Genom. Med. – 2020 – V.8. - P.1287. doi: 10.1002/mgg3.1287.
207. Zhang M. Statistical features of human exons and their flanking regions / Zhang M. et al. // Hum Mol Genet. – 1998 -V. 7 – P. 919-932. doi: 10.1093/hmg/7.5.919.
208. Zhang ZY. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. / ZY Zhang, SH Teoh, MS Chong, et al. // Biomaterials. - 2010. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.078.
209. Zhytnik L. *IFITM5* pathogenic variant causes osteogenesis imperfecta V with various phenotype severity in Ukrainian and Vietnamese patients / Zhytnik L, Maasalu K, Duy BH. et al. // Hum Genomics. - 2019 – V. 3. – V.13- №1 – P.25. doi: 10.1186/s40246-019-0209-3.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение А

Таблица А.1 - Патогенные мутации, обнаруженные при помощи NGS-технологии

Ген	№	dbSNP	Мутация и белковый эффект	Эффект мутации	Ссылки, если вариант ранее описан
<i>COL1A1</i>	1	rs72667023	c.579delT, p.Gly194Valfs	делеция	Swinnen et al., 2009
					Zhang et al., 2011
					Fuccio et al., 2011
					Venturi et al., 2006
					Lindahl et al., 2015
					Lin et al., 2015
					Rolvien et al., 2018
					Zhytnik et al. 2019
					Nadyrshina et al., 2012
	2		c.2444delG, p.Gly815Alafs	делеция	Kataoka et al., 2007
				Nadyrshina et al., 2012	

	3		c.375dupC, p.Ala126fs	дуплика ция	Впервые выявлена
	4		c.407dupG, p.Gly136fs		Впервые выявлена
	5	-	c.358C>T, p.Arg120*	нонсенс- мутации	Bardai et al., 2016,
	6	rs72667036	c.658C>T, p.Arg220*		Gentile et al., 2013
Lin et al., 2015					
Zhang et al., 2015					
Zhang et al., 2011					
Körkkö et al., 1998					
Lindahl et al., 2015					
	7	rs72645318	c.757C>T, p.Arg253*		Ries-Levavi et al., 2004
Venturi et al., 2006					
Lindahl et al., 2015					
Mauri et al., 2016					
	8	-	c.967G>T, p.Gly323*		Nadyrshina et al., 2012

	9	rs72645366	c.1081C>T, p.Arg361*		Körkkö et al., 1998
					Benušienė and Kucinskas, 2003
					Roschger et al., 2008
					Zhang et al., 2011
					Lindahl et al., 2015,
					van Dijk et al, 2011
					Zhytnik et al. 2019
					Nadyrshina et al., 2012
	10	rs72648326	c.1243C>T, p.Arg415*		Willing et al., 1996,
					Ries-Levavi et al., 2004,
					Reis et al., 2005
					Lindahl et al., 2015
					Hruskova et al., 2016
	11	rs72648329	c.1265G>C	p.Gly4 22Ala	Marini et al., 2007

12	rs76242888 9	c.1405C>T, p.Arg469*		Swinnen et al., 2009
				Rauch et al., 2014
13	rs72653161	c.2869C>T, p.Gln957*		Ries-Levavi et al., 2004,
				Nadyrshina et al., 2012
14	rs72653173	c.3076C>T, p.Arg1026*		Ries et al., 2000
				Ries-Levavi et al., 2004
				Hartikka et al., 2004
				Gentile et al., 2013,
				Zhang et al., 2011
				Niramitmahapa nya et al., 2013
				Lin et al., 2015
				Kaneto et al., 2014
Duan et al., 2016				

	15	-	c.3792delG, p.Met1264fs	Мутация сдвига рамки считыван ия	Впервые выявлена
	16	rs67569268	c.858+1G>A		Körkkö et al., 1998
	17	rs72648337	c.1354-12G>A		Körkkö et al., 1998
Marini et al., 2007					
Lindahl et al., 2015,					
Lin et al., 2015					
	18	-	c.1265G>C, p.Gly422Ala	миссенс- мутация	Marini et al., 2007
	19	rs67693971	c.2461G>A, p.Gly821Ser		Marini et al., 2007
Lund et al., 1997					
Wang et al., 2006					
Venturi et al., 2006					
Lee et al., 2006					
					Zhang et al., 2011

					Fuccio et al., 2011
					Lin et al., 2015
					Lindahl et al., 2015
					Kloen et al., 2018
					Mohd Nawawi et al., 2018
					Ho Duy et al., 2016,
	20	rs72653141	c.2569G>T, p.Gly857Cys		Marini et al., 2007
					Wang et al., 2015
COL1A2	1		c.647G>A, p.Arg216His	миссенс- мутация	Впервые выявлена
	2	-	c. 874G>A, p.Gly292Ser		Lindahl et al., 2015, Ho Duy et al., 2016 Rolvien et al., 2018
	3	rs72656392	c.946G>C, p.Gly316Arg		Marini et al., 2007
	4	-	c.1826G>A, p.Arg609Gln		Впервые выявлена

	5		c.1197+5G>A		Lindahl et al., 2015,	
					Marini et al., 2007	
					Nicholls et al., 1996	
	6	-	c. 2341G>C, p.Gly781Arg		Впервые выявлена	
	7	-	c. 2756G>A, p.Gly919Asp		Barkova et al., 2014	
	8	-	c.2971G>C, p.Gly991Arg		Впервые выявлена	
	9	rs72659319		c.3034G>A, p.Gly1012Ser		Marini et al., 2007
						Marini et al., 1993
						Sztrolovics et al., 1993
Forlino et al., 1997						
Hartikka et al., 2004						
Lee et al., 2006						
Lindahl et al., 2015,						
Ho Duy et al., 2016						

					Stephen et al., 2015
					Mohd Nawawi et al., 2018,
	10	-	c.3277G>A, p.Gly1093Ser		Впервые выявлена
	11	-	c.3977A>G, p.Lys1326Arg		Впервые выявлена
	12	-	c.1897_1902dupG CTGGT, p.Ala633_Gly634d up	дупли кация	Впервые выявлена
<i>P3H1</i>	1	-	c.1051G>T, p.Glu351*	нонсе нс- мутац ия	Впервые выявлена
<i>IFITM5</i>	1	-	c.-14C>T	мутац ия старто вого кодон а	Semler et al., 2012 Balasubramanian et al., 2013 Cho et al., 2012 Grover et al., 2013 Takagi et al., 2013 Kim et al., 2013 Zhang et al., 2013 Guillén-Navarro et al., 2014,

					Rauch et al., 2014
					Lazarus et al., 2014
<i>LAMB3</i>	rs80356682	c.1903C>T, -			Nakano A et al., 2000
					Pulkkinen L. et al., 1997
					Kivirikko S. et al., 1996
					Hauschild R et al., 2001
					Gache Y et al., 2001
					Cserhalmi- Friedman PB et al., 2001
					Pulkkinen L et al., 1994
<i>ERCC4</i>	rs12191304 9	c.2395C>T, p.Arg799Trp			Sijbers AM et al., 1996
					Manandhar M et al., 2015
					Shanbhag NM et al., 2018
					Doi H et al., 2018

				Dobbins SE et al., 2016
				Shindo K et al., 2017
				Chandrasekhara ppa S et al., 2017
				Carré G et al., 2017
				Marelli C et al., 2016
				Mori T et al., 2018
				Ahmad A et al., 2010
				Kashiyama K et al., 2013
				Sijbers AM et al., 1998
<i>PTH1R</i>			c.342C>A, p.His114Gln	Впервые выявлена
<i>ALOX12B</i>		rs14903905 3	c.526G>A, p.Glu176Lys	Nadyrshina D et al., 2022
				Hotz A et al., 2021
				Nolan D et al., 2016

<i>ARSB</i>	rs99110452 5	c.454C>T, p.Arg152Trp	Tomanin R et al., 2018
			Karageorgos L et al., 2007
			Jurecka A et al., 2011
			Jurecka A et al., 2012
			Jurecka A et al., 2013
			Jurecka A et al., 2014
			Voskoboeva Elu et al., 2000
			Thümler A et al., 2012
			Chistiakov DA et al., 2014
<i>PLEKH M1</i>		c.2902-9C>T	Впервые выявлена
<i>SGMS2</i>	rs15606673 89	c.148C>T, p.Arg50*	Jaakkola E et al., 2009
<i>TGFB1</i>		c.945G>C, p.Lys315Asn	Pekkinen M et al., 2019
<i>CLCN7</i>		c.141+4A>C	Впервые выявлена

Примечание. Жирным шрифтом выделены впервые выявленные мутации

Таблица А.2 – Мутации и тип наследования в исследованных семьях

Семья	Пациент	Количество мутаций	Мутация	Тип наследования
<i>COL1A1</i>				
1	1	1	c.358C>T, p. Arg120*	<i>de novo</i>
2	2	2	c.375dupC, p. Ala126fs	<i>de novo</i>
3	3	3	c.407dupG, p. Gly136fs	<i>de novo</i>
4	4	4	c.579delT, p. Gly194Valfs	АД
	5		c.579delT, p. Gly194Valfs	
5	6		c.579delT, p. Gly194Valfs	<i>de novo</i>
6	7	5	c.658C>T, p. Arg220*	нет ДНК родителей
7	8	6	c.757C>T, p. Arg253*	нет ДНК родителей
8	9	7	c.858+1G>A	нет ДНК родителей
9	10	8	c.967G>T, p. Gly323*	АД
	11		c.967G>T, p. Gly323*	
10	12	9	c.1081C>T, p. Arg361*	АД
	13		c.1081C>T, p. Arg361*	
11	14	10	c.1243C>T, p. Arg415*	<i>de novo</i>
12	15	11	c.1265G>C, Gly422Ala	нет ДНК родителей
13	16		c.1265G>C, Gly422Ala	нет ДНК родителей
14	17	12	c.1354-12G>A	АД
	18		c.1354-12G>A	

15	19	13	c.1405C>T, Arg469*	нет ДНК родителей
16	20	14	c.2444delG, p.Gly815Alafs	нет ДНК родителей
17	21	15	c.2461G>A, p.Gly821Ser	нет ДНК родителей
18	22	16	c.2569G>T, p.Gly857Cys	нет ДНК родителей
19	23	17	c.2869C>T, p.Gln957*	АД
	24		c.2869C>T, p.Gln957*	
20	25	18	c.3076C>T, p.Arg1026*	<i>de novo</i>
21	26		c.3076C>T, p.Arg1026*	нет ДНК родителей
22	27	19	c.3792delG, p.Met1264fs	<i>de novo</i>
COL1A2				
23	28	20	c.647G>A, p.Arg216His	нет ДНК родителей
24	29	21	c.874G>A, p.Gly292Ser	нет ДНК родителей
15	30	22	c.946G>C, p.Gly316Arg	АД
5	6	23	c.1197+5G>A	<i>de novo</i>
25	31	24	c.1826G>A, p.Arg609Gln	АД
	32		c.1826G>A, p.Arg609Gln	
26	33	25	c.1897_1902dupGCTGGT, p.Ala633_Gly634dup	нет ДНК родителей
27	34	26	c.2341G>C, p.Gly781Arg	<i>de novo</i>

28	35	27	c.2756G>A, p.Gly919Asp	АД
	36		c.2756G>A, p.Gly919Asp	
29	37	28	c.2971G>C, p.Gly991Arg	АД
	38		c.2971G>C, p.Gly991Arg	
30	39	29	c.3034G>A, p.Gly1012Ser	АД
	40		c.3034G>A, p.Gly1012Ser	
31	41	30	c.3277G>A, p.Gly1093Ser	<i>de novo</i>
32	42	31	c.3977A>G, p.Lys1326Arg	АД
	43		c.3977A>G, p.Lys1326Arg	
<i>IFITM5</i>				
33	44	32	c.-14C>T	<i>de novo</i>
34	45		c.-14C>T	<i>de novo</i>
35	46		c.-14C>T	<i>de novo</i>
<i>P3H1</i>				
36	47	33	c.1051G>T, p.Glu351*	<i>de novo</i>
Мутации в других генах				
37	48	34	<i>ERCC4</i> c.2395C>T (p.Arg799Trp)	Не установлен
38	49	35	<i>PTH1R</i> c.342C>A, p.His114Gln	Не установлен
39	50	36	<i>ALOX12B</i> c.526G>A, p.Glu176Lys	Не установлен
40	51	37	<i>ARSB</i> c.454C>T, p.Arg152Trp	Не установлен

41	52	38	<i>PLEKHM1</i> с.2902-9C>T	Не установлен
42	53	39	<i>SGMS2</i> с.148C>T, р. Arg50*	Не установлен
		40	<i>TGFB1</i> с.945G>C, р.Lys315Asn	Не установлен
43	54	41	<i>CLCN7</i> с.141+4A>C	Не установлен
29	38	42	<i>FGF23</i> с.G212C, р.Ser71Thr	Не установлен
35	46	43	<i>LAMB3</i> с.1903C>T	Не установлен
Исключили				
44	55	-	Релевантных вариантов не обнаружено	
45	56	-	Релевантных вариантов не обнаружено	
46	57	-	Релевантных вариантов не обнаружено	
47	58	-	Релевантных вариантов не обнаружено	
48	59	-	Релевантных вариантов не обнаружено	
49	60	-	Релевантных вариантов не обнаружено	
50	61	-	Релевантных вариантов не обнаружено	
51	62	-	Релевантных вариантов не обнаружено	
52	63	-	Релевантных вариантов не обнаружено	
53	64	-	Релевантных вариантов не обнаружено	
Пациенты без молекулярных дефектов (в работе)				
54	65	-	Релевантных вариантов не обнаружено	

55	66	-	Релевантных вариантов не обнаружено
	67	-	Релевантных вариантов не обнаружено
56	68	-	Релевантных вариантов не обнаружено
57	69	-	Релевантных вариантов не обнаружено
58	70	-	Релевантных вариантов не обнаружено
59	71	-	Релевантных вариантов не обнаружено
60	72	-	Релевантных вариантов не обнаружено
61	73	-	Релевантных вариантов не обнаружено
62	74	-	Релевантных вариантов не обнаружено
63	75	-	Релевантных вариантов не обнаружено
64	76	-	Релевантных вариантов не обнаружено
65	77	-	Релевантных вариантов не обнаружено
66	78	-	Релевантных вариантов не обнаружено
67	79	-	Релевантных вариантов не обнаружено
68	80	-	Релевантных вариантов не обнаружено

Примечание. АД- Аутомоно-доминантный

Приложение Б

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ НЕЗАВЕРШЕННОГО ОСТЕОГЕНЕЗА

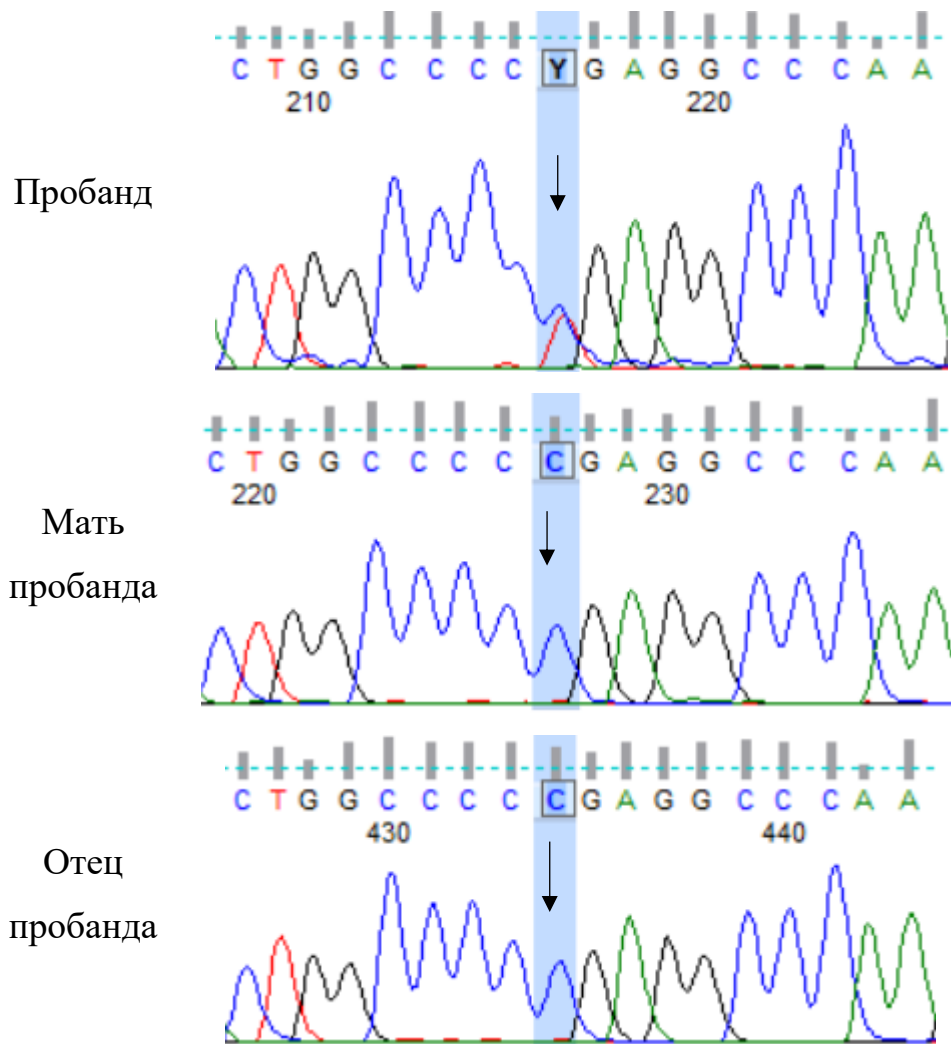


Рисунок Б.1 - Идентификация патогенного варианта с.358C>T (p.Arg120*) у пациента 1 в гетерозиготном состоянии в экзоне гена *COL1A1*

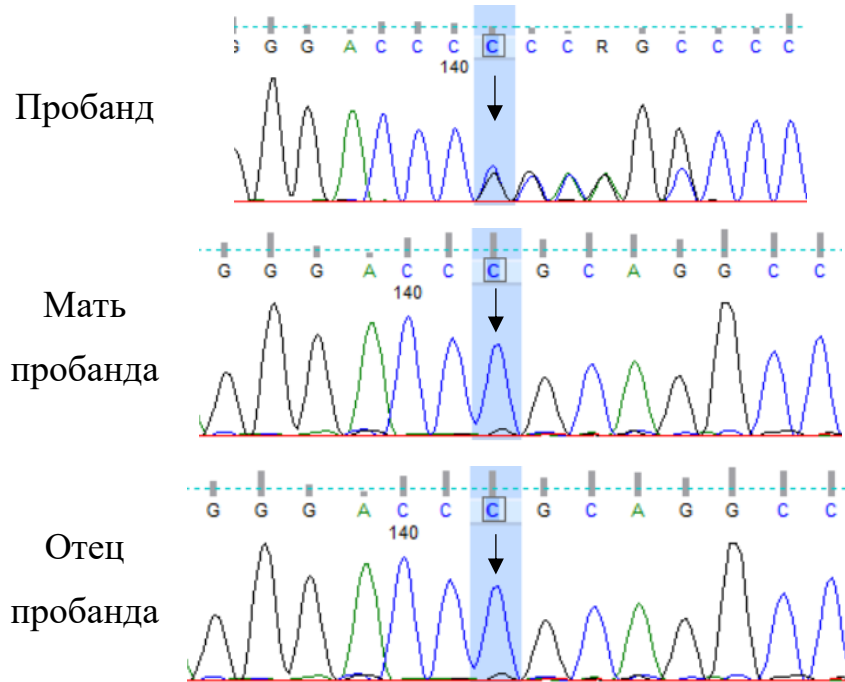


Рисунок Б.2 - Идентификация патогенного варианта с.375dupC (p.Ala126fs) в 5 экзоне гена *COL1A1* у пациента 2 и членов его семьи

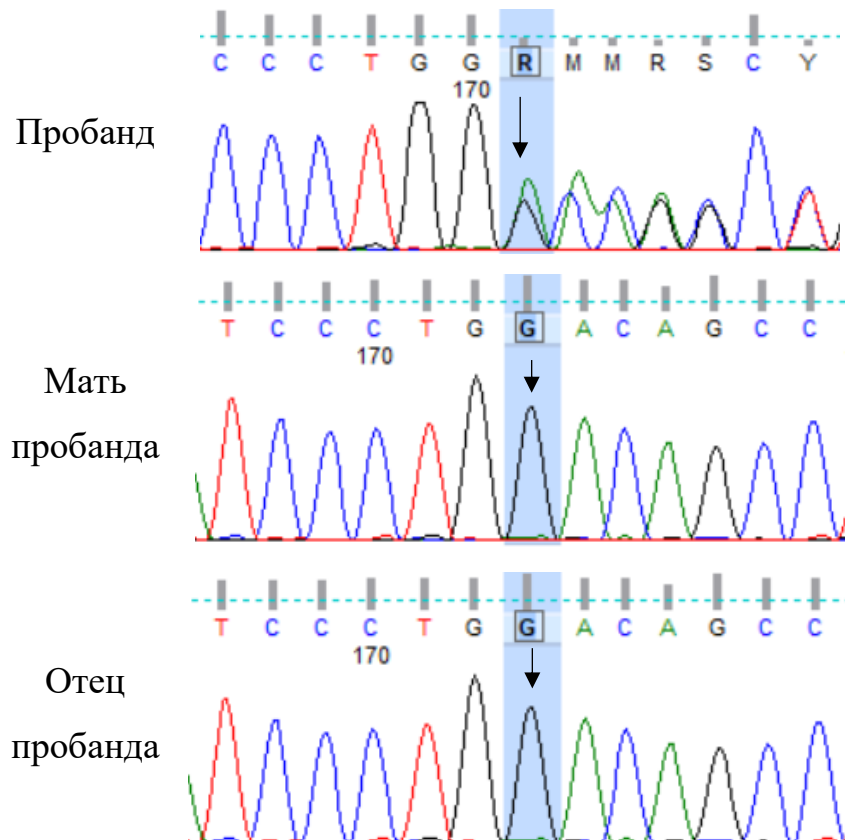


Рисунок Б.3 - Идентификация патогенного варианта с.407dupG (p.Gly136fs) в гетерозиготном состоянии в 5 экзоне гена *COL1A1* у пациента 3 и членов его семьи

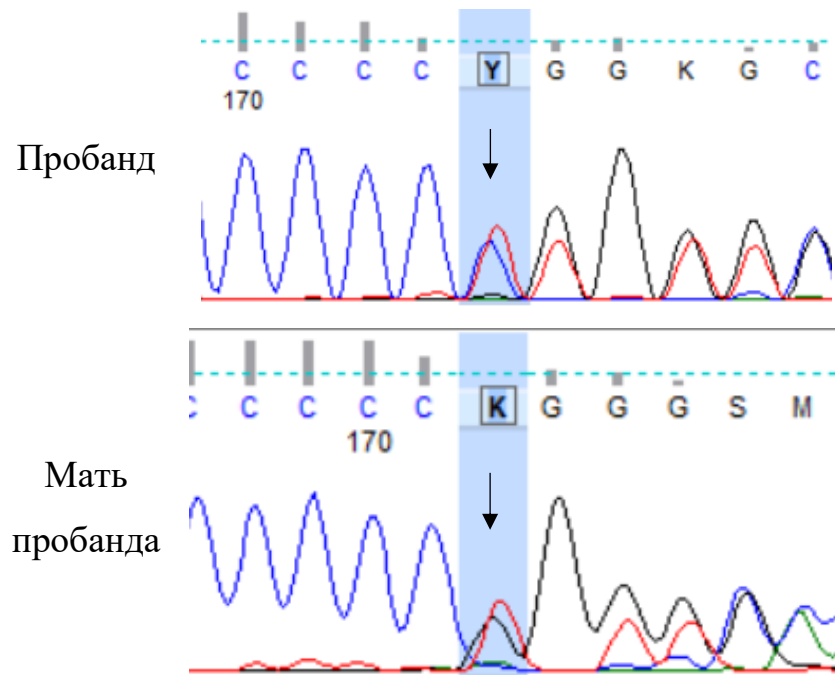


Рисунок Б.4 - Идентификация патогенного варианта с.579delT (p.Gly194Valfs) у пациента 4 в гетерозиготном состоянии в 7 экзоне гена *COL1A1*

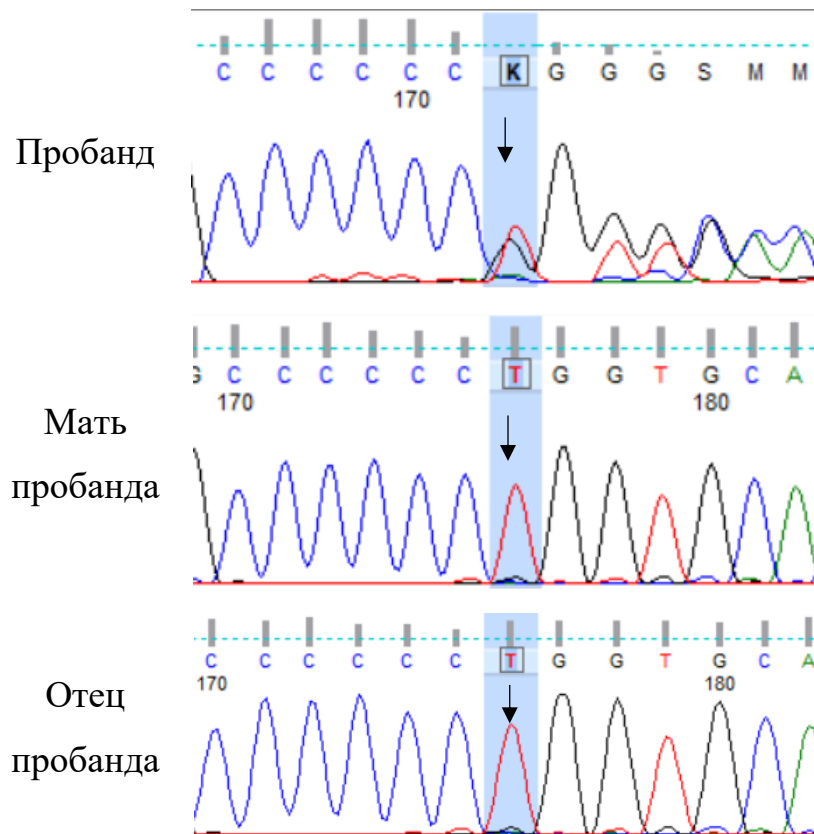


Рисунок Б.5 - Идентификация патогенного варианта с.579delT (p.Gly194Valfs) у пациента 6 в гетерозиготном состоянии в экзоне гена *COL1A1*

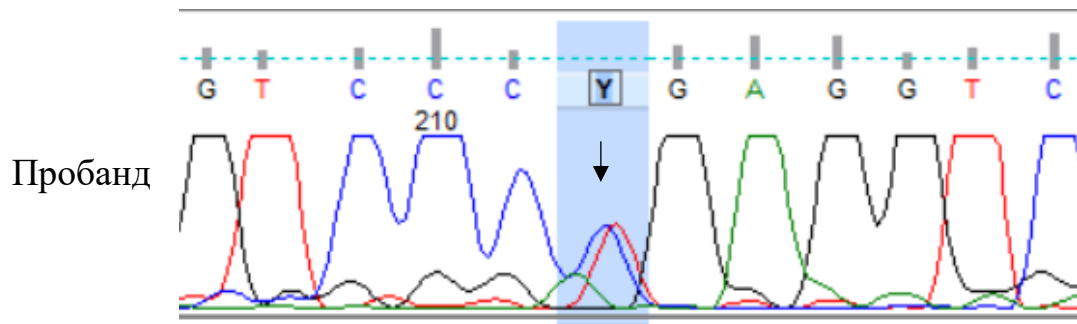


Рисунок Б.6 - Идентификация патогенного варианта с.658C>T (p.Arg220*) у пациента 7 в гетерозиготном состоянии в 9 экзоне гена *COL1A1*

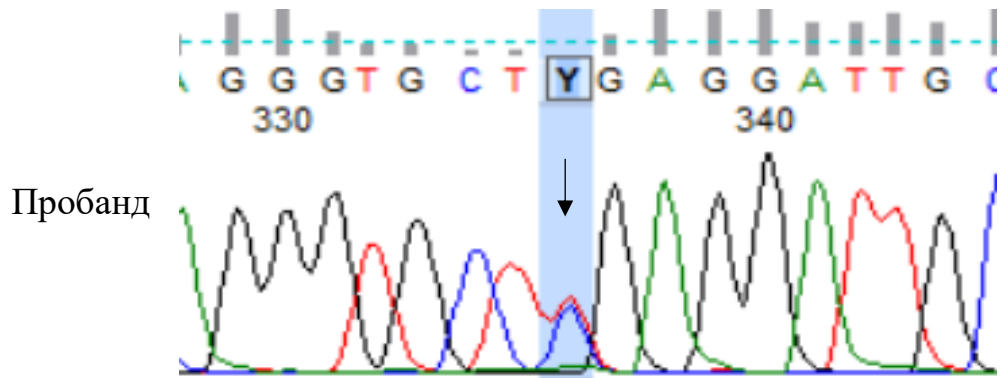


Рисунок Б.7 -Идентификация патогенного варианта с.757C>T (p.Arg253*) у пациента 8 в гетерозиготном состоянии в экзоне гена *COL1A1*

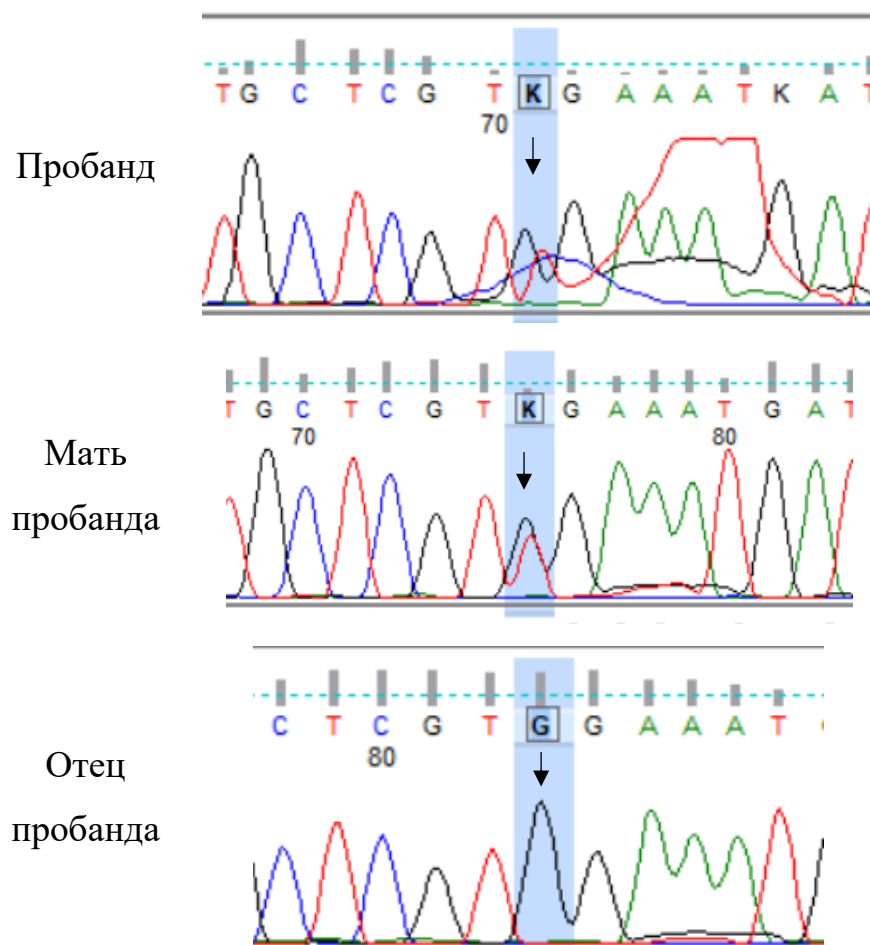


Рисунок Б.8 - Идентификация патогенного варианта с.967G>T (p.Gly323*) у пациента 11 в гетерозиготном состоянии в 15 экзоне гена *COL1A1*

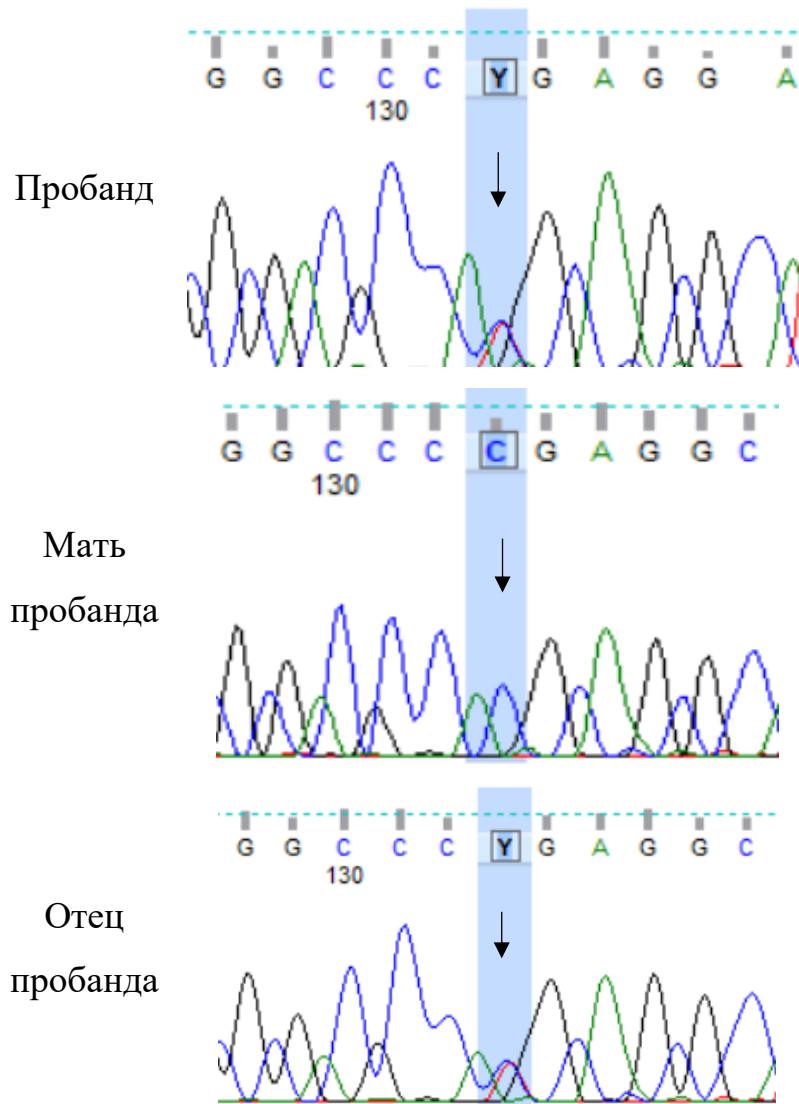


Рисунок Б. 9. Идентификация патогенного варианта с.1081C>Т (р.Arg361*) у пациента 12 в гетерозиготном состоянии в 17 экзоне гена *COL1A1*

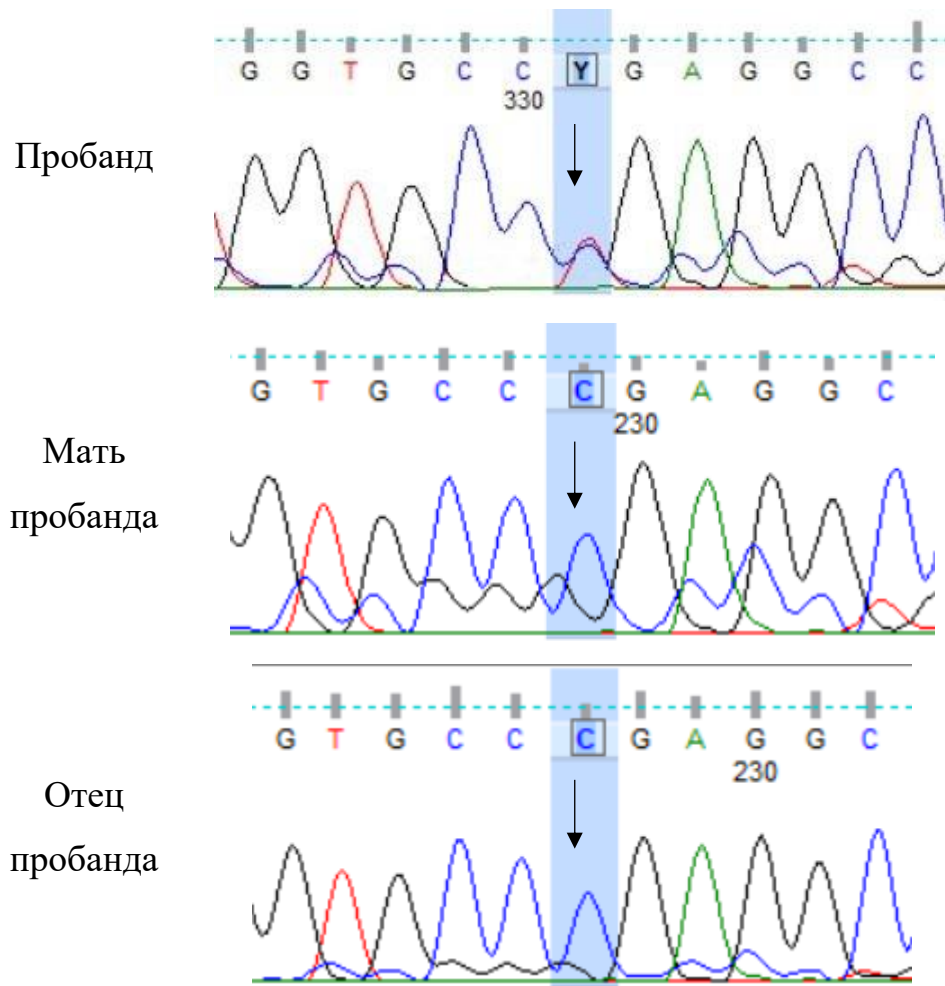


Рисунок Б.10 - Идентификация патогенного варианта с.1243C>T (p.Arg415*) у пациента 14 в гетерозиготном состоянии в экзоне гена *COL1A1*

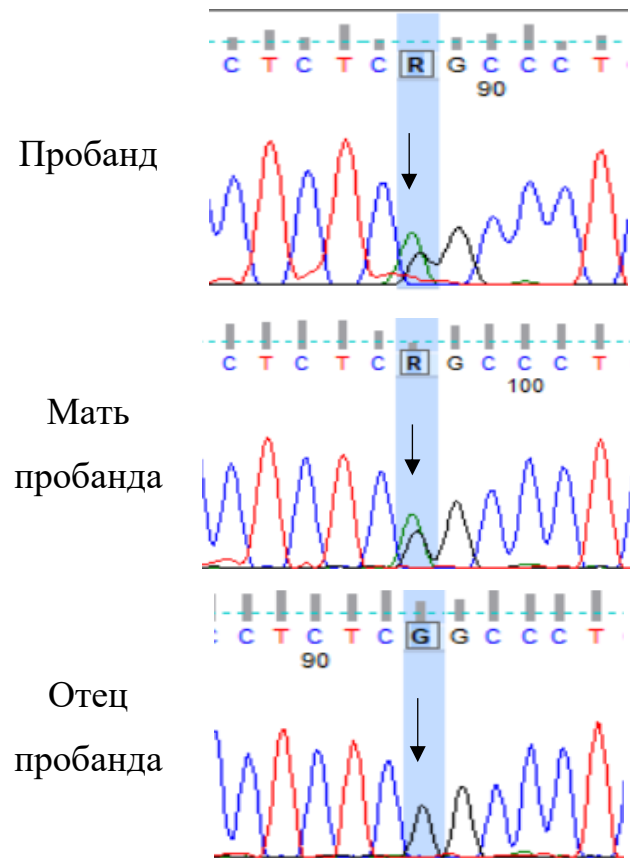


Рисунок Б.11 - Идентификация патогенного варианта с.1354-12G>Ау пациента 17 в гетерозиготном состоянии в 20 экзоне гена *COL1A1*

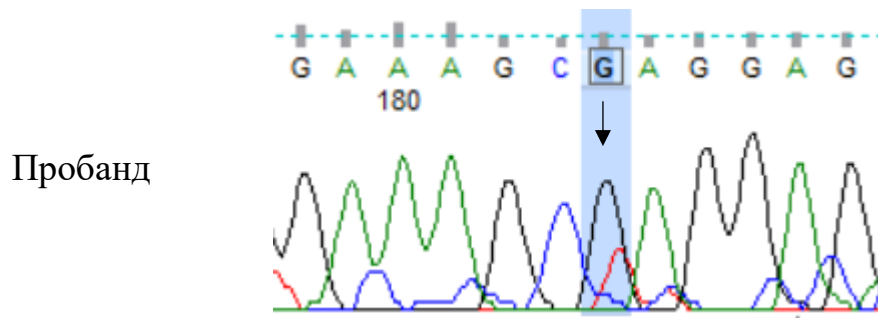


Рисунок Б.12 - Идентификация патогенного варианта с.1405C>Т (Arg469*) у пациента 19 в гетерозиготном состоянии в экзоне гена *COL1A1*

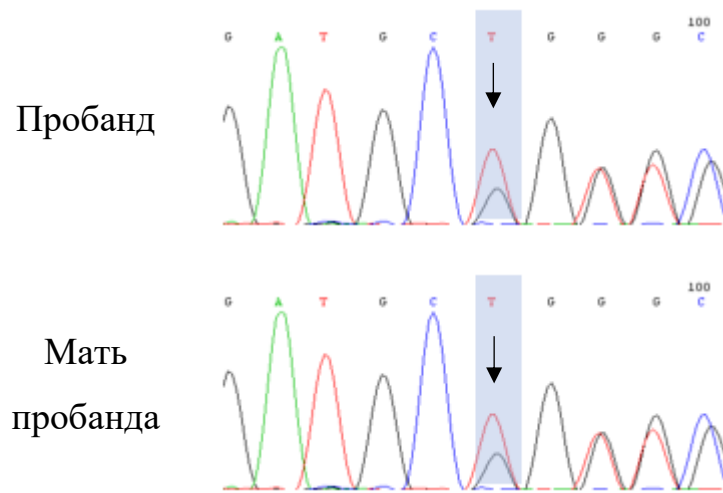


Рисунок Б.13 - Идентификация патогенного варианта с.2444delG (p.Gly815Alafs) у пациента 20 в гетерозиготном состоянии в 36 экзоне гена *COL1A1*

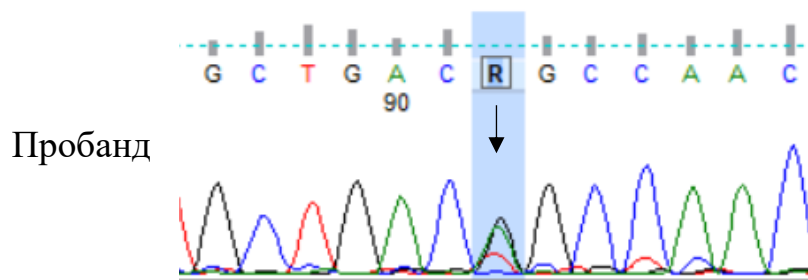


Рисунок Б.14 - Идентификация патогенного варианта с.2461G>A (p.Gly821Ser) у пациента 21 в гетерозиготном состоянии в 37 экзоне гена *COL1A1*

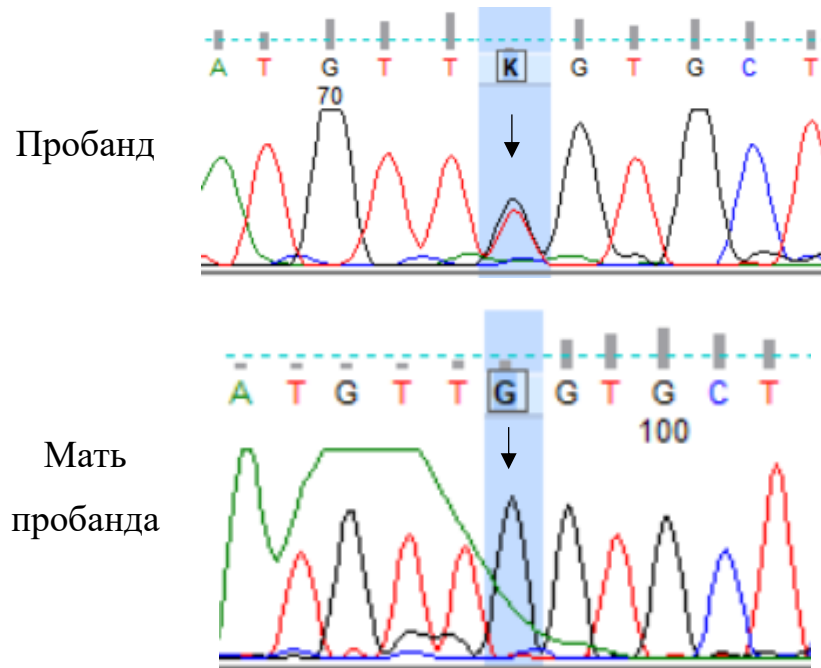


Рисунок Б.15 - Идентификация патогенного варианта с.2569G>T (p.Gly857Cys) у пациента 22 в гетерозиготном состоянии в 38 экзоне гена *COL1A1*

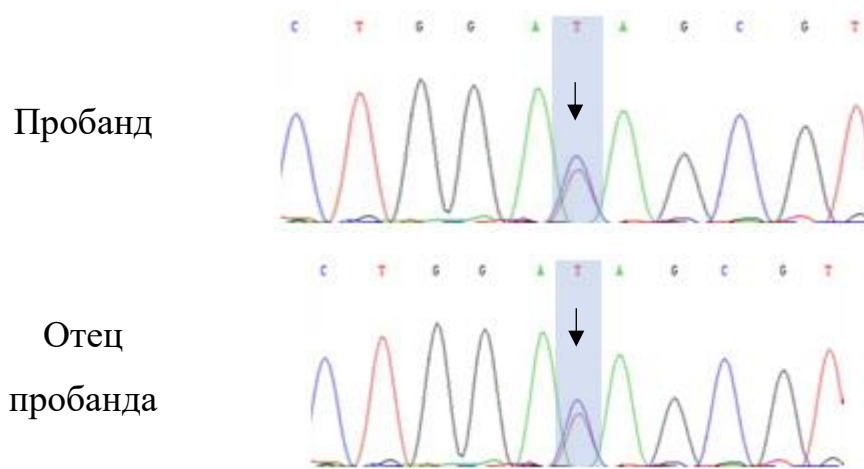


Рисунок Б. 16 - Идентификация патогенного варианта с.2869C>T (p.Gln957*) у пациента 23 в гетерозиготном состоянии в экзоне гена *COL1A1*

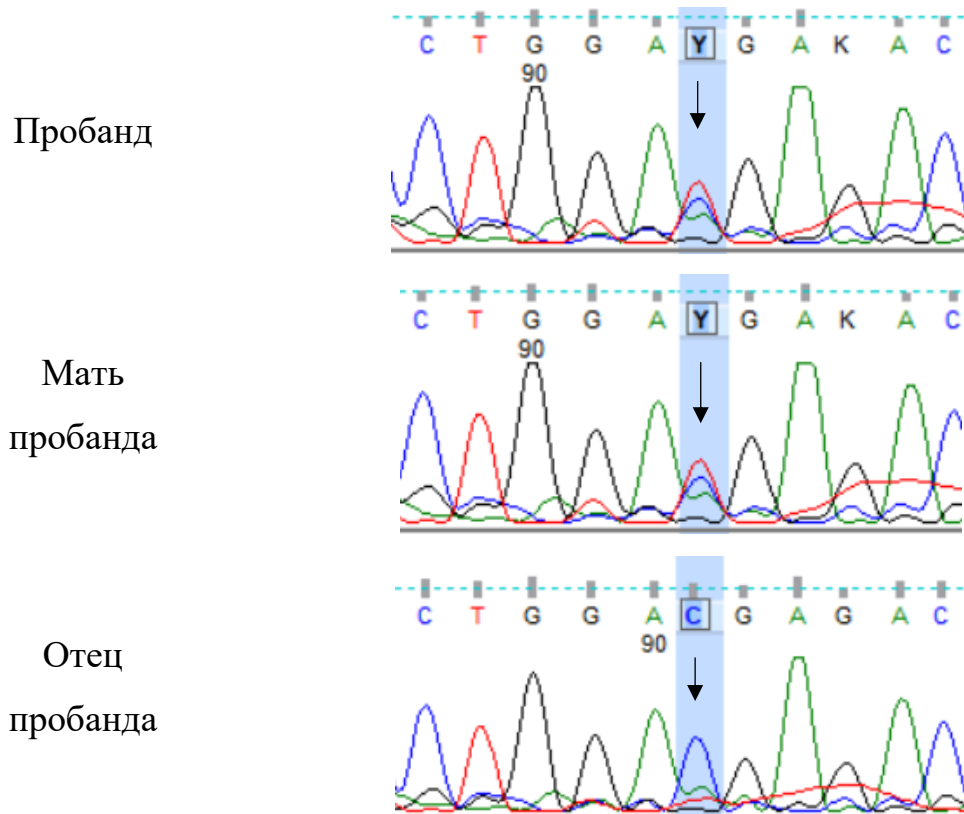


Рисунок Б.17 - Идентификация патогенного варианта с.3076C>T (p.Arg1026*) у пациента 25 в гетерозиготном состоянии в 42 экзоне гена *COL1A1*

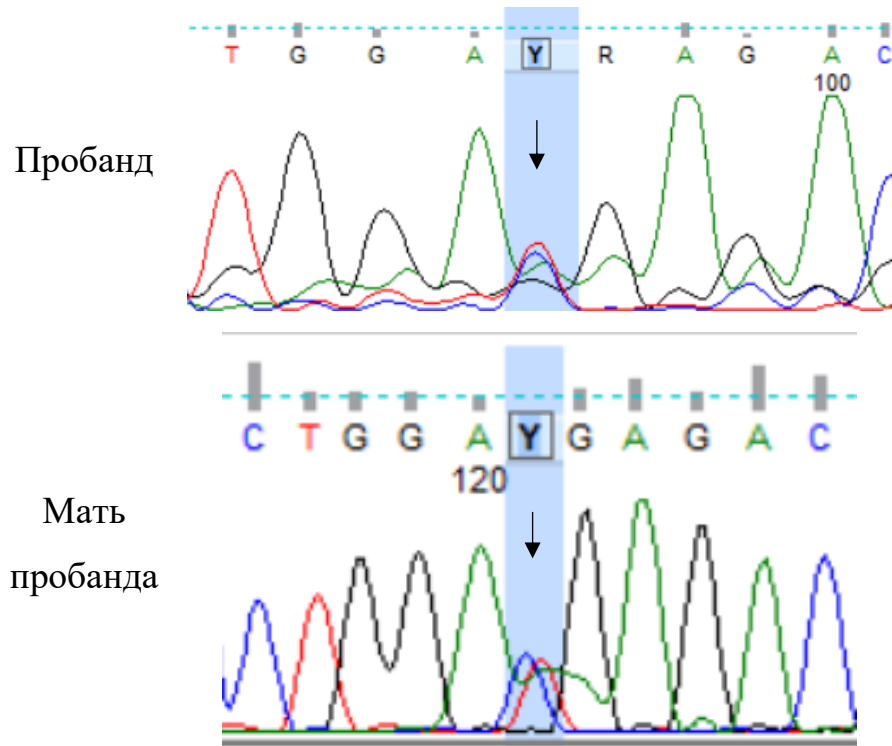


Рисунок Б.18 - Идентификация патогенного варианта с.3076C>T (p.Arg1026*) у пациента 26 в гетерозиготном состоянии в 42 экзоне гена *COL1A1*

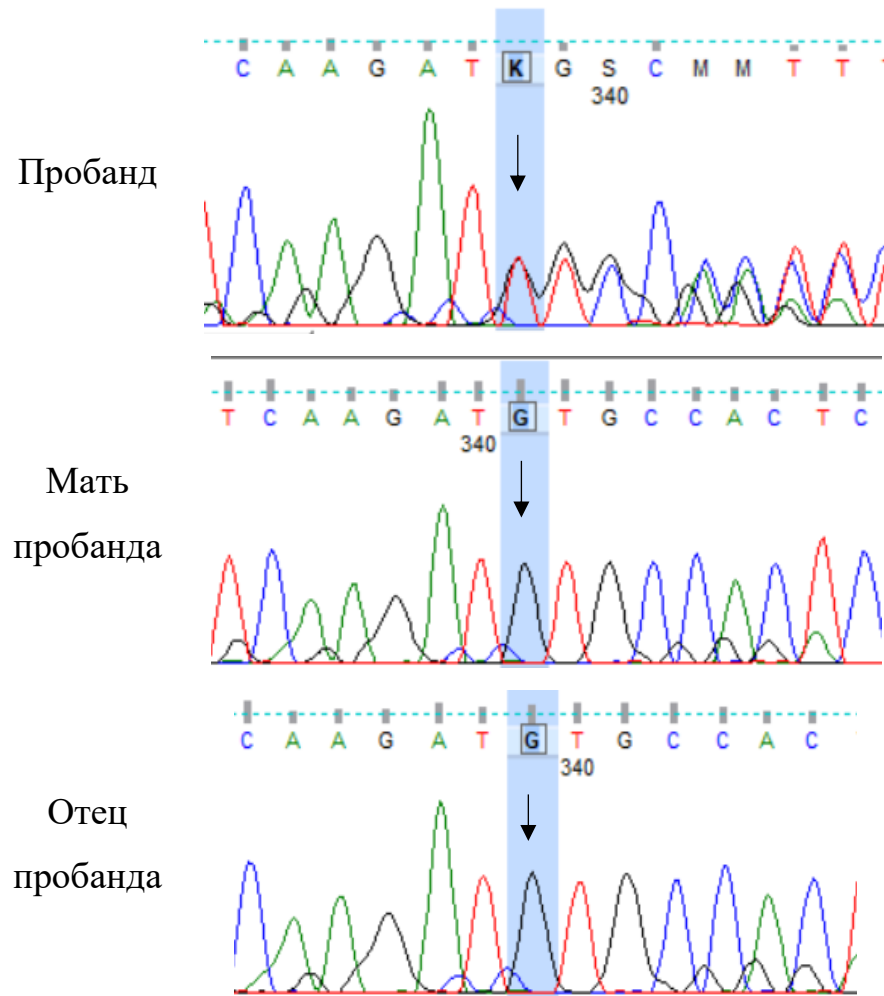


Рисунок Б.19 - Идентификация патогенного варианта с.3792delG (p.Met1264fs) у пациента 27 в гетерозиготном состоянии в 48 экзоне гена *COL1A1*

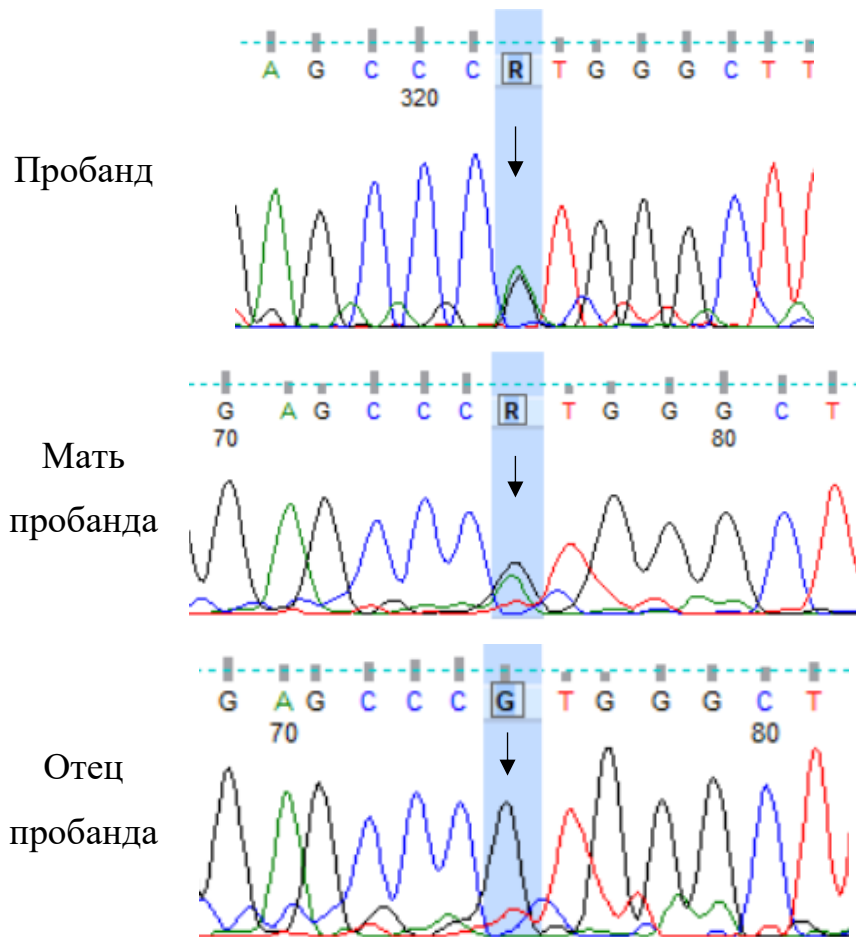


Рисунок Б.20 - Идентификация патогенного варианта с.647G>A (p.Arg216His) у пациента 28 в гетерозиготном состоянии в 14 экзоне гена *COL1A2*

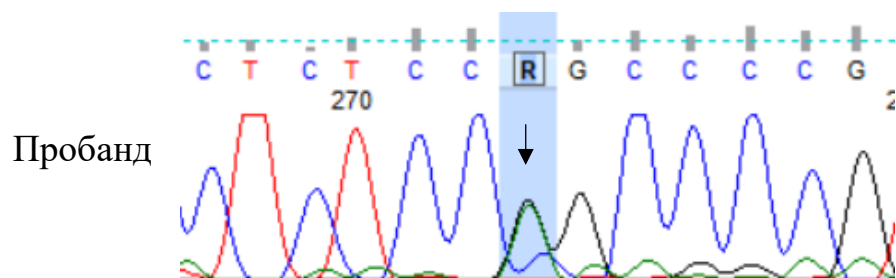


Рисунок Б.21 - Идентификация патогенного варианта с.874G>A (p.Gly292Ser) у пациента 29 в гетерозиготном состоянии в 17 экзоне гена *COL1A2*

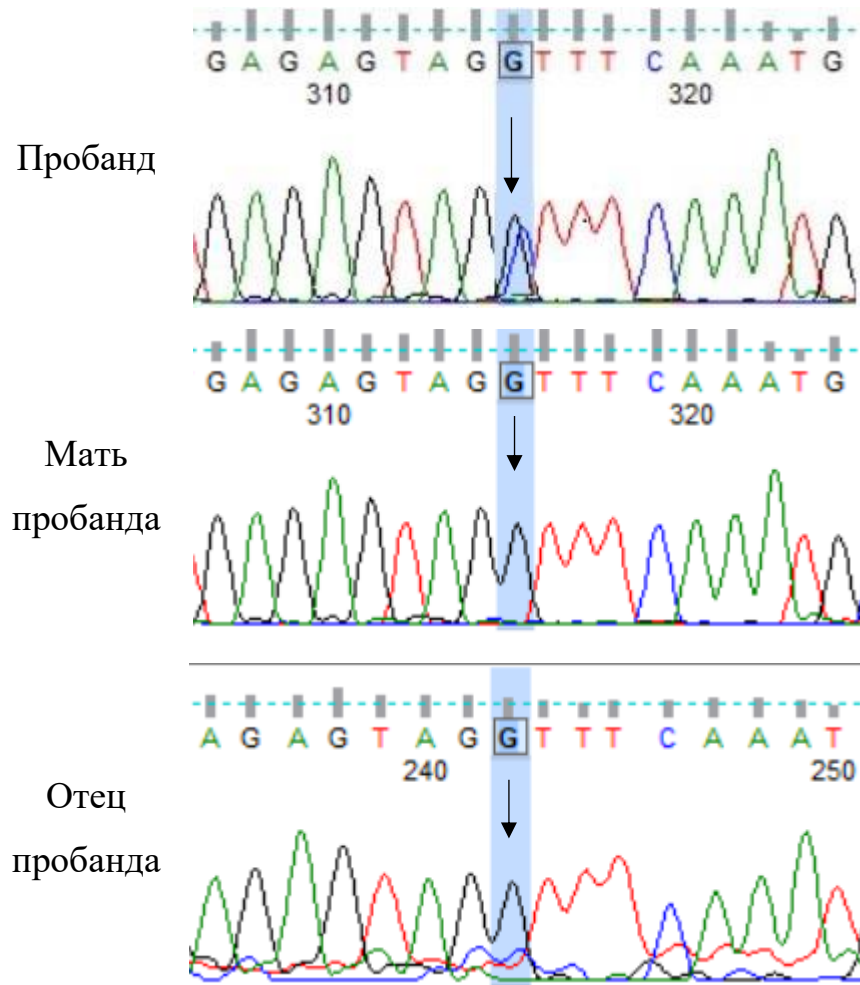


Рисунок Б.22 - Идентификация патогенного варианта с.1197+5G>A у пациента б в гетерозиготном состоянии в 21 экзоне гена *COL1A2*

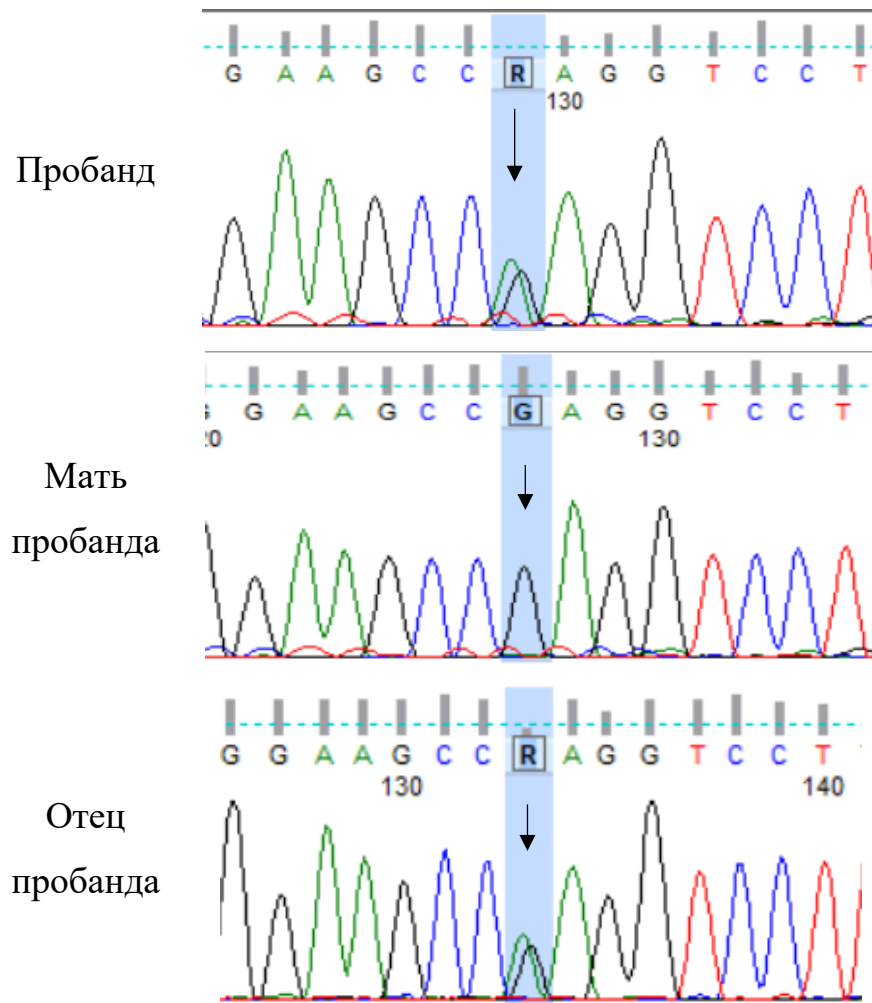


Рисунок Б.23 - Идентификация патогенного варианта с.1826G>A (p.Arg609Gln) у пациента 31 в гетерозиготном состоянии в 31 экзоне гена *COL1A2*

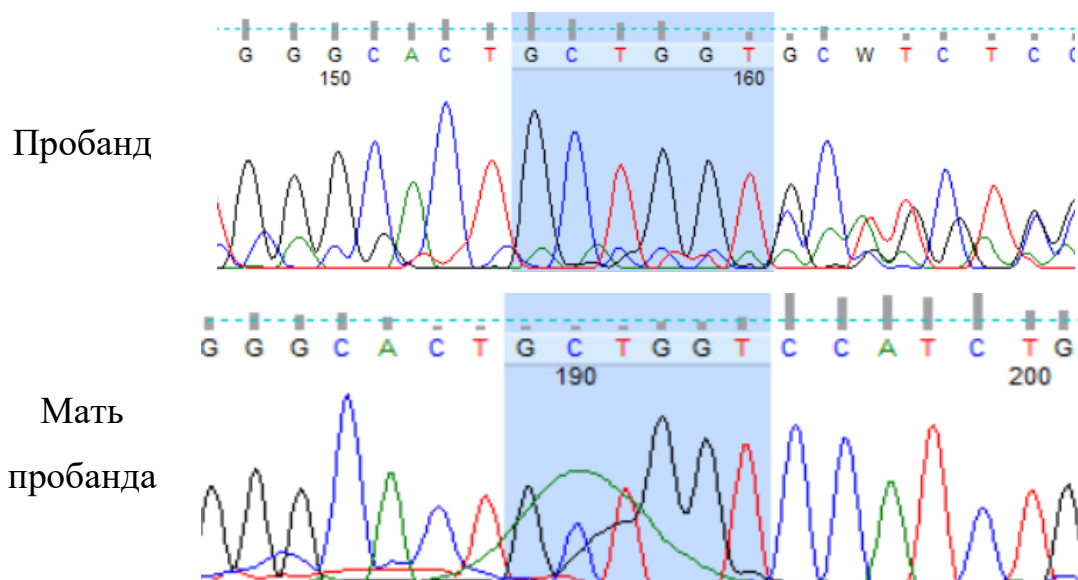


Рисунок Б.24 - Идентификация патогенного варианта с.1897_1902dupGCTGGT (p.Ala633_Gly634dup) у пациента 33 в гетерозиготном состоянии в 32 экзоне гена *COL1A2*

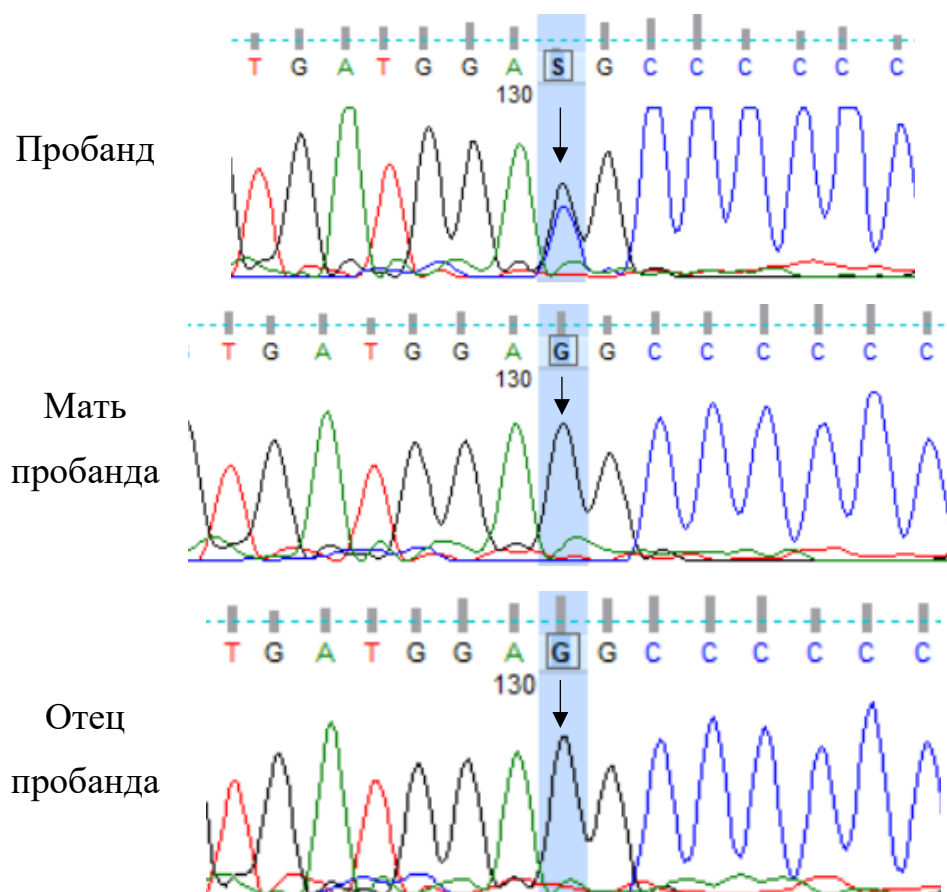


Рисунок Б.25 - Идентификация патогенного варианта с.2341G>C (p.Gly781Arg) у пациента 34 в гетерозиготном состоянии в 38 экзоне гена *COL1A2*

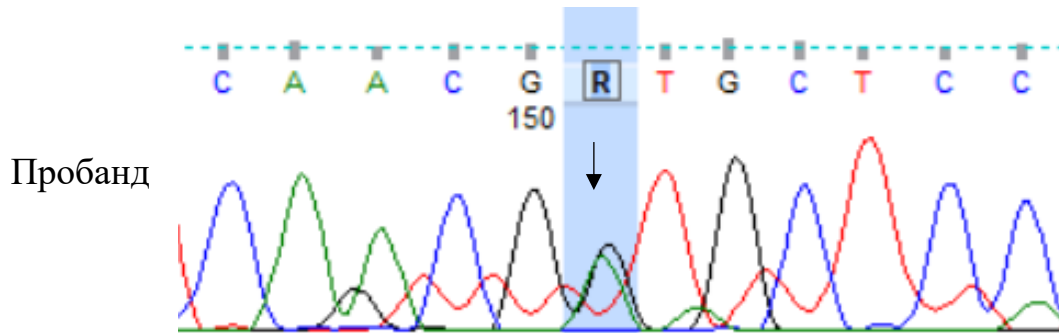


Рисунок Б.26 - Идентификация патогенного варианта с.2756G>A (p.Gly919Asp) у пациента 35 в гетерозиготном состоянии в 38 экзоне гена *COL1A2*

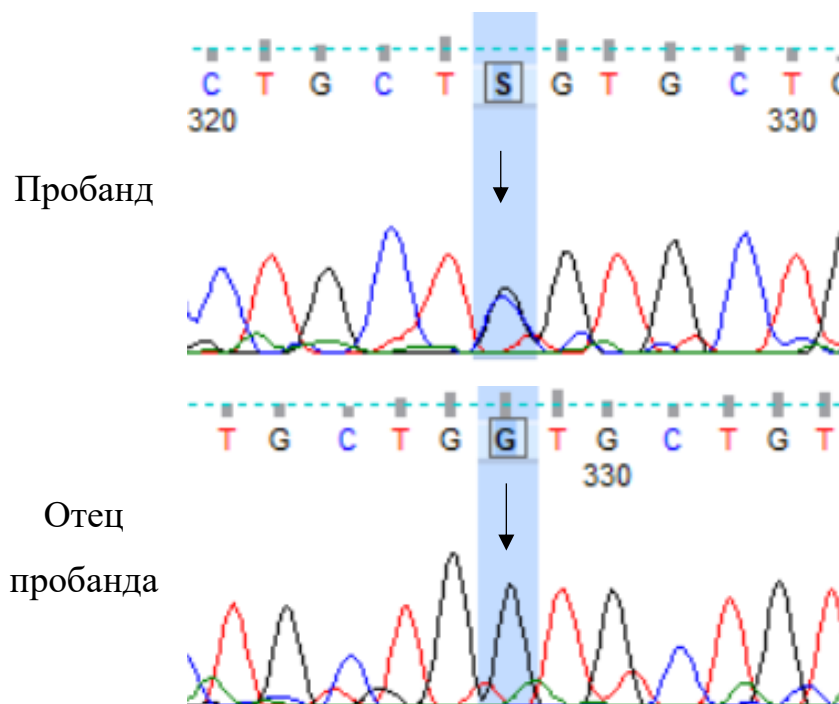


Рисунок Б.27 - Идентификация патогенного варианта с.2971G>C (p.Gly991Arg) у пациента 37 в гетерозиготном состоянии в 45 экзоне гена *COL1A2*

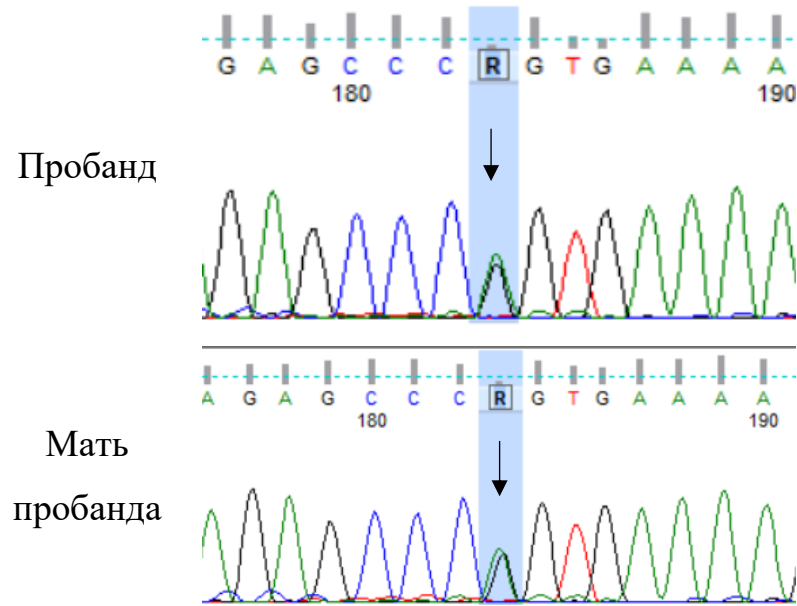


Рисунок Б.28 - Идентификация патогенного варианта с.3034G>A (p.Gly1012Ser) у пациента 39 в гетерозиготном состоянии в 46 экзоне гена *COL1A2*

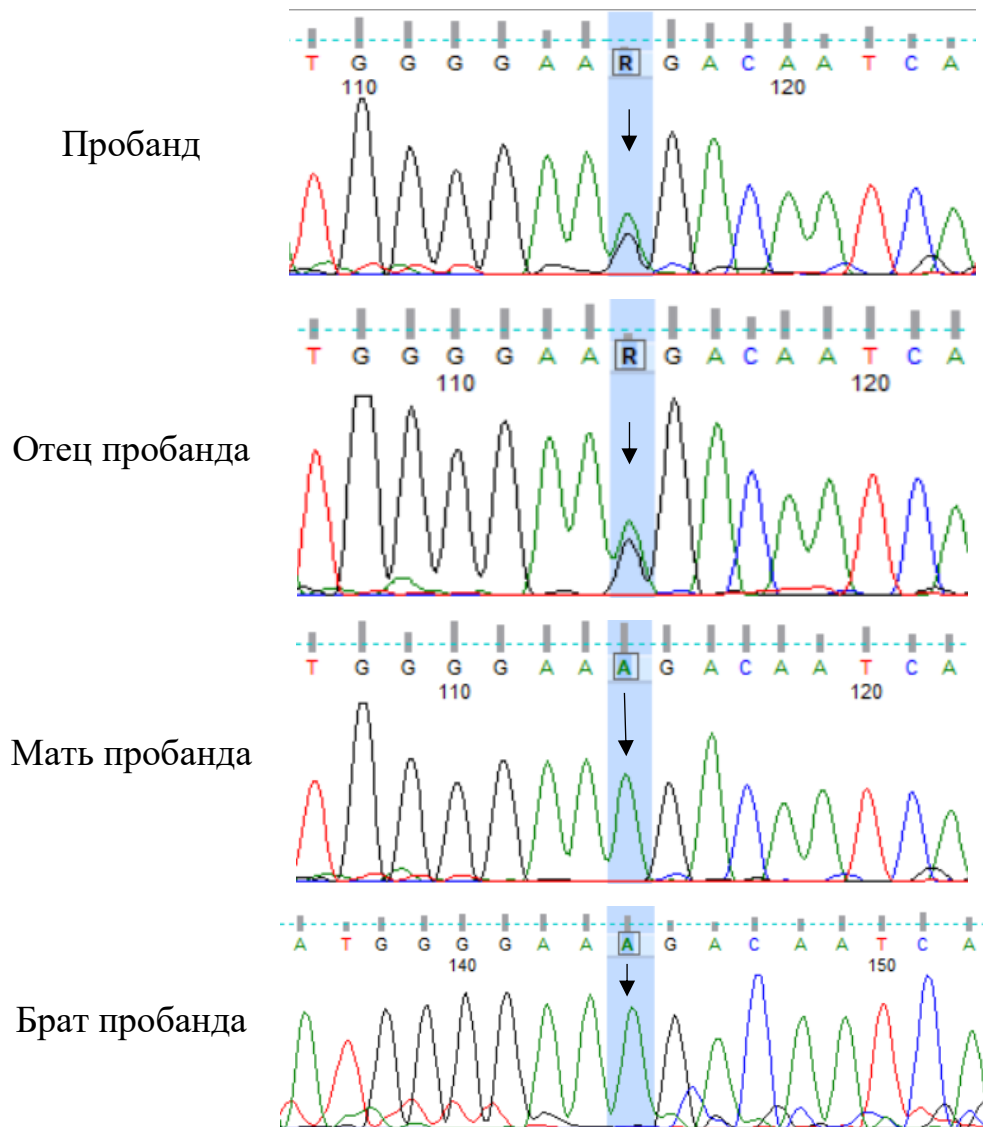


Рисунок Б.29 - Идентификация патогенного варианта с.3977A>G (p.Lys1326Arg) в гетерозиготном состоянии в 52 экзоне гена *COL1A2* у пациента 42 и членов его семьи

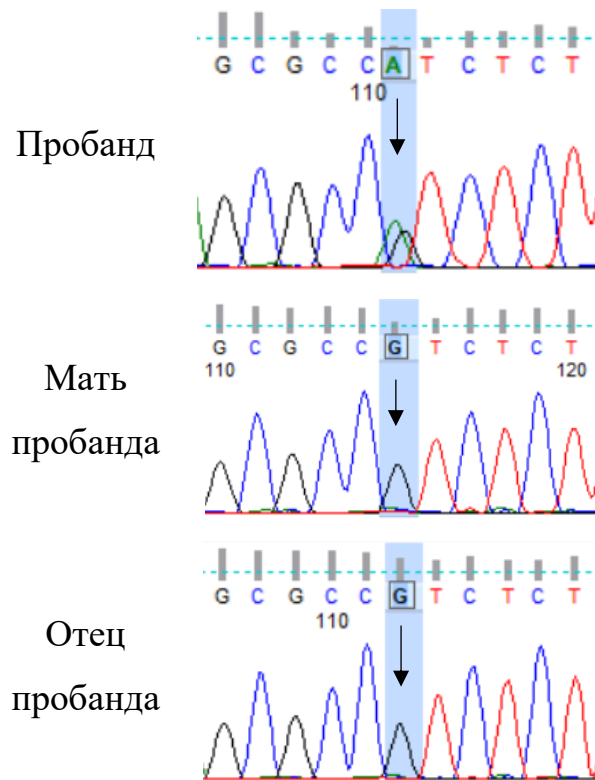


Рисунок Б.30 - Идентификация патогенного варианта с.-14C>Т у пациента 44 в гетерозиготном состоянии в промоторном регионе гена *IFITM5*

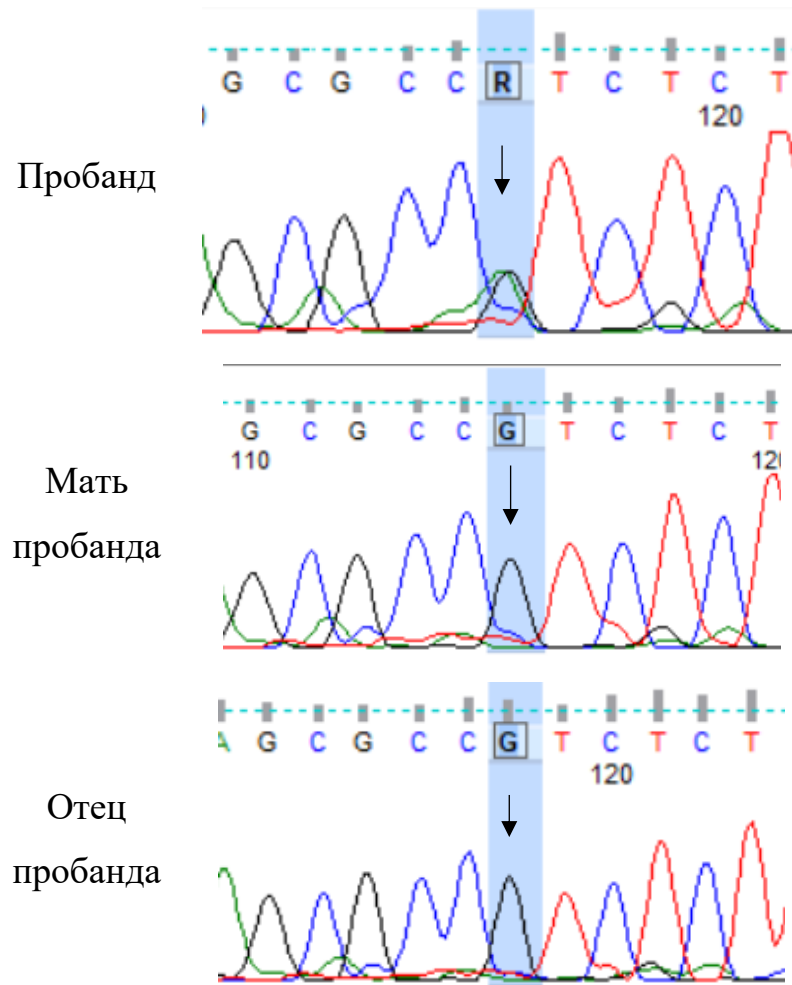


Рисунок Б.31 - Идентификация патогенного варианта с.-14C>T у пациента 45 в гетерозиготном состоянии в промоторном регионе гена *IFITM5*

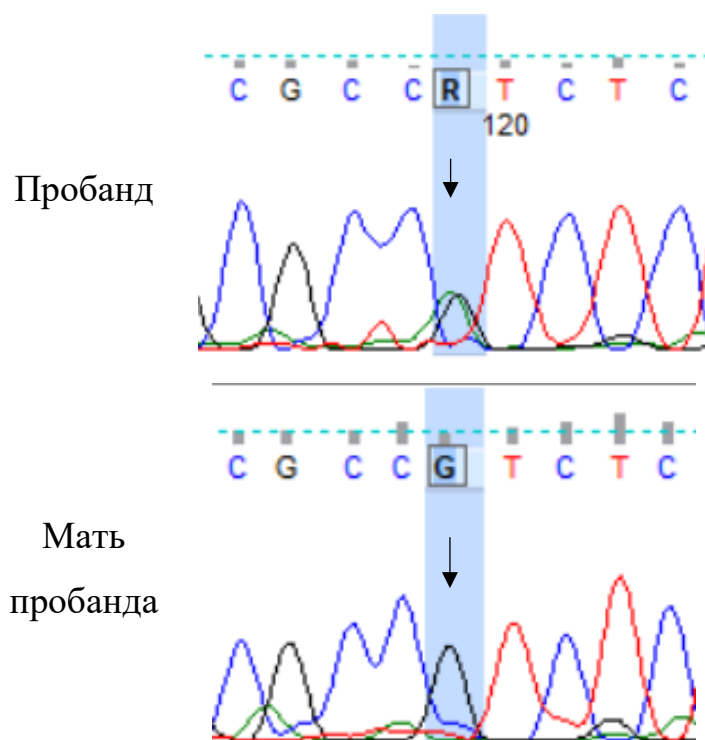


Рисунок Б.32 - Идентификация патогенного варианта с.-14C>T у пациента 46 в гетерозиготном состоянии в промоторном регионе гена *IFITM5*

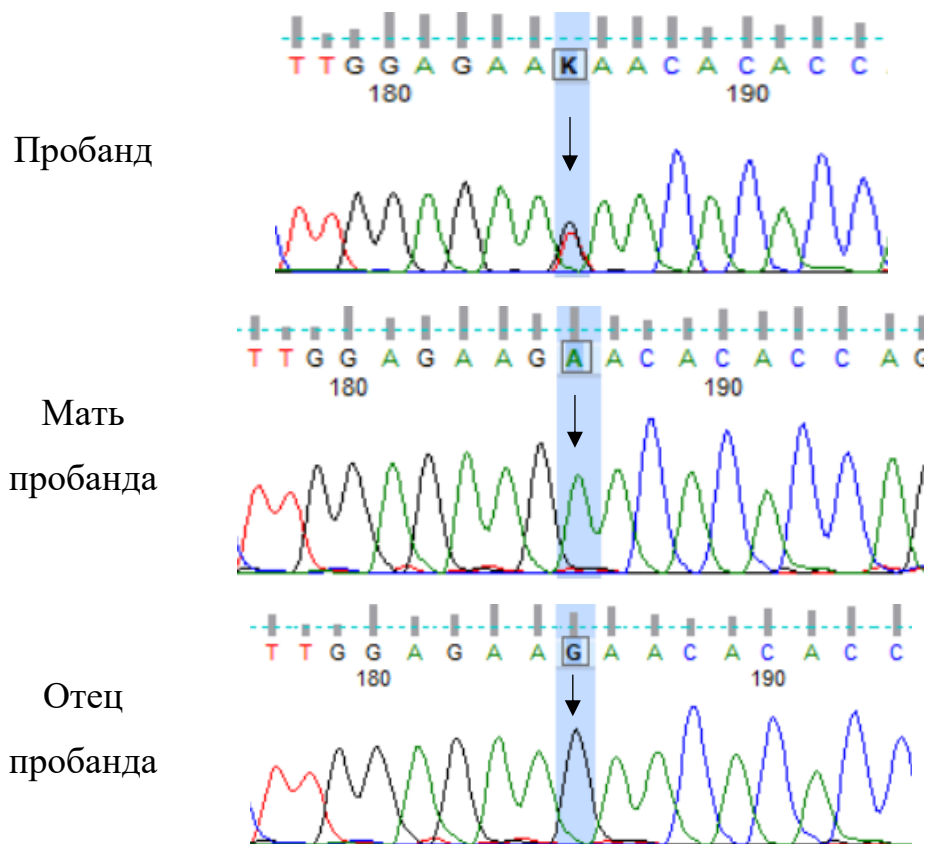


Рисунок Б.33 - Идентификация патогенного варианта с.1051G>T (p.Glu351*) у пациента 47 в гетерозиготном состоянии в экзоне гена *P3H1*