

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Д.В.Чередниченко

29.11. 2021 г.

Регистрационный № 117 – 1021



**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ТИПОВ НЕСОВЕРШЕННОГО
ОСТЕОГЕНЕЗА, АССОЦИИРОВАННЫХ С НАРУШЕНИЕМ
СТРУКТУРЫ И СИНТЕЗА КОЛЛАГЕНА**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», учреждение здравоохранения «1-я городская клиническая больница г.Минска»

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Почкайло А.С., к.б.н., доцент Морозик П.М., д.м.н., профессор Руденко Э.В., Кобец Е.В., Галашевская А.А., к.м.н., доцент Ненартович И.А., к.м.н. Самоховец О.Ю.

Минск, 2021

В настоящей инструкции по применению изложен метод диагностики типов несовершенного остеогенеза (НО), ассоциированных с нарушением структуры и синтеза коллагена, который может быть использован в комплексе медицинских услуг для выявления наиболее распространенных типов НО с учетом установленной мутации и типа ее наследования.

Метод предназначен для врачей-генетиков, врачей-педиатров, врачей-педиатров участковых, врачей-педиатров районных (городских), врачей-неонатологов, врачей-терапевтов, врачей общей практики, врачей-травматологов-ортопедов, врачей-экспертов и других врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с НО в стационарных или амбулаторных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ И ДР.

1. Клинические и лабораторно-инструментальные исследования.

1. Фонендоскоп, шпатель, стандартное оборудование для антропометрии (ростомер, весы, сантиметровая лента).

2. Реактивы для лабораторного исследования уровней 25-гидроксивитамина D (25(OH)D), паратиреоидного гормона (ПТГ), мочевины, креатинина, общего белка, билирубина, глюкозы, трансаминаз (АСТ, АЛТ), общего и ионизированного кальция, неорганического фосфора, магния, лабораторных маркеров костного метаболизма (уровень β -кросслапс, остеокальцина, активность общей щелочной фосфатазы (ОЩФ)) в сыворотке крови.

3. Рентгенограммы грудного и поясничного отделов позвоночника в прямой и боковой проекциях, черепа в боковой и прямой проекциях, при наличии у пациента переломов/деформаций костей – рентгенограммы

соответствующих костей (отделов скелета), заключение рентгеновской морфометрии позвоночника, негатоскоп (для просмотра и анализа рентгенограмм).

4. Денситограммы по результатам двойной рентгеновской денситометрии (абсорбциометрии, ДРА).

II. Молекулярно-генетические исследования.

1. Стандартное оборудование для выделения ДНК из биологического материала человека (миницентрифуга, шейкер-инкубатор, автоматические дозаторы переменного объёма).

2. Оборудование для амплификации специфических последовательностей ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

3. Оборудование для высокопроизводительного секвенирования методом белок-кодирующей последовательности генов *COL1A1* и *COL1A2* с использованием технологии NGS на любой платформе.

4. Расходные материалы (пробирки для образцов крови с ЭДТА, пробирки с крышкой объёмом 1,5 мл, пробирки стрипованные низкопрофильные с крышками объёмом 0,2 мл, стерильные сменные наконечники для дозаторов различного объёма, перчатки медицинские).

5. Реагенты (набор реактивов для выделения ДНК, дезинфицирующие средства, буфер для ПЦР, аллель-специфичные зонды, сверхчистая вода (Milli Q)), специфические ампликоны, реагенты для подготовки библиотек и секвенирования согласно рекомендациям производителя в зависимости от используемой платформы.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Незавершённый (несовершенно) остеогенез (Q78.0).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Беременность – для стандартной рентгенографии, двойной рентгеновской денситометрии, рентгеновской морфометрии.

2. Невозможность правильной укладки пациента для исследования (наличие гиперкинезов, выраженных деформаций скелета и др.) – для рентгеновской денситометрии, рентгеновской морфометрии.

3. Отказ пациента от проведения диагностики, отсутствие предварительного информированного добровольного согласия законных представителей несовершеннолетнего пациента на проведение диагностики.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап 1. Оценка результатов общеклинического исследования.

1.1. Сбор и анализ генеалогического анамнеза, анамнеза заболевания.

1.1.1. Выявление клинических проявлений (переломы, деформации костей и др.) и/или установленного диагноза НО у родственников в генеалогическом анамнезе пациента.

1.1.2. Выявление и анализ анамнеза костных переломов (количество, локализация, тяжесть, возраст возникновения (начиная с выявления во внутриутробном периоде), соответствие тяжести перелома обстоятельствам травмы (возможные низкоэнергетические переломы)) и деформаций (локализация, выраженность, распространенность, возраст появления, динамика прогрессирования, связь с переломами) у пациента.

1.1.3. Выявление в анамнезе хронических заболеваний, приема лекарственных средств, обладающих негативным остеотропным действием, индуцирующих развитие остеопороза.

1.1.4. Выявление анамнестических данных, свидетельствующих о фактах насилия в отношении пациента (как причины костных переломов).

1.2. Проведение медицинского осмотра пациента с целью выявления фенотипических признаков, характерных для типов НО, ассоциированных с нарушением структуры или синтеза коллагена (см. Приложение 1). Характерно выявление при осмотре изолированно или в комбинации:

- костных переломов различной локализации, на разных стадиях консолидации;
- костных деформаций черепа/скелета;
- кифосколиоза;
- краниоцервикальных аномалий (с соответствующими клиническими проявлениями – при их наличии);
- низкорослости, задержки физического развития;
- костных болей;
- голубого/серого цвета конъюнктив;
- несовершенного дентиногенеза;
- прогрессирующей тугоухости;
- гипермобильности связок, суставов;
- мышечной слабости.

Этап 2. Оценка результатов рентгенологического исследования.

2.1. При стандартной рентгенографии выявляются характерные рентгенологические признаки НО:

- переломы костей различной давности и стадии консолидации (чаще – переломы длинных трубчатых костей, ребер, черепа, компрессионные переломы позвонков);
- костные деформации;
- наличие вормиевых (вставочных) костей (чаще – в костях свода черепа);
- остеопения/остеопороз костной ткани;

– «зебра»-линии (полосы повышенной плотности в метафизах трубчатых костей – при лечении бисфосфонатами в анамнезе).

2.2. При рентгеновской морфометрии, основанной на анализе боковых рентгенограмм грудного и поясничного отделов позвоночника, проводится выявление и оценка тяжести деформаций позвонков (см. Приложение 2). Степень тяжести деформаций определяется на основании оценки снижения высоты тел позвонков в их переднем, среднем, заднем отделах. Выделяют следующие степени деформации:

0 – отсутствие изменений конфигурации, расценивается как норма;

1 – слабая деформация тела позвонка, снижение высоты любого отдела (переднего, заднего, среднего) составляет 20-25%, площадь поверхности тела позвонка уменьшается на 10-20%, при этом говорят о наличии определенного (установленного) перелома позвонка;

2 – умеренная деформация тела позвонка, снижение высоты позвонка в любом отделе на 25-40%, уменьшение площади его тела на 20-40%;

3 – тяжелая деформация, соответствующая снижению высоты и площади поверхности тела позвонка более чем на 40%.

2.3. При выполнении ДРА оценивают содержание костного минерала (BMC – bone mineral content) и минеральную костную плотность (BMD – bone mineral density).

2.3.1. У детей и молодых взрослых (женщин репродуктивного возраста, мужчин младше 50 лет) предпочтительными регионами для выполнения ДРА являются поясничный отдел позвоночника и сканирование всего тела (без учета костной ткани черепа). Определение костного возраста методом стандартной рентгенографии недоминантной кисти обязательно выполняется перед ДРА у детей для правильной интерпретации его результата. Согласно рекомендациям Международного

общества клинической денситометрии (2019г.) проводится сравнение результата денситометрического обследования пациента со средними значениями для лиц того же пола и возраста (Z-score). Результат сравнения представляется в виде стандартного отклонения (SD) по отношению к соответствующим нормативным показателям. Показатели BMC и BMD при $Z\text{-score} \leq -2$ SD у детей и молодых взрослых расцениваются как низкие для данного пола и возраста. Для установления остеопороза у детей необходимо (один из вариантов):

- наличие одного или нескольких компрессионных переломов позвоночника (при отсутствии локального патологического процесса или высокоэнергетической травмы) – независимо от показателей BMC и BMD;
- наличие клинически значимого анамнеза переломов (2 и более перелома длинных костей в возрасте до 10 лет или три и более перелома длинных костей в возрасте до 19 лет) – в сочетании с низкими BMC и BMD для данного пола и возраста ($Z\text{-score} \leq -2,0$ SD).

2.3.2. У взрослых (женщин в менопаузе и мужчин старше 50 лет) предпочтительными регионами для ДРА являются проксимальные отделы бедренных костей и поясничный отдел позвоночника. Согласно рекомендациям Международного общества клинической денситометрии (2019г.), проводится сравнение результата обследуемого пациента с нормальными денситометрическими данными молодых здоровых лиц, достигших пика костной массы (T-score). Для установления остеопороза у женщин в менопаузе и мужчин старше 50 лет, согласно рекомендациям ВОЗ, критерий T-score оценивают следующим образом:

- > -1 SD – норма;
- от -1 до $-2,5$ SD – остеопения;
- менее $-2,5$ SD – остеопороз;

– менее -2,5 в сочетании с низкотравматическим переломом в анамнезе – тяжелый остеопороз.

Снижение денситометрических показателей (вплоть до тяжелого первичного остеопороза) выявляется у большинства пациентов с НО, является одним из основных диагностических критериев заболевания. Выявление нормальных денситометрических показателей костной ткани не исключает наличия НО – при редких мутациях, опосредующих отдельные его типы, имеет место нормальная/повышенная BMD.

Этап 3. Оценка результатов лабораторного исследования.

Выполнение и оценка результатов лабораторных исследований у пациентов с НО проводятся с целью:

- оценки состояния костного метаболизма;
- проведения дифференциальной диагностики НО с другими заболеваниями, манифестирующими сходными клиническими проявлениями;
- выявления и своевременного лечения коморбидных с НО заболеваний;
- выявления противопоказаний к последующему после диагностики лечению НО (например, гипокальциемия, дефицит витамина D, выраженное нарушение функции почек и др. – при лечении бисфосфонатами).

3.1. Оценка обеспеченности витамином D осуществляется в соответствии с диагностическими критериями (см. Приложение 2), при выявлении дефицита витамина D, сопутствующего НО, проводится его лечение в соответствии с общепринятыми подходами.

3.2. Выполняется определение уровней ПТГ, мочевины, креатинина, общего белка, билирубина, глюкозы, АСТ, АЛТ, общего и

ионизированного кальция, неорганического фосфора, магния, β -кросс-лапс, остеокальцина, активности ОЩФ в сыворотке крови с последующей оценкой в соответствии с существующими референсными значениями с учетом пола, возраста пациента, применяемого метода определения. Для НО не характерны изменения в лабораторных показателях, при выявлении отклонений от нормы – проводится дифференциальная диагностика с соответствующими заболеваниями и патологическими состояниями.

Этап 4. Оценка результатов молекулярно-генетического исследования.

С целью выявления патогенных мутаций осуществляется секвенирование белок-кодирующей последовательности генов *COL1A1* и *COL1A2*, мутации в которых опосредуют типы НО, ассоциированные с нарушениями в структуре и синтезе коллагена. Анализ нуклеотидной последовательности ДНК осуществляется с использованием технологии массового параллельного секвенирования (NGS) на различных платформах (методы Illumina, Ion Torrent, Oxford Nanopore и др.) с использованием коммерческих панелей различных производителей или наборов собственной разработки. Включает в себя последовательное проведение следующих этапов.

4.1. Выделение ДНК из биологического материала пациента (кровь).

4.2. Амплификация методом ПЦР целевых участков генома, включающих кодирующие области с прилегающими интронными областями генов *COL1A1* и *COL1A2* (см. Приложение 3).

4.3. Подготовка библиотек генов, включающая лигирование индексов, амплификацию, очистку и проверку библиотек.

4.4. Загрузка библиотек, высокопроизводительное секвенирование белок-кодирующей последовательности генов коллагена I типа методом парно-концевого чтения.

4.5. Биоинформатическая обработка результатов секвенирования, для чего используется специализированное программное обеспечение для контроля качества прочтений, выравнивания последовательности относительно референсного генома человека. Варианты, отличающиеся от референсного генома, подвергают ранжированию и аннотированию. Верификация и интерпретация вариантов (работа с vcf- и bam-файлами) проводится с помощью программных средств ANNOVAR, VariantStudio, Integrative Genomics Viewer (IGV). Для уменьшения количества вариантов, полученных по результатам секвенирования:

- удаляют варианты по критерию качества данных (доля прочтений с данным вариантом должна составлять не менее 20% для гетерозигот и 80% для гомозигот от общего количества независимых прочтений);

- осуществляют фильтрацию в отношении редких вариантов (наблюдаемых у менее 1% населения); для оценки популяционных частот выявленных однонуклеотидных вариантов используют базы данных: gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>); Ensembl (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index); dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), Exome Variant Server (<https://evs.gs.washington.edu/EVS/>);

- отфильтровывают синонимичные замены, не влияющие на кодируемый белок.

4.6. Оценка патогенности выявленных вариантов в генах коллагена I типа осуществляется согласно рекомендациям для интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS).

Патогенность оценивается по 5 классам: pathogenic – патогенные, likely pathogenic – вероятно патогенные, uncertain significance – варианты неопределенного значения, likely benign – вероятные доброкачественные, benign – доброкачественные. Присвоение варианту класса «likely» говорит о том, что вероятность патогенности/доброкачественности варианта выше 90%. Классификацию выявленных вариантов в генах по патогенности осуществляют следующими способами:

- поиск и сопоставление среди хорошо охарактеризованных вариантов в клинических базах данных: ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), OMIM (<https://www.omim.org>), Osteogenesis Imperfecta & Ehlers-Danlos syndrome variant databases (databases.lovd.nl/shared/genes), OrphaNet (<https://www.orpha.net>) или литературных источниках;

- использование компьютерных программ предсказания патогенности (in silico) – проводится в случае, если вариант нуклеотидной последовательности не был описан ранее и не представлен ни в одной из баз данных (PoplyPhen-2, SIFT, MutationTaster, и др.). Пример предсказания патогенности вариантов в генах коллагена приведен в Приложении 4.

Этап 5. Диагностика НО с установлением его типа.

По результатам этапной оценки результатов клинических, лабораторно-инструментальных и молекулярно-генетических исследований подтверждается (исключается) наличие у пациента одного из типов НО, ассоциированных с нарушением структуры и синтеза коллагена, проводится установление клинического диагноза (характеристика типов НО, ассоциированных с нарушением структуры и синтеза коллагена, представлена в Приложении 1), осуществляется принятие управленческого решения:

– при установлении наличия у пациента одного из типов НО, ассоциированных с нарушением структуры и синтеза коллагена (I-IV типы), проводится определение медицинских показаний к назначению медикаментозного лечения, проведение лечения в соответствии с утвержденными инструкциями по применению/клиническими протоколами);

– при исключении у пациента типов НО, связанных с нарушением структуры и синтеза коллагена (I-IV типы), показано проведение дальнейшего молекулярно-генетического исследования и дифференциальной диагностики с целью поиска мутаций, ассоциированных с другими типами НО (V-XXI типы НО, см. Приложение 1), а также исключения иных заболеваний со сходными клиническими проявлениями.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ

При соблюдении технологии метода осложнений и ошибок не возникает.

Приложение 1

Современная генетическая классификация НО в соответствии с OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)

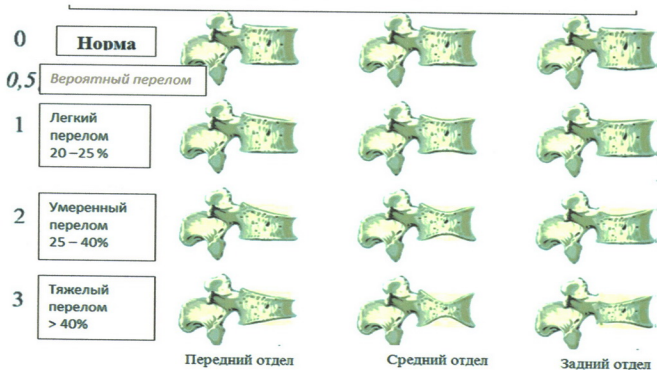
Тип НО	Ген	Расположение в хромосоме	Тип наследования
I	<i>COL1A1, COL1A2</i>	17q21.33, 7q21.3	AD
II	<i>COL1A1, COL1A2</i>	17q21.33, 7q21.3	AD
III	<i>COL1A1, COL1A2</i>	17q21.33, 7q21.3	AD
IV	<i>COL1A1, COL1A2</i>	17q21.33, 7q21.3	AD
V	<i>IFITM5</i>	11p15.5	AD
VI	<i>SERPINF1</i>	17p13.3	AR
VII	<i>CRTAP</i>	3p22.3	AR
VIII	<i>P3H1</i>	1p34.2	AR
IX	<i>PPIB</i>	15q22.31	AR
X	<i>SERPINH1</i>	11q13.5	AR
XI	<i>FKBP10</i>	17q21.2	AR
XII	<i>SP7</i>	12q13.13	AR
XIII	<i>BMP1</i>	8p21.3	AR
XIV	<i>TMEM38B</i>	9q31.2	AR
XV	<i>WNT1</i>	12q13.12	AR
XVI	<i>CREB3L1</i>	11p11.2	AR
XVII	<i>SPARC</i>	5q33.1	AR
XVIII	<i>TENT5A</i>	6q14.1	AR
XIX	<i>MBTPS2</i>	Xp22.12	XLR
XX	<i>MESD</i>	15q25.1	AR
XXI	<i>KDELRL2</i>	7p22.1	AR

Примечание: AD – аутосомно-доминантный, AR – аутосомно-рецессивный, XLR – X-сцепленный рецессивный пути наследования

Классификация и характеристика типов НО, ассоциированных с нарушением структуры и синтеза коллагена

Тип	Ген	Характеристика типа
I	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i>	Наличие голубых склер. Физическое развитие – близкое к норме. Генерализованный остеопороз. Поздняя манифестация тугоухости. Несовершенный дентиногенез (наличие – подтип А/отсутствие – подтип В). Снижение на 50% от нормы синтеза коллагена нормального качества.
II	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i>	Крайне тяжелое течение, перинатально-летальная форма. Экстремально высокая частота переломов. Голубые склеры. Нарушение качества структуры коллагена.
III	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i>	Тяжелое течение с прогрессирующими костными деформациями. Голубые склеры при рождении (изменение цвета до нормального к подростковому возрасту). Множественные переломы и костные деформации (включая деформации лицевого черепа). Выраженная низкорослость. Ранняя манифестация сколиоза, краниовертебральных аномалий. Нарушение качественной структуры и количества синтеза коллагена.
IV	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i>	Нормальный цвет склер, низкорослость – от умеренной до выраженной, наличие костных деформаций, несовершенный дентиногенез (наличие – подтип А/отсутствие – подтип В), промежуточный тип по тяжести между I и III. Нарушение качественной структуры и количества синтезируемого коллагена.

Полуколичественная оценка переломов позвонков



Диагностические критерии оценки статуса обеспеченности витамином D на основании концентрации 25(ОН)D в сыворотке

Концентрация 25(ОН)D, нг/мл	Клиническая интерпретация
<20	дефицит витамина D
20-30	субоптимальный статус обеспеченности
30-50	адекватный статус обеспеченности
50-100	высокий уровень поступления
>100	угрожающий для общих показателей здоровья уровень
>200	токсичная концентрация

Перечень ампликонов генов *COLIA2* (хромосома 7) и *COLIA1* (хромосома 17), включенных в панель для таргетного секвенирования

Ген	Начало	Окончание	Ген	Начало	Окончание	Ген	Начало	Окончание
<i>COLIA2</i>	94056294	94056398	<i>COLIA2</i>	94059533	94059730	<i>COLIA1</i>	48274515	48274619
<i>COLIA2</i>	94029482	94029625	<i>COLIA2</i>	94028335	94028421	<i>COLIA1</i>	48275067	48275171
<i>COLIA2</i>	94030853	94030957	<i>COLIA2</i>	94027668	94027733	<i>COLIA1</i>	48275284	48275388
<i>COLIA2</i>	94033842	94033937	<i>COLIA2</i>	94027034	94027095	<i>COLIA1</i>	48275496	48275591
<i>COLIA2</i>	94033979	94034083	<i>COLIA2</i>	94024318	94024438	<i>COLIA1</i>	48275768	48275890
<i>COLIA2</i>	94034125	94034229	<i>COLIA1</i>	48262837	48263034	<i>COLIA1</i>	48276561	48276713
<i>COLIA2</i>	94034485	94034589	<i>COLIA1</i>	48263113	48263406	<i>COLIA1</i>	48276753	48276839
<i>COLIA2</i>	94034959	94035063	<i>COLIA1</i>	48263652	48263893	<i>COLIA1</i>	48278746	48278899
<i>COLIA2</i>	94035536	94035640	<i>COLIA1</i>	48263975	48264308	<i>COLIA1</i>	48269810	48269914
<i>COLIA2</i>	94037133	94037228	<i>COLIA1</i>	48264350	48264508	<i>COLIA1</i>	48269975	48270079
<i>COLIA2</i>	94037469	94037573	<i>COLIA1</i>	48264819	48264923	<i>COLIA1</i>	48271278	48271427
<i>COLIA2</i>	94037622	94037717	<i>COLIA1</i>	48265211	48265369	<i>COLIA1</i>	48271465	48271569
<i>COLIA2</i>	94038056	94038160	<i>COLIA1</i>	48265431	48265535	<i>COLIA1</i>	48271684	48271833
<i>COLIA2</i>	94038608	94038757	<i>COLIA1</i>	48265865	48266023	<i>COLIA1</i>	48271908	48272012
<i>COLIA2</i>	94038850	94038945	<i>COLIA1</i>	48266077	48266181	<i>COLIA1</i>	48272056	48272214
<i>COLIA2</i>	94039528	94039632	<i>COLIA1</i>	48266238	48266396	<i>COLIA1</i>	48272382	48272486
<i>COLIA2</i>	94039706	94039864	<i>COLIA1</i>	48266503	48266661	<i>COLIA1</i>	48272567	48272716
<i>COLIA2</i>	94040175	94040279	<i>COLIA1</i>	48266712	48266924	<i>COLIA1</i>	48272769	48272864
<i>COLIA2</i>	94040342	94040491	<i>COLIA1</i>	48267014	48267118	<i>COLIA1</i>	48272902	48273051
<i>COLIA2</i>	94041354	94041458	<i>COLIA1</i>	48267194	48267298	<i>COLIA1</i>	48273258	48273362
<i>COLIA2</i>	94041870	94042019	<i>COLIA1</i>	48267336	48267494	<i>COLIA1</i>	48273490	48273585
<i>COLIA2</i>	94042369	94042473	<i>COLIA1</i>	48267662	48267766	<i>COLIA1</i>	48273649	48273753
<i>COLIA2</i>	94042976	94043080	<i>COLIA1</i>	48267878	48267982	<i>COLIA1</i>	48273819	48273914
<i>COLIA2</i>	94043180	94043284	<i>COLIA1</i>	48268152	48268310	<i>COLIA1</i>	48274345	48274449
<i>COLIA2</i>	94043508	94043612	<i>COLIA1</i>	48268718	48268876	<i>COLIA1</i>	48274515	48274619
<i>COLIA2</i>	94044512	94044607	<i>COLIA1</i>	48269123	48269272	<i>COLIA1</i>	48275067	48275171
<i>COLIA2</i>	94045691	94045840	<i>COLIA1</i>	48269315	48269410	<i>COLIA1</i>	48275284	48275388
<i>COLIA2</i>	94047010	94047168	<i>COLIA1</i>	48269810	48269914	<i>COLIA1</i>	48275496	48275591
<i>COLIA2</i>	94047785	94047889	<i>COLIA1</i>	48269975	48270079	<i>COLIA1</i>	48275768	48275890
<i>COLIA2</i>	94048784	94048888	<i>COLIA1</i>	48271278	48271427	<i>COLIA1</i>	48276561	48276713
<i>COLIA2</i>	94049519	94049623	<i>COLIA1</i>	48271465	48271569	<i>COLIA1</i>	48276753	48276839
<i>COLIA2</i>	94049677	94049781	<i>COLIA1</i>	48271684	48271833	<i>COLIA1</i>	48278746	48278899
<i>COLIA2</i>	94050295	94050399	<i>COLIA1</i>	48271908	48272012			
<i>COLIA2</i>	94051185	94051289	<i>COLIA1</i>	48272056	48272214			
<i>COLIA2</i>	94052243	94052455	<i>COLIA1</i>	48272382	48272486			
<i>COLIA2</i>	94053622	94053780	<i>COLIA1</i>	48272567	48272716			
<i>COLIA2</i>	94054403	94054561	<i>COLIA1</i>	48272769	48272864			
<i>COLIA2</i>	94054896	94055000	<i>COLIA1</i>	48272902	48273051			
<i>COLIA2</i>	94055036	94055194	<i>COLIA1</i>	48273258	48273362			
<i>COLIA2</i>	94055709	94055867	<i>COLIA1</i>	48273490	48273585			
<i>COLIA2</i>	94056913	94057222	<i>COLIA1</i>	48273649	48273753			
<i>COLIA2</i>	94057579	94057814	<i>COLIA1</i>	48273819	48273914			
<i>COLIA2</i>	94058474	94058767	<i>COLIA1</i>	48274345	48274449			

Интерпретация результатов секвенирования в случае отсутствия мутации в клинических базах данных с использованием программ предсказания патогенности

В результате секвенирования гена *COL1A1* у пациента с НО выявлена несинонимичная замена с.G662A (p.G221D), локализованная в 9 экзоне гена и приводящая к замене аминокислоты глицин (Gly, G) на аспарагиновую кислоту (Asp, D). Частота этой мутации в базах данных gnomAD, Ensembl, dbSNP, Exome Variant Server для европейской популяции составила менее 1%. Поиск мутации в специализированных клинических базах данных ClinVar, OMIM, LOVD, OrphaNet не выявил совпадений, поэтому оценка вероятной патогенности осуществлялась с использованием программ предсказания PredictSNP 2, Mutation Taster и PolyPhen-2. Согласно данным программы PredictSNP 2 нуклеотидная замена с.G662A гена *COL1A1* является патогенной с вероятностью от 51 до 87% (см. рисунок 1).

RESULTS																	
			neutral		deleterious		unknown		XX % expected accuracy				annotation				
Input			Prediction tools						Databases								
Variant	Region	Region function	PredictSNP2	CADD	DANN	FATHMM	FunSeq	GWAVA	dbSNP	GenS	Clin	OM	Regulome	HaploR	UCSC	Ense	PredictSNP1
17:46279127:C→T	exonic	nonsynonymous	87 %	74 %	80 %	72 %	82 %	81 %									

Рисунок 1 – Данные предсказателя патогенности PredictSNP 2 по замене с.G662A гена *COL1A1*. Мутация отнесена к патогенным по разным критериям вероятность патогенности колеблется от 51% до 87%

По данным Mutation Taster замена с.G662A гена *COL1A1* приводит к изменениям в сайте сплайсинга, чем вероятно изменяет структуру белка (см. рисунок 2).

Prediction	disease causing	Model: simple_aaa, prob: 0.999999987102134 help
Summary	• amino acid sequence changed • protein features (might be) affected • splice site changes	biochain
analysed issue	analysis result	
name of alteration	no title	
alteration (phys. location)	chr17:48275127C>T show variant in all transcripts IGV	
HGNC symbol	COL1A1	
Ensembl transcript ID	ENST00000225954	
Genbank transcript ID	U01_000895	
UniProt peptide	P02452	
alteration type	single base exchange	
alteration region	CDS	
DNA changes	c:552G>A cDNA:781G>A g:3857G>A	
AA changes	G221D Score: 94 protein score(s)	
position(s) of altered AA	221	
if alteration in CDS		
frameshift	no	
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. Search ExAC	

Рисунок 2 – Данные Mutation Taster по замене с.G662A гена *COL1A1*

Онлайн-база по оценке патогенности PolyPhen-2 так же предсказывает патогенность исследуемого варианта с демонстрацией его аминокислотной позиции p.G221D в третичной структуре коллагена 1 типа (см. рисунок 3).

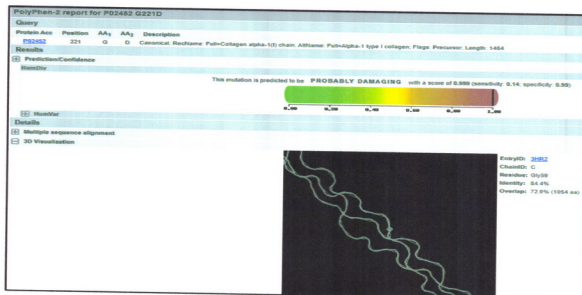


Рисунок 3 – Данные PolyPhen-2 по мутации с.G662A гена *COL1A1*, отражающейся на структуре белка через аминокислотную замену p.G221D. Позиция в 3-D структуре белка отмечена кругом

Для формирования витка α -спирали полипептидные цепи коллагенов имеют повторяющиеся аминокислотные фрагменты -Gly-X-Y-, где каждым третьим аминокислотным остатком является глицин, а пролин (Pro) и гидроксипролины (3,4,5Нур) зачастую располагаются в положениях X и Y. Поэтому замена глицина приводит к искажению витка α -спирали и нарушению укладки в третичную структуру. По совокупности сведений молекулярно-генетических и клинических исследований выявленный вариант нуклеотидной последовательности следует расценивать как патогенный, имеющий отношение к фенотипу пациента. Вариант с.G662A гена *COL1A1* был подтвержден методом прямого секвенирования по Сэнгеру (см. рисунок 4).

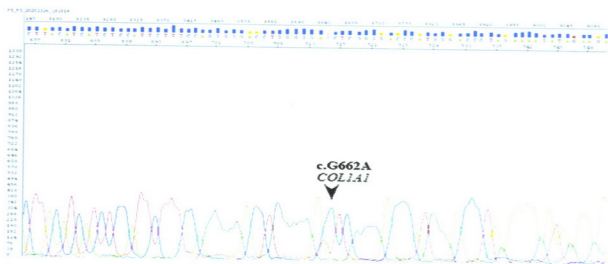


Рисунок 4 – Нуклеотидная замена с.G662A гена *COL1A1*, секвенирование по Сэнгеру

Результаты секвенирования по Сэнгеру в позиции с.662 гена *COL1A1*, представленные на рисунке 4, свидетельствуют о наличии нуклеотидной замены цитозина на тимин (Y обозначает пиримидиновое основание), что подтверждает результаты высокопроизводительного секвенирования.