

5. BTrackS Balance Test for concussion management is resistant to practice effects / M.C. Hearn, S.S. Levy, H.S. Baweja [et al.] // Clin J Sport Med. – 2018. – Vol.28. – P. 177–179.
6. Burns E.B. The direct costs of fatal and non-fatal falls among older adults – United States / E.B. Burns, J.A. Stevens, R.L. Lee // J Safety Res. – 2016. – №58. – P. 99–103.
7. Goble DJ Normative data for the BtrackS Balance Test of postural sway: results from 16,357 community-dwelling individuals who were 5 to 100 years old / D.J. Goble, H.S. Baweja // Phys Ther. – 2018. – Vol.98. – P.779–785.
8. Increased postural sway during quiet stance as a risk factor for prospective falls in community-dwelling elderly individuals / J. Johansson, A. Nordstrom, Y. Gustafson, [et al.] // Age Ageing. – 2017. – Vol. 46. – P. 964–970.
9. Lee H.H. Prediction of poststroke falls by quantitative assessment of balance / H.H. Lee, S.H. Jung // Ann Rehabil Med. – 2017. – Vol. 41. – P. 339–346.
10. Loss of peripheral sensory function explains much of the increase in postural sway in healthy older adults / E. Anson, R.T. Bigelow, B. Swenor [et al.] // Front Aging Neurosci. – 2017. – V 9. – 202.
11. Low D.C. Effectiveness of exercise interventions to improve postural control in older adults: a systematic review and meta-analyses of centre of pressure measurements / D.C. Low, G.S. Walsh, M. Arkesteijn // Sports Med. – 2017. – Vol. 47. – P.101–112.
12. Melzer I. A retrospective analysis of balance control parameters in elderly fallers and non-fallers / I. Melzer, I. Kurz, L.I. Oddsson // Clin Biomech. – 2010. – Vol. 25. – P. 984–988.
13. Mobility in association with anxiety and quality of life in middle-aged and older female fallers and non-fallers / T.P. Shiryaeva, D.M. Fedotov, A.V. Gribanov [et al.] // Russian Open Medical Journal. – 2020. – Vol. 9. – e0212.
14. Morrison S. Deficits in medio-lateral balance control and the implications for falls in individuals with multiple sclerosis / S. Morrison, C.A. Rynders, J.J. Sosnoff // Gait Posture. – 2016. – Vol.49. – P.148–154.
15. O'Connor S.M. Validating the BTrackS Balance Plate as a low cost alternative for the measurement of sway-induced center of pressure / S.M. O'Connor, H.S. Baweja, D.J. Goble // J Biomech. – 2016. – Vol.49. – P. 4142–4145.
16. Postural stability and history of falls in cognitively able older adults: the Canton Ticino study / A. Merlo, D. Zemp, E. Zanda [et al.] // Gait Posture. – 2012. – Vol. 36. – P. 662–666.

А.Е. Яковлева, А.Л. Данилова, Д.А. Петухова,
А.Л. Сухомясова, Н.Р. Максимова

ПОИСК МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *EXT1* И *EXT2* У БОЛЬНЫХ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЭКЗОСТОЗНОЙ ХОНДРОДИСПЛАЗИЕЙ В РС(Я)

DOI 10.25789/YMJ.2020.72.08

УДК 616-056.7(075)

В статье представлены результаты впервые проведенного молекулярно-генетического исследования в генах *EXT1* и *EXT2* у больных с множественной экзостозной хондродисплазией (МЭХД) и их родственников. Выявлена редкая нонсенс-мутация с.751C>T (p.Gln251*) в экзоне 5 гена *EXT2* в гетерозиготном состоянии, которая явилась причиной возникновения МЭХД у больных якутской этнической группы. В настоящее время исследования по поиску мутаций в генах *EXT1* и *EXT2* нами продолжаются у остальных семей с МЭХД.

Ключевые слова: *EXT1*, *EXT2*, множественная экзостозная хондродисплазия, множественные остеохондромы.

The article presents the results of the first molecular genetic study in the *EXT1* and *EXT2* genes among patients with hereditary multiple exostoses (HME) and their relatives. A rare nonsense mutation c.751C>T (p.Gln251*) in exon 5 of *EXT2* gene in a heterozygous state was detected. That was the cause of HME among patients of the Yakut ethnic group. At present we are conducting the investigation to search mutations in *EXT1* and *EXT2* genes in other families with HME.

Keywords: *EXT1*, *EXT2*, Hereditary Multiple Exostoses, multiple osteochondromas

Введение. Множественная экзостозная хондродисплазия (МЭХД), или множественные остеохондромы (МО), (OMIM #133700, #133701) – генетически гетерогенное заболевание, обусловленное мутациями в генах *EXT1* или *EXT2*, с аутосомно-доминантным типом наследования, на долю которого приходится от 16,7 до 44% от всех доброкачественных опухолей, опухолеподобных и диспластических поражений скелета [9]. А также в некоторых случаях (от 0,5 до 5%) возможна

трансформация отдельных экзостозов во вторичную хондрому или хондросаркому [3]. Данное заболевание проявляется развитием 2 или более костных выростов на длинных трубчатых костях. Количество экзостозов может значительно изменяться с течением болезни и может достигать от 15 до 18. В большинстве случаев костные изменения протекают бессимптомно и развиваются из хряща, увеличиваются в размере в первом десятилетии жизни, перестают расти в период полового созревания, когда пластины роста закрываются [4].

Частота встречаемости данного заболевания в мире в различных популяциях составляет от 1,3 до 2 на 100 тыс. населения или 1 на 7000 ортопедических больных, до 80% составляют семейные случаи [3]. Выявлено, что в 90% случаев МЭХД ассоциированы с мутациями в генах *EXT1* (OMIM #608177, 8q24.11) и *EXT2* (OMIM #608210, 11p11.2). В

зависимости от этнической группы частота встречаемости патогенных вариантов *EXT1* и *EXT2* различается [10].

В Республике Саха (Якутия) (РС(Я)), по данным «Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии», зарегистрировано 85 больных с МЭХД из 41 семьи. Из них 70 больных из 33 якутских семей, 5 – из 1 эвенкийской, 8 – из 5 русских и по одному случаю – из татарской и украинской семей. Из 36 административно-территориальных единиц РС(Я) заболевание зарегистрировано в 16 улусах и в г. Якутске. Распространенность данного заболевания в РС(Я) составила 8,85 на 100 тыс. населения. До настоящего времени на территории Якутии не проводились молекулярно-генетические исследования по поиску мутаций у больных МЭХД.

Цель нашего исследования – поиск мутаций в генах *EXT1* и *EXT2* у больных МЭХД и их родственников в

НИЛ «Молекулярная медицина и генетика человека» МИ СВФУ им. М.К. Аммосова: **ЯКОВЛЕВА Александра Еремеевна** – н.с. НИЛ, alexerem2013@yandex.ru, **МАКСИМОВА Надежда Романовна** – д.м.н., руковод. НИЛ, **СУХОМЯСОВА Айталину Лукична** – к.м.н., зам. руковод. НИЛ, зав. Медико-генетич. центром РБ №1-НЦМ, **ДАНИЛОВА Анастасия Лукична** – к.б.н., с.н.с. НИЛ, **ПЕТУХОВА Диана Александровна** – гл. инженер проекта НИЛ.

РС(Я) с использованием современных молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы исследования. Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили 55 образцов ДНК индивидов с клинически установленным диагнозом МЭХД и 11 образцов ДНК их родственников без клинических проявлений из 31 неродственной семьи. Из 55 больных 28 мужчин и 27 женщин; по этническому происхождению 45 чел. (81,82%) – якуты, 6 (10,91) – русские, 2 (3,63) – эвенки и по 1 (1,82%) – украинец и татарин. От всех индивидов для данного исследования было получено информированное согласие. Работа была одобрена локальным комитетом по биомедицинской этике Медицинского института ФГАОУ ВО «СВФУ им. М.К. Аммосова» (г. Якутск, протокол №8 от 11 ноября 2016 г.). Все индивиды состояли на учете в Медико-генетическом центре ГАУ РС(Я) «РБ №1 – НЦМ».

Молекулярно-генетический анализ. ДНК выделялась стандартным методом из цельной крови методом фенол-хлороформной экстракции [5].

Для установления молекулярно-генетической причины возникновения МЭХД проведено массовое параллельное секвенирование (МПС) с использованием панели Trusight One Sequencing panel («Illumina», USA), включающей 4800 генов с известным клиническим значением. Метод МПС позволяет получить полную информацию о последовательности нуклеотидов нужного участка ДНК и включает три основных этапа: приготовление ДНК-библиотек, пробоподготовку и секвенирование. Секвенирование образца проводили на высокопроизводительном секвенаторе MiSeq («Illumina», USA) 2-го поколения с покрытием 70-100x, все этапы пробоподготовки проведены согласно инструкции производителя («Illumina») [1, 11]. Молекулярно-генетические исследования проведены на базе Центра коллективного пользования Арктического инновационного центра ФГАОУ ВО «СВФУ им. М.К. Аммосова».

Для подтверждения результатов проведено прямое секвенирование по Сэнгеру на генетическом анализаторе ABI 3500 («Life Technologies», USA), с использованием специально спроектированных праймеров. Был использован комплекс базовых молекулярно-генетических методов исследования: полимеразная цепная реакция (ПЦР), метод электрофореза в агарозном геле, прямое секвениро-

вание по Сэнгеру. Для ПЦР использовали фланкирующие праймеры 5'-GACTGGTAAGGAAACACTTAC-3' (прямой), 5'-CATGTCCAGTAAAGAGCAATG-3' (обратный). Праймеры гена EXT2 подобраны с использованием программы NCBI/Primer-BLAST и синтезированы в ЗАО «Евроген» (Москва) [8]. Номер геномной сборки: Genome Reference Consortium Human GRCh38 (GCA_000001405.15). Для предсказания патогенности найденных вариантов была использована биоинформатическая программа MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>).

Биоинформационный анализ. Первичный анализ данных, полученных в результате МПС, был проведен непосредственно в самой системе MiSeq. Данные были выравнены на референсную последовательность GRCh37 (hg19). Фильтрация полученных вариантов была проведена с использованием программы Sophia DDM v4 (Sophia Genetics, Switzerland). Для аннотации выявленных вариантов был выбран транскрипт гена EXT2: NM_001178083. Клиническая интерпретация проводилась в соответствии с российским руководством по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами МПС [2]. Для верификации результатов были использованы следующие базы данных: ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), OMIM (<https://www.omim.org/>), Exome Variant Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org/>), dbSNP build 153 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), dbVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/>), Exome Variant Server (<https://evs.gs.washington.edu/EVS/>), Leiden Open Variation Database system (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/EXT2>).

Результаты и обсуждение.

Поиск мутаций. Для исследования мутаций была отобрана семья Г. с наибольшим числом больных МЭХД (рис.1, А). Пробанд впервые обратилась в Медико-генетический центр РБ№1-НЦМ в возрасте 10 лет с жалобами на опухолевидные образования в области плеч. Имелись экзостозы больших размеров, укорочение

левой руки. С 14 лет у пациентки появились жалобы на увеличение экзостозов, искривление костей предплечья, ульнарную девиацию кистей, ограничение движений в руках. На момент обследования пробанду было 20 лет.

В результате МПС и фильтрации вариантов нуклеотидной последовательности у исследуемого пробанда была выявлена нонсенс-мутация с.751C>T (p.Gln251*) в экзоне 5 гена EXT2 в гетерозиготном состоянии.

Ген EXT2 локализован на 11-й хромосоме в локусе 11p12-p11, состоит из 14 экзонов и двух экзонов на сайте альтернативного сплайсинга, кодирует трансмембранную гликозилтрансферазу типа II эндоплазматического ретикулума, участвует в удлинении цепи при биосинтезе гепарансульфата, а также может действовать как фактор, ингибирующий рост опухолей, в частности остеосарком, сопровождающихся множественными экзостозами. Продукт гена принимает участие в экспрессии протеогликанов на поверхности клетки и в экстрацеллюлярном матриксе [7].

Вариант с.751C>T (p.Gln251*) гена EXT2 был обнаружен в базе данных Leiden Open Variation Database system (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/EXT2>). По данным базы LOVD извест-

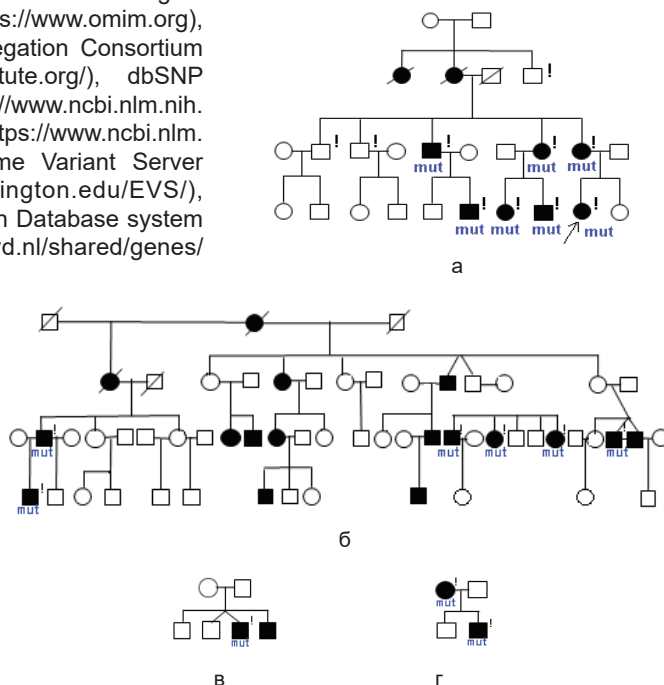


Рис. 1. Родословные семей с больными МЭХД: А – семьи Г., Б – семьи Д., В – семьи А., Г – семьи П.

□ - здоровый мужчина; ■ - больной мужчина; ○ - здоровая женщина; ● - больная женщина; / - умершие; * - пробанд; ! - исследованные нами; □■ - разнородные близнецы; ■■ - однородные близнецы

но лишь то, что данная мутация присутствует у членов двух европейских семей. Результат представлен без подробного описания клинической картины больных МЭХД [6, 9].

Далее было проведено прямое секвенирование по Сэнгеру у 54 индивидов с клиническим диагнозом МЭХД, в результате которого у 16 (29,09%) из 55 больных с МЭХД выявлена данная нонсенс-мутация с.751C>T (p.Gln251*) в экзоне 5 гена *EXT2* в гетерозиготном состоянии (рис. 2). Все 16 больных, у которых обнаружена данная мутация, оказались из якутских семей. Прямое секвенирование по Сэнгеру также проведено 11 родственникам больных МЭХД, у них мутация не была выявлена.

Таким образом, диагноз МЭХД был подтвержден современными методами молекулярно-генетических исследований у 16 больных из 4 неродственных якутских семей (рис. 1, Б-Г).

Заключение. В результате поиска мутаций в генах *EXT1* и *EXT2* у 55 больных с клинически установленным диагнозом МЭХД из 31 неродственной семьи разного этнического происхождения выявлена редкая нонсенс-мутация с.751C>T (p.Gln251*) в экзоне 5 гена *EXT2* у 16 (29,09%) больных из 4 неродственных якутских семей, приводящая к замене нуклеотида, в гетерозиготном состоянии, что подтвердил диагноз МЭХД.

Разработаны подходы для молекулярно-генетической лабораторной диагностики выявленной мутации, которая может быть использована для подтверждения диагноза МЭХД, прогнозирования и профилактики неблагоприятных исходов.

В настоящее время исследования по поиску мутаций в генах *EXT1* и *EXT2* нами продолжаются у остальных семей с МЭХД.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Тема научного проекта: «Геномика Арктики»

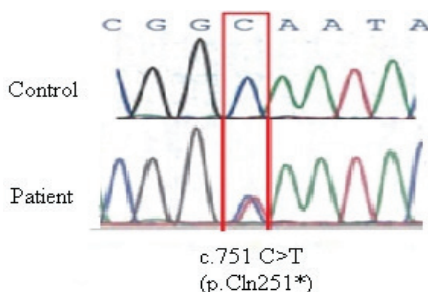


Рис. 2. Хроматограмма фрагмента экзона 5 гена *EXT2*: Control – здоровый, Patient – больной с МЭХД с нонсенс-мутацией с.751C>T (p.Gln251*)

эпидемиология, наследственность, патология», FSRG-2020-0014).

Выводы:

1. Частота встречаемости астенического синдрома в общей выборке обследованных школьников г. Абакана составила 9,8%. АС чаще регистрировался у подростков некоренного населения (европеоиды), чем коренного (хакасы), чаще у девочек, чем мальчиков, частота синдрома нарастала с возрастом.

2. Характерной особенностью коморбидных ассоциаций астенического синдрома у школьников Абакана была более выраженная сопряженность АС с головными болями (как частыми, так и нечастыми эпизодическими), частыми абдоминальными болями и частыми дорсалгиями.

3. Для улучшения здоровья и качества жизни школьников с астеническим синдромом необходим комплексный подход, включающий своевременную диагностику и коррекцию сопутствующих функциональных соматических расстройств в виде рецидивирующих болевых синдромов.

Литература

1. Кушлинский Н.Е. Генетические исследования при опухолях костей / Н.Е. Кушлинский, Ю.С. Тимофеев // Вестник ТГУ. – 2013. – Т. 18, №6. – С. 3265-3273.

Kushlinsky N.E. Genetic research for bone tumors / N.E. Kushlinsky, Yu.S. Timofeev // Tomsk

State University Journal. – 2013. V. 18, №6. – P. 3265-3273. (In Russ.)

2. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) / О.П. Рыжкова, О.Л. Кардымон, Е.Б. Прохорчук [и др.] // Медицинская генетика. – 2018. – №2. – С. 3-23.

Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (MPS) / O.P. Ryzhkova, O.L. Kardymon, E.B. Prohorchuk [et al.] // Medicinskâ genetika. – 2018. – №2. P. 3-23. (In Russ.)

3. Чеснокова Г.Г. Изучение структурных аномалий и точковых мутаций генов *EXT1* и *EXT2* при множественной экзостозной хондродисплазии и спорадических злокачественных новообразованиях: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Г.Г. Чеснокова. – М., 1999. С. 23.

Chesnokova G.G. Study of structural anomalies and point mutations of the *EXT1* and *EXT2* genes with multiple exostosis chondrodysplasia and sporadic malignant neoplasms: author's abstract. Dis. ... cand. Biol. Sciences: 03.00.15 / G.G. Chesnokova. – М., 1999. – P. 23. (In Russ.)

4. Hennekam R.C. Hereditary multiple exostoses / R.C. Hennekam // Journal of Medical Genetics. – 1991; 28: 262-266.

5. Maniatis T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual / T. Maniatis, J. Sambrook, E.F. Fritsch // Cold Spring Harbor Press (New York). – 1982. – P. 76-85.

6. Novel *EXT1* and *EXT2* Mutations Identified by DHPLC in Italian Patients With Multiple Osteochondromas / E. Pedrini, A. De Luca, E.M. Valente [et al.] // Human Mutation. – 2005 Sep;26(3):280. – P. 1-10. doi: 10.1002/humu.9359.

7. Pacifici M. Hereditary Multiple Exostoses: New Insights into Pathogenesis, Clinical Complications, and Potential Treatments / M. Pacifici // Curr Osteoporosis Rep. – 2017. – 15.-P.142–52. doi:10.1007/s11914-017-0355-2.

8. Primer Designing Tool [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>. – Заглавие с экрана. – 05.11.2017.

9. The Genotype-Phenotype Correlation of Hereditary Multiple Exostoses / C. Alvarez, S. Tredwell, M. De Vera [et al.] // Clin Genetics. – 2006. – Aug;70(2):122-30. doi: 10.1111/j.1399-0004.2006.00653.x.

10. The putative tumour suppressor *EXT1* alters the expression of cell-surface heparan sulfate / C. McCormick, Y. Leduc, D. Martindale [et al.] // Nature Genet. –1998. – Vol.19. – P.158-161.

11. TruSight One Sequencing Panel Series. Reference Guide. 2018. Available at: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/trusight_one/trusight-onsequencing-panel-reference-guide-15046431-03.pdf. Accessed 25 Apr 2019.