

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н. И. ВАВИЛОВА  
Российской академии наук

*На правах рукописи*

**ХАДЖИЕВА МАРЬЯМ БОРИСОВНА**

**Генетические ассоциативные исследования риска развития  
пролапса тазовых органов**

03.02.07 – генетика

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д.б.н., проф.  
Абилев Серикбай Каримович

Москва - 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ	стр.
Список сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Эпидемиология пролапса тазовых органов	12
1.2 Патогенез, классификация и симптомы пролапса тазовых органов	13
1.3 Факторы риска развития пролапса тазовых органов	19
1.4 Пролапс тазовых органов как проявление недифференцированной дисплазии соединительной ткани	24
1.5 Генетические факторы развития пролапса тазовых органов	27
1.6 Гены, контролирующие процессы эластогенеза ( <i>FBLN5</i> , <i>LOXLI</i> , <i>FBLN3</i> )	32
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1 Клинические методы	40
2.2 Молекулярно-генетические методы	41
2.2.1 Подбор полиморфных вариантов	41
2.2.2 Пробоподготовка	45
2.2.3 Постановка и детекция результатов ПЦР	46
2.3 Статистическая обработка результатов	46
ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОК	49
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	56
4.1 Полиморфизм генов, контролирующих процессы эластогенеза, и риск развития пролапса тазовых органов	56
4.2 Верификация результатов полногеномных исследований	66
4.3 Полиморфизм генов <i>COL3A1</i> , <i>MMP9</i> , <i>ESR1</i> и <i>PGR</i> и риск развития пролапса тазовых органов. Мета-анализ	72
4.4 Анализ полиморфных вариантов и групп генов, ассоциированных с пролапсом тазовых органов в каталоге PheWAS	79

4.5. Обсуждение полученных результатов	85
Заключение	94
<b>ВЫВОДЫ</b>	95
Список литературы	96
Приложение 1	120
Приложение 2	124
Приложение 3	128

## Список сокращений

ДИ - доверительный интервал

ИМТ – индекс массы тела

МПКТ - минеральная плотность костной ткани

НДСТ - недифференцированная дисплазия соединительной ткани

ПТО - пролапс тазовых органов

СНМП - симптомы нижних мочевых путей

СТ - соединительная ткань

ENCODE - The Encyclopedia of DNA Elements

FDR - False Discovery Rate

GEO - Gene Expression Omnibus

GO - Gene Ontology

GSA-SNP - Gene Set Analysis SNP

GWAS - Genome-Wide Association Study

ICS - International Continence Society

LD - linkage disequilibrium

MAF - minor allele frequency

MGI - Mouse Genome Informatics

OR - odd ratio

PheWAS - Phenome-Wide Association Study

POP-Q - Pelvic Organ Prolapse Quantification

SNP - single nucleotide polymorphism

tagSNP – tagger single nucleotide polymorphism

VLAD - Visual annotation display

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Пролапс тазовых органов (ПТО) – распространенное гинекологическое заболевание, характеризующееся опущением и выпадением тазовых органов в результате ослабления связочно-мышечного аппарата. ПТО часто сопровождается рядом анатомических и функциональных расстройств: преимущественно обструктивным мочеиспусканием или недержанием мочи, гиперактивностью мочевого пузыря, нарушением дефекации, половой дисфункцией, а также постоянным чувством дискомфорта и тяжести в области промежности (Ellerkmann et al., 2001; Adjoussou et al., 2014). Всё это влияет на физическое и психоэмоциональное состояние женщины, приводит к социальной дезадаптации и снижению качества жизни (Fritel et al., 2009).

По данным отечественных исследователей в России частота пролапса составляет 28-38.9% от общего числа гинекологических заболеваний (Адамян и др., 2006; Краснопольский и др., 2006). Поскольку в настоящее время самым распространенным и эффективным методом лечения ПТО является хирургическое вмешательство, данное заболевание не только осложняет жизнь женщин, но и является тяжелой экономической нагрузкой на систему здравоохранения. В структуре гинекологических вмешательств операции по коррекции выпадения матки и влагалища занимают третье место после вмешательств по поводу доброкачественных опухолей и эндометриоза, при этом до 30% женщин, перенесших хирургическое лечение, нуждаются в повторной операции в связи с развитием рецидива пролапса (Буянова и др., 2009; Сухих и др., 2012). В 2005 году на операции по поводу пролапса в Европейских странах (Англия, Франция, Германия) было потрачено от 80 до 145 миллионов евро (Subramanian et al., 2009).

Основной причиной развития ПТО является старение и/или перерастяжение или повреждение тканей связочного аппарата тазовых органов в процессе родов через естественные родовые пути, в особенности осложненных родовыми

травмами, макросомией плода и неоднократными родами. Было отмечено, что риск возникновения пролапса увеличивается с каждым последующими родами: у однократно рожавших женщин  $OR = 2.8$  (95% ДИ: 1.1–7.2), после двух родов  $OR = 4.1$  (95% ДИ: 1.8–9.5), а в случаях трех и более родов  $OR = 5,3$  (95% ДИ: 2.3–12.3) (Rortveit et al., 2007). Подверженность развитию пролапса увеличивается при стремительных или затянувшихся родах, спонтанных разрывах промежности, эпизио- и перинеотомии, макросомии плода и наложении акушерских щипцов (Handa et al., 2012; Memon, Handa, 2013). Однако близнецовые исследования показали, что в постменопаузальном периоде 43% вариабельности, связанной с риском развития ПТО, объясняется наследственностью (Altman et al., 2008).

Особенностью пролапса по сравнению со многими другими многофакторными заболеваниями является тот факт, что для него можно выделить небольшое количество «причинных генов», в частности гены, участвующие в синтезе и деградации компонентов соединительной ткани влагалища, а также гены рецепторов эстрогенов и прогестерона, что делает данную патологию крайне интересной для генетических исследований. Изучение генетических факторов и их взаимодействия с клиническими факторами полезно не только для обоснования методов профилактики прогрессирования заболевания, но и в перспективе для его лечения. В будущем генетически обусловленный дефицит белков соединительной ткани, приводящий к развитию ПТО, может быть восполнен рекомбинатными белками или использованием мезенхимальных стволовых клеток, которые могут применяться для улучшения *de novo* восстановления тканей после родов.

### **Степень научной разработанности проблемы**

Несмотря на высокую частоту заболеваемости пролапсом, генетические факторы развития данной патологии остаются практически неизученными. Ресурс HuGENavigator, представляющий из себя базу данных по генетическим ассоциациям и эпидемиологии генома человека (<http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/hugenavigator.htm>), включает 28 публикаций (на 26 апреля 2016г.) по теме «Pelvic organ prolapse» (ПТО), при этом наибольшее

число работ посвящено изучению генов, контролирующих процессы синтеза и деградации соединительной ткани стенок влагилица (*COL3A1* – 8 публикаций, *COL1A1* – 4, *MMP1* – 4, *MMP3* – 4, *MMP9* – 4, *LAMC1* – 3). В двух полногеномных исследованиях были показаны, но не верифицированы на независимых выборках, ассоциации участка хромосомы 9q21 и шести отдельных SNPs с предрасположенностью к развитию тяжелых форм пролапса в семьях европеоидов (Allen-Brady et al., 2009; Allen-Brady et al., 2011). Два первых мета-анализа ассоциативных генетических исследований ПТО были опубликованы в 2014-2015 годах, причем результаты работ разнятся (Ward et al., 2014; Cartwright et al., 2015). В работе Ward с соавторами показана значимость ассоциации полиморфного варианта rs1800255 гена *COL3A1* с развитием ПТО, в то время как мета-анализ Cartwright с соавторами такой ассоциации не выявил. Корреляция полиморфного варианта rs1800012 гена *COL1A1* с риском развития ПТО, наоборот, зафиксирована в мета-анализе Cartwright, но не в работе Ward. Для остальных генетических вариантов, для которых было возможно осуществление мета-анализа (*LAMC1*, *MMP1*, *MMP3*, *MMP9*), в обеих работах значимых ассоциаций не обнаружено. В связи с малым числом публикаций и небольшим объемом изученных выборок (от 92 до 551 участников исследований) мета-анализы не обладали достаточной статистической мощностью тестов. Роль генов, контролирующих процессы эластогенеза (*FBLN5*, *LOXL1*, *FBLN3*), в развитии пролапса была неоднократно доказана в экспериментах с нокаутными животными и данными об изменении уровня экспрессии соответствующих белков у больных с ПТО, однако влияние вариабельности данных генов на развитие пролапса практически не изучено (Rahn et al., 2009; Takacs et al., 2010; Venkataraman et al., 2012).

### **Цель исследования**

1. Поиск полиморфных вариантов, ассоциированных с повышенным риском развития ПТО экспериментальными и биоинформатическими методами;
2. Оценка взаимосвязи клинических и генетических факторов риска развития ПТО.

### **Задачи исследования**

1. Исследование ассоциации генов, контролирующих процессы эластогенеза (*FBLN5*, *LOXLI*, *FBLN3*):

а) с повышенным риском развития пролапса тазовых органов с учетом клинических факторов развития заболевания;

б) с повышенным риском возникновения разрывов во время родов;

2. Исследование отдельных генетических вариантов (rs1455311, rs1036819, rs430794, rs8027714, rs1810636, rs2236479) и участка хромосомы 9q21, ассоциированных с повышенным риском развития ПТО по результатам полногеномных исследований;

3. Оценка применимости ресурса RegulomeDB, содержащего информацию о регуляторном потенциале SNPs, для подбора полиморфных вариантов при планировании ассоциативных исследований (на примере выбора функциональных SNPs на участке хромосомы 9q21);

4. Анализ генетических вариантов, ассоциированных с ПТО по литературным данным (*COL3A1* (rs1800255), *MMP9* (rs17576), *ESR1* (rs2228480), *PGR* (rs484389)). Выполнение мета-анализов, включающих литературные и собственные экспериментальные данные;

5. Биоинформатический анализ генов, полиморфные варианты которых ассоциированы с ПТО по каталогу PheWAS (Phenome-Wide Association Study).

### **Степень обоснованности научных результатов**

- Результаты экспериментальной части работы, включающие выделение ДНК, аллель специфическую ПЦР реакцию, гельэлектрофорез получены на сертифицированном оборудовании. Качество генотипирования проверено повторным слепым генотипированием 10% образцов методом ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green;

- Выбор исследуемых генов основан на анализе функций этих генов и степени разработанности данной темы в публикациях; выбор полиморфных вариантов базировался на использовании программ: Naploview (подбор таргетных

SNP с целью покрытия всего гена); Regulome DB и SNPexp (подбор функциональных SNP с использованием биоинформатических ресурсов);

- Частоты аллелей и гаплотипов исследованных нами генов в группе женщин без ПТО соответствуют частотам аллелей европейцев, представленными в базе HarMap, что свидетельствует о корректности полученных результатов;

- Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась методом множественной логистической регрессии с учетом ковариат; использовался стратификационный анализ; результаты интерпретировались с учетом мощности теста и множественности сравнений.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Вариабельность генов *FBLN5* и *LOXL1*, участвующих в организации и восстановлении эластических волокон, влияет на риск развития пролапса тазовых органов, в то время как влияние вариабельности гена *FBLN3* незначительно.

2. В выборке российских пациенток подтверждена выявленная при полногеномном анализе сцепления (Genome-Wide Linkage Study) ассоциация ПТО с участком хромосомы 9q21. Наибольший эффект зарегистрирован для межгенного варианта rs12237222, характеризующегося высокой функциональностью по данным RegulomeDB.

3. Генетические варианты, контролирующие минеральную плотность костей по результатам полногеномных исследований, ассоциированы с ПТО в каталоге PheWAS. Данные результаты показывают генетические предпосылки синтропности этих заболеваний.

### **Научная новизна**

1. Впервые исследованы в ассоциации с пролапсом тазовых органов таргетные полиморфные варианты, обеспечивающие полное покрытие генов *FBLN5*, *LOXL1* и *FBLN3*. Для гена *FBLN5* зарегистрирован рисковый гаплотип, состоящий из 12 аллелей. На примере гена *FBLN5* впервые показана роль комбинации клинических (неоднократные роды, макросомия плода, травмы мягких родовых путей) и генетических факторов риска развития ПТО.

2. Впервые верифицирована на независимой выборке корреляция участка хромосомы 9q21 с развитием тяжелых форм пролапса в семьях европеоидов. Впервые показана целесообразность подбора полиморфных вариантов при планировании ассоциативных исследований с помощью ресурса RegulomeDB, обычно применяющегося для *post-hoc* (апостериорного) анализа результатов полногеномных исследований.

3. Впервые выполнен поиск по каталогу PheWAS полиморфных вариантов генов, ассоциированных с ПТО. Биоинформатическими методами показана перспективность изучения роли варибельности групп генов, не относящихся к традиционно изучаемым в связи с данным заболеванием генам.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Генетический статус, определяемый носительством выявленных рискованных аллелей и гаплотипов гена *FBLN5* и *LOXLI*, в том числе и в комбинации с клиническими факторами (с неоднократными родами, макросомием плода, травмами мягких родовых путей), может быть применен при прогнозировании повышенного риска развития ПТО у женщин любого возраста для последующей разработки комплексных превентивных мер (от коррекции образа жизни, характера родоразрешения, до возможной рекомбинантной терапии) с целью уменьшения риска возникновения ПТО, профилактики прогрессирования заболевания и развития тяжелых форм дисфункции тазового дна.

В дальнейшем целесообразно изучить выявленную в ассоциации с ПТО группу генов, контролирующих минеральную плотность костей, в частности ген *SP7*. Экспериментальные и биоинформатические подходы, используемые нами в данной работе, могут быть рекомендованы при выполнении аналогичных ассоциативных исследований.

### **Апробация диссертации и публикации**

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 6 статей, 5 из которых в изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки и 8 тезисов научных конференций; получено 2 патента на изобретение.

Основные результаты доложены на конференциях: Молодежная конференция «Популяционная генетика и геногеография: наука и практика» (Москва, 2013г.); Пленум научного совета РФ по экологии человека и гигиене окружающей среды «Комплексное воздействие факторов окружающей среды и образа жизни на здоровье населения: диагностика, коррекция, профилактика» (Москва, 2014г.); 19-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология - Наука XXI века» (Пушино, 2015г.); VII съезд Российского общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург, 2015г.); European Human Genetics Conference (Милан, 2014г.; Глазго, 2015г.; Барселона, 2016г.); 20-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология - Наука XXI века» (Пушино, 2016г).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть (методы исследований, результаты и обсуждение), выводы, список сокращений, список цитируемой литературы. Работа изложена на 130 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы и 17 рисунков. Библиография включает 221 источник, в том числе 34 на русском и 172 на английском языках и 15 интернет-ресурсов.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Эпидемиология пролапса тазовых органов

Пролапс тазовых органов (ПТО) – наиболее часто встречающееся заболевание современных женщин, занимающее одну из ведущих позиций в структуре гинекологической патологии (Довгалева и др., 2012). Учет встречаемости ПТО основан преимущественно на статистике обращаемости пациенток и проводимых оперативных вмешательств, в связи с чем, данные о частоте заболеваемости в современной литературе сильно разнятся (от 1% до 60% в популяции). В рамках программы Women's Health Initiative, организованной Национальным институтом здоровья (США), из обследованных 16,616 женщин постменопаузального возраста (50-79 лет), ПТО был выявлен у 41%, в том числе 34.3% цистоцеле (опущением передней стенки влагалища), 18.6% ректоцеле (опущением задней стенки влагалища) и 14.2% опущение матки (Hendrix et al., 2002). Распространенность ПТО во многом зависит от социального, экономического и медицинского уровня развития страны и некоторых национальных особенностей (Буянова и др., 2009). При исследовании 5,5 тысяч шведских женщин в возрасте 30-79 лет пролапс тазовых органов был зарегистрирован у 8,3%, а в развивающихся странах, таких как Иран, Египет, Гамбия, уровень заболеваемости достигает 50-56% (Tegerstedt et al., 2005; Godfrey et al., 2011).

Рядом исследователей было выдвинуто предположение о наличии расовых различий в распространенности ПТО (Hendrix et al., 2002; Sewell et al., 2007). При исследовании произвольной выборки, состоящей из 2,270 женщин 40-69 лет различной расовой принадлежности, Whitcomb E.L. с коллегами (2009) выявили, что риск симптоматического ПТО выше у белых и латиноамериканских женщин (коэффициент распространенности 5.35 и 4.89 соответственно) по сравнению с афроамериканками. Аналогичная закономерность была отмечена при изучении расовых особенностей ПТО в работе Kudish с коллегами (2011) в группе из 12,667 женщин (11,194 белых, 804 афроамериканок, 669 латиноамериканок); наблюдение

за пациентками осуществлялось в течение пяти лет (рисунок 1.1.1).

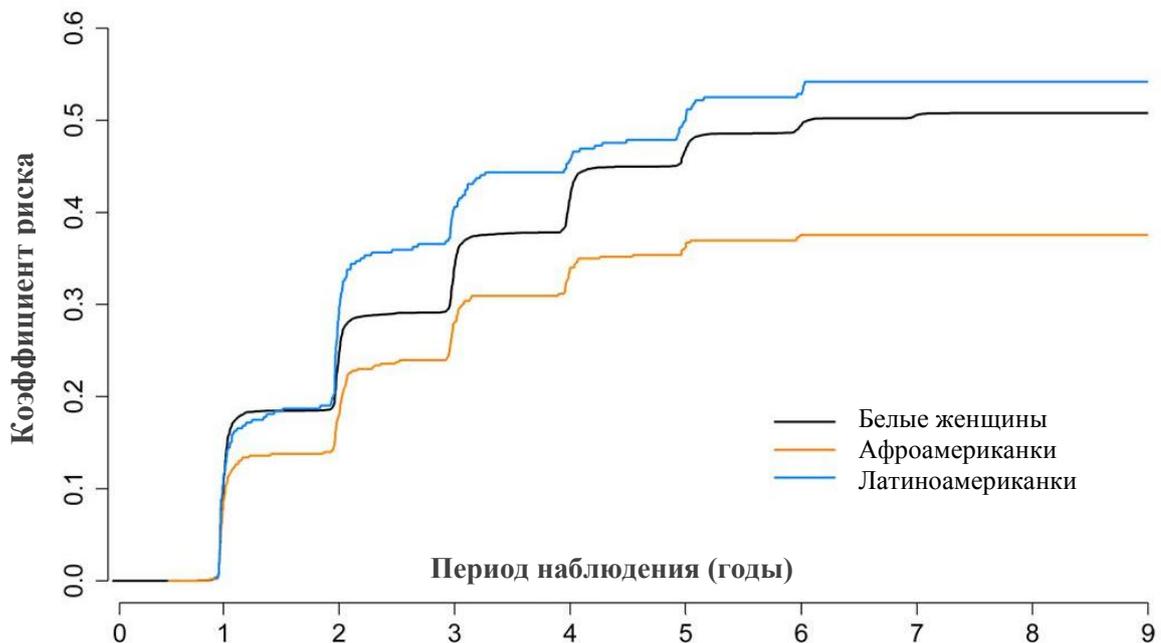


Рисунок 1.1.1 Риск развития ПТО у представительниц различных рас (Kudish et al., 2011).

Несмотря на полиэтиологичность пролапса, одной из основных причин является старение. Распространенность ПТО среди женщин старше 80 лет в 5 раз больше относительно числа пациенток в возрасте 20–39 лет (Nygaard et al., 2008). По данным Бюро переписи населения США с 2005 по 2030 численность женщин старше 65 лет увеличится в два раза (Weber, Richter, 2005). Однако заболевание нередко начинается в репродуктивном возрасте и носит прогрессирующий характер, причем по мере развития процесса усугубляются и функциональные нарушения (Гутикова, 2012; Аполихина и др., 2014). Таким образом, в связи с увеличением продолжительности жизни женщин и «омоложением» заболевания высока вероятность роста числа женщин, страдающих пролапсом тазовых органов.

## 1.2 Патогенез, классификация и симптомы пролапса тазовых органов

Развитие пролапса обусловлено нарушением анатомической структуры поддерживающего тазовые органы аппарата, который представляет собой комплекс мышц, фасций и связок. Данный аппарат формирует три уровня

поддержки влагалища (таблица 1.2.1) (Малхасян, Абрамян, 2011). Схематическое изображение поддерживающего аппарата в продольном и поперечном сечении представлено на рисунке 1.2.1 (а, б).

Таблица 1.2.1

## Поддерживающий аппарат влагалища

Уровень	Орган	Фиксирующие структуры	Форма ПТО
I уровень	Верхняя треть влагалища и матка	Фиксируется волокнами маточно-копчиковой и кардинальными связками.	Выпадение свода влагалища
II уровень	Средняя треть влагалища	Фиксируется средней частью висцеральной фасции таза	Формирование уретроцеле, цистоцеле и ректоцеле
	Передняя стенка влагалища	Удерживается в месте латерального прикрепления пубоцервикальной фасции над внутренней запирающей мышцей у сухожильной дуги фасции таза	
	Задняя стенка влагалища	Удерживается с боков волокнами ректовагинальной фасции вышележащей подвздошно-копчиковой мышцы	
III уровень	Нижняя треть влагалища	Стенки влагалища соединяются с внутритазовой фасцией и пубоуретральными связками над медиальными краями лобково-копчиковой мышцы	Формирование уретроцеле

В зависимости от характера ослабления и/или повреждения развиваются различные формы ПТО:

- пролапс матки или свода влагалища (выпячивание верхней части влагалища);
- цистоцеле (выпячивание в передней стенке влагалища и опущение мочевого пузыря в полость влагалища);
- энтероцеле (выпячивание брюшины с содержимым или без него через фасциальный слой между влагалищем и стенками прямой кишки);
- ректоцеле (выпячивание прямой кишки через влагалище).

При этом выделяют простую и осложненную формы ПТО: к простой форме относится опущение стенок влагалища и матки без нарушения функций других тазовых органов; осложненная форма ПТО характеризуется развитием цисто-, ректо-, энтероцеле и нарушением функций кишечника и мочевого пузыря (Буянова и др., 2009).

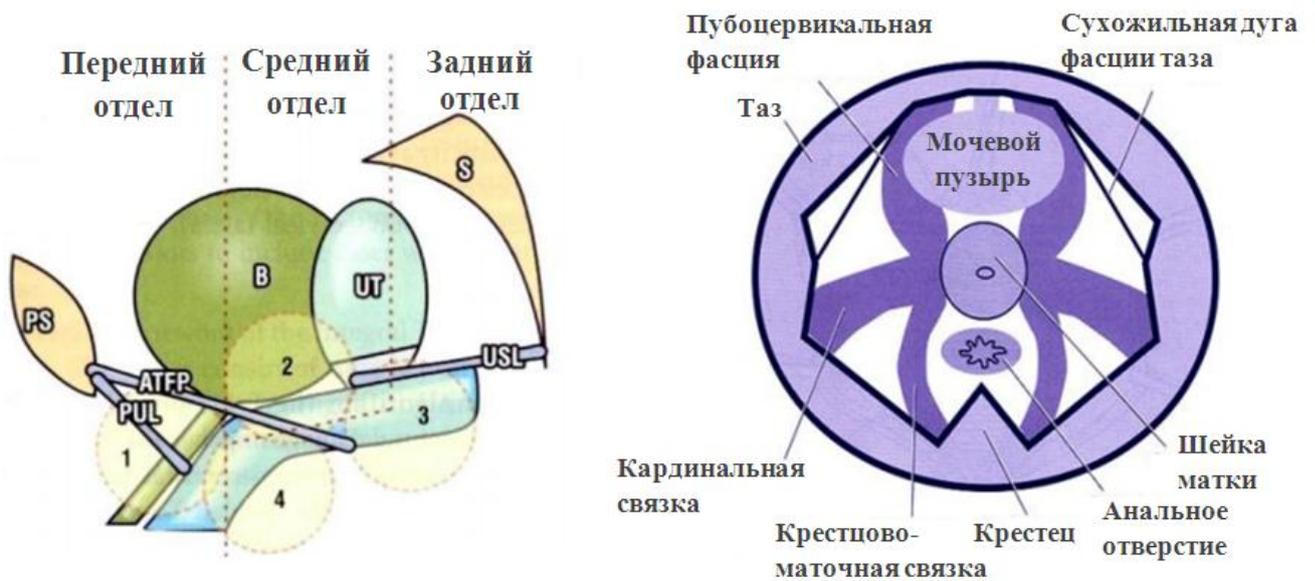


Рисунок 1.2.1 а Схематическое изображение поддерживающего аппарата влагалища (продольное сечение) PS – лобок, В – мочевого пузыря, UT – матка, S – крестец, АТФР – сухожильная дуга, PUL – пубоуретральная связка, USL – маточно-крестцовая связка.

Рисунок 1.2.1 б Схематическое изображение поддерживающего аппарата влагалища (поперечное сечение)

В настоящее время для определения степени пролапса используют стандартизованную систему количественной оценки ПТО (Pelvic Organ Prolapse Quantification, POP-Q), предложенную Международным обществом по удержанию мочи (International Continence Society, ICS) (Bump et al., 1996; Камоева, 2015). Стадирование выполняется по наиболее дистально расположенной части влагалищной стенки. Использование классификации POP-Q

позволяет более точно оценить степень ПТО и обеспечивает объективность клинической диагностики заболевания. Ниже представлена упрощённая схема классификации POP–Q (таблица 1.2.2) (Кулакова и др., 2009).

Таблица 1.2.2

## Упрощённая схема классификации POP–Q

Стадия 0	нет пролапса
Стадия I	наиболее выпадающая часть стенки влагалища не доходит до гимена на 1 см (значение $>-1$ см)
Стадия II	наиболее выпадающая часть стенки влагалища расположена на 1 см проксимальнее или дистальнее гимена
Стадия III	наиболее выпадающая точка более чем на 1 см дистальнее гименальной плоскости, но при этом общая длина влагалища (TVL) уменьшается не более чем на 2 см
Стадия IV	полное выпадение. Наиболее дистальная часть пролапса выступает более чем на 1 см от гимена, а общая длина влагалища (TVL) уменьшается более чем на 2 см

Пролапсу тазовых органов сопутствует широкий спектр нарушений, обусловленный тесными анатомическими связями между стенками влагалища, мочевым пузырем и прямой кишкой. В работе Ellerkmann R. с коллегами (2001), целью которой явилось изучение корреляции симптомов с различными формами и степенью пролапса, было показано, что увеличение тяжести ПТО ассоциировано с рядом осложнений, связанных с нарушением мочеиспускания и дефекации, а также с сексуальной дисфункцией, причем для недержания мочи была показана обратная корреляция с тяжестью ПТО, что скорее всего связано со сдавлением уретры при сильном опущении. Из 237 женщин, принявших участие в исследовании, 73% страдало недержанием мочи (преимущественно смешанным типом), 49% обструктивным мочеиспусканием, 44% отмечали боли в промежности, 67% жаловались на нарушение дефекации и 69% на диспареунию (болезненный половой акт). По данным Попова (2000) аналогичные

функциональные расстройства смежных органов развиваются у 85,5% женщин с ПТО. Чаще всего, для женщин, страдающих данным заболеванием характерны симптомы нижних мочевых путей (СНМП), причем для более тяжелых форм ПТО свойственна обструкция, которая в свою очередь может привести и к более серьезным проблемам: острому обструктивному пиелонефриту, уретерогидронефрозу и хронической почечной недостаточности (Lowder et al., 2010; Михальчук и др., 2012; Dubowitch et al., 2014).

Неоднократно отечественными и зарубежными коллегами отмечалось сочетание ПТО с миомой матки (Gurung et al., 2003; Краснопольская, 2004; Teramoto et al., 2014). Имеются данные о корреляции пролапса с асимптоматической микрогематурией (наличием эритроцитов в моче выше нормы), гипертензией, диабетом, а также акромегалией (Celik et al., 2014; Töz et al., 2015; Isik et al., 2016). Интересной является сопряженность ПТО с гипермобильностью суставов, варикозным расширением вен нижних конечностей, низкой минеральной плотностью костной ткани, геморроем, стриями и грыжами, что возможно обусловлено общими механизмами развития заболеваний, в частности дистрофией соединительной ткани (Salter et al., 2006; Lammers et al., 2012; Lee et al., 2015; Veit-Rubin et al., 2015; Mothes et al., 2016).

Существует неразрывное взаимодействие мышц промежности (особенно мышц, поднимающих задний проход и смыкающих половую щель), которое обеспечивает необходимый тонус тазовому дну и стабильность соединительно-тканной поддерживающей системы, и некоторое ее растяжение только при напряжении. При нарушении целостности мышечно-фасциальных структур тазового дна происходит снижение сократительной способности и нарушение нервно-рефлекторной проводимости. В дальнейшем наступает их атрофия и неспособность поддерживать нормальное положение внутренних половых органов (Пересада и др., 2010; Гутикова, 2012). Нейромышечное повреждение преимущественно происходит во время вагинальных родов или гистерэктомии (Berger et al., 2014). При наличии повреждения *m. levator ani* (мышца, поднимающая задний проход) риск развития ПТО увеличивается в два раза (Dietz

et al., 2008). Травма полового нерва (pudendal nerve), обеспечивающего иннервацию наружного уретрального и анального сфинктеров, может привести к развитию недержания мочи и кала (Kerns et al., 2000). Снижение тонуса и сократительной способности мышц тазового дна вследствие денервации способствует развитию ПТО (Word et al., 2009), однако при отсутствии беременности и родов функциональная полноценность мышц играет незначительную роль в обеспечении поддержки внутренних органов, так как основная роль отводится соединительнотканым структурам. Предполагается, что ключевым механизмом развития ПТО являются изменения в связочном аппарате и фасциях, происходящие во время беременности и родов, а также при старении (Забродец и др., 2012).

Прочность и эластичность поддерживающего аппарата обеспечивается коллагеновыми и эластическими волокнами, являющимися основными компонентами соединительной ткани. Кроме родов повреждение данных структур может быть обусловлено хроническим повышением внутрибрюшного давления, гистерэктомией (удаление матки), процессом естественного старения, а также наследственным нарушением метаболизма соединительной ткани. Интересно взаимовлияние соединительнотканых и нервных повреждений. Нарушение фиксации и избыточная подвижность органов и структур таза, обусловленная первичной патологией соединительной ткани может привести к повреждению нервных волокон, а прогрессирующая денервация, в свою очередь, к развитию нейротрофических расстройств и усугублению дегенеративных изменений соединительной ткани промежности. В работе Шельгина Ю.А. с коллегами в группе женщин с синдромом опущения промежности были выявлены изменения коллагенового каркаса кожи промежности, связок таза, стенок влагалища с заметной диссоциацией, дезорганизацией и деструкцией коллагена, что сопровождалось выраженным гиперэластозом и лимфостазом в соединительнотканых структурах промежности. У 88,8% пациенток было обнаружено статистически значимое нарушение проведения электрических импульсов по половым нервам, а у 70,4% – выраженная денервация нервных

волокон рефлекторной дуги от крестцового отдела позвоночника до анального сфинктера (Шельгин и др., 2014).

Таким образом, в основе развития ПТО любой степени и локализации лежит ослабление поддерживающего тазовые органы аппарата, обусловленное нейропатией полового нерва, миопатией *m. levator ani* и перерастяжением и/или повреждением соединительнотканых структур.

### **1.3 Факторы риска развития пролапса тазовых органов**

Пролапс тазовых органов характеризуется полиэтиологичностью и обусловлен сочетанием образа жизни, анатомических, физиологических, генетических и репродуктивных факторов, оказывающих влияние на состояние поддерживающего тазовые органы аппарата на протяжении всей жизни женщины. DeLancey выделил три группы рисков факторов развития ПТО: предрасполагающие (генетические факторы, семейный анамнез, анатомические особенности и др.), инициирующие (факторы, приводящие к повреждению структур тазового дна) и содействующие (возрастные изменения, образ жизни и др.) (DeLancey et al., 2008) (рисунок 1.3.1).

Традиционно ПТО связывают с систематическим или чрезмерным повышением внутрибрюшного давления, которое может быть спровоцировано тяжелым физическим трудом, физическими упражнениями, хроническим кашлем, запорами и избыточным весом. В ходе изучения влияния социально-экономического статуса на риск развития пролапса в группе из 1004 обследованных женщин было выявлено, что достоверно чаще тяжелыми формами ПТО страдали разнорабочие и работницы заводов по сравнению с другими категориями (домохозяйки, работницы управленческой, сервисной, технической и прочих сфер) (Woodman et al., 2006). Повышенная вероятность развития пролапса также характерна для медицинского персонала больниц и домов престарелых, осуществляющего уход за пациентами (Jørgensen et al., 1994).

В ряде исследований было показано, что женщины, страдающие лишним весом и ожирением подвержены формированию ПТО, что происходит за счет

увеличения давления на брюшные мышцы и мышцы таза. По данным немецких исследователей у женщины с индексом массы тела (ИМТ) более 30 кг/м<sup>2</sup> вероятность развития ПТО в 2.3 раза выше, чем у женщин с нормальным весом (Hendrix et al., 2002; Mothes et al., 2016).

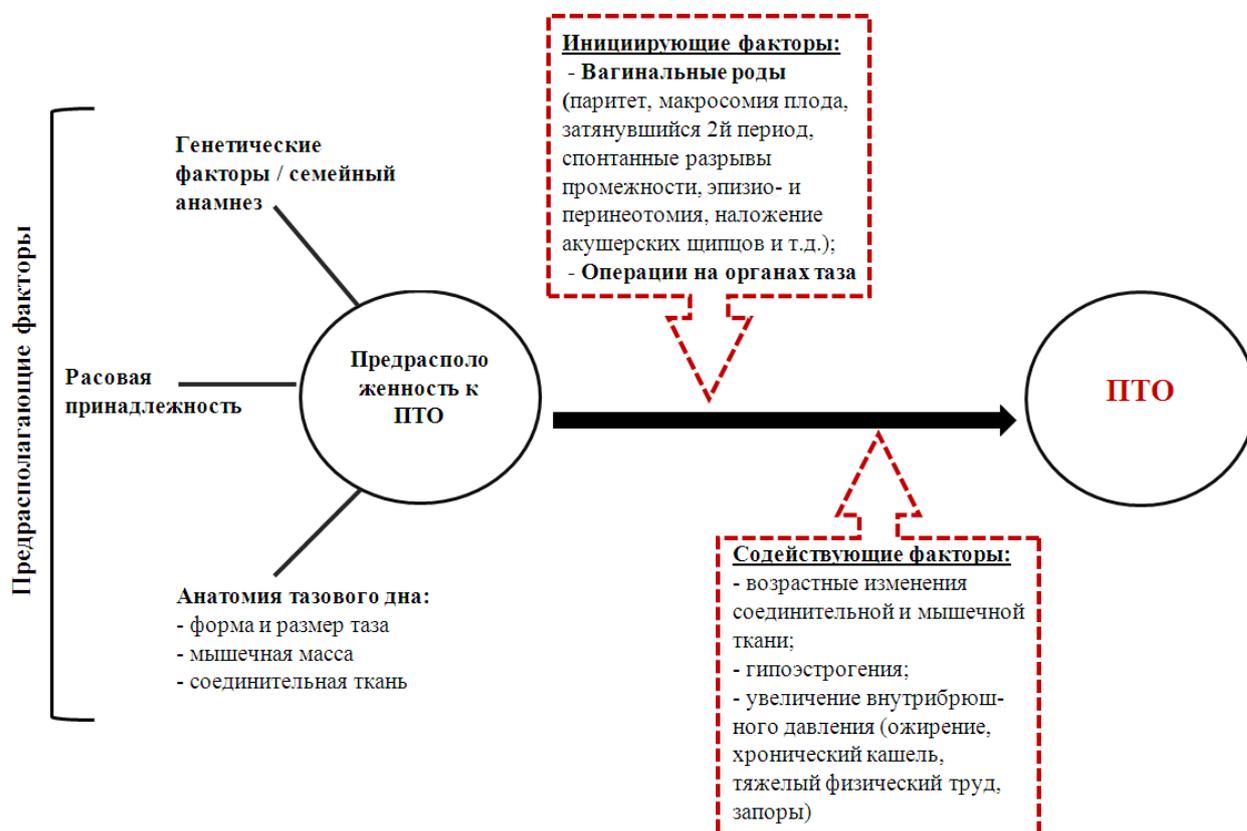


Рисунок 1.3.1 Рисковые факторы ПТО по DeLancey (DeLancey et al., 2008)

Систематический обзор 15 работ, направленный на оценку вклада 30 рисков факторов в развитие ПТО, выявил значимые корреляции пролапса с паритетом, вагинальными родами, возрастом и ИМТ, а наличие тяжелой формы ПТО (IV стадия) – с повышенной вероятностью рецидива после хирургического вмешательства (Vergeldt et al., 2015). Доказано, что каждые последующие вагинальные роды повышают риск опущения тазовых органов (Mant et al., 1997; Rortveit et al., 2007). Так, по результатам эпидемиологического исследования пролапса в Гамбии женщины с 1-3 родами имели вероятность развития данного заболевания в 6.39 раз, с 4-7 родами – в 11.69 раз, с 8 и более родами – в 14.95 раз выше по сравнению с нерожавшими женщинами (Scherf et al., 2003). Однако в

литературе имеются данные о влиянии на формирование ПТО только первых родов, увеличивающих вероятность развития заболевания в 9.7 раз, в то время как последующие роды оказывают незначительное влияние (Quiroz et al., 2010). Корреляция с развитием данного заболевания также была обнаружена для женщин с поздними первыми родами (старше 30 лет) (Leijonhufvud et al., 2012). Подверженность развитию пролапса увеличивается при затянувшемся втором периоде родов, спонтанных разрывах промежности, эпизио- и перинеотомии, повышенной массе плода (>4000г) и наложении акушерских щипцов; данные осложнения приводят к повреждению и ослаблению поддерживающего тазовые органы аппарата (Handa et al., 2012; Memon, Handa. 2013). Оперативные вмешательства в роды увеличивают риск возникновения ПТО в 7.5 раз спустя 5-10 лет после первых родов, в то время как кесарево сечение играет протективную роль, уменьшая вероятность опущения тазовых органов в два раза (Handa et al., 2011; Durnea et al., 2014; Gyhagen et al., 2015). Многофакторный характер влияния родов на развитие ПТО представлен на рисунке 1.3.2.

Еще одним фактором, провоцирующим формирование ПТО, является гистерэктомия, в результате которой происходит опущение свода влагалища, а также цисто- и ректоцеле (Hendrix et al., 2002), при этом, чем обширнее проводимая операция, тем выше риск развития пролапса. Частота хирургических вмешательств относительно пролапса в группе из 7,645 пациенток с ранее выполненной гистерэктомией составила 7.2% (Aigmueller et al., 2010). Очевидно, что развитие пролапса после гистерэктомии более вероятно, если перед операцией у пациентки имелись дефекты тазового дна или пролапс, который не был оценен до оперативного вмешательства и, соответственно, не был скорректирован интраоперационно (Макаров и др., 2011).

ПТО преимущественно встречается в позднем репродуктивном и перименопаузальном периодах и с возрастом встречаемость заболевания прогрессивно увеличивается (Progetto Menopausa Italia Study Group, 2000; Swift et al., 2005). Swift S. с коллегами (2005) показал, что вероятность развития ПТО возрастает с каждой последующей декадой жизни. Из 1,123 норвежских женщин,

подвергшихся операционному вмешательству по поводу ПТО, 2.0% составили пациентки до 40 лет, 24.3% - от 40 до 59 лет и 73.8% женщин старше 60 лет (Lonnée-Hoffmann et al., 2015).

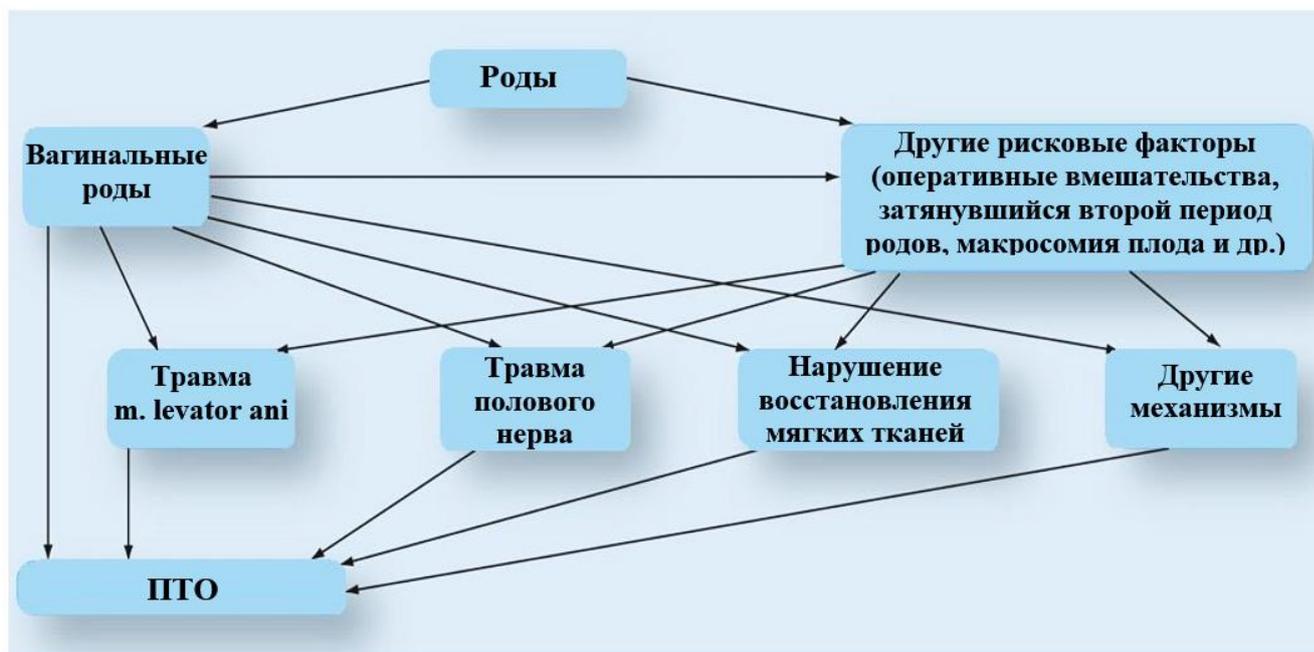


Рисунок 1.3.2 Роды как рискованный фактор ПТО (Memon, Nanda, 2013)

Пролапс тазовых органов во многом является эстрогензависимым заболеванием. Рецепторы эстрогенов обнаружены в слизистой оболочке и мышечных слоях стенки влагалища, эпителиальной, мышечной, соединительной тканях и сосудистых структурах уретры, в детрузоре, в мышцах и соединительнотканых структурах малого таза (Press et al., 1986). В период менопаузы наблюдается гипоестрогения, которая приводит к атрофическим изменениям мочеполового тракта, замедлению скорости обновления коллагена и образованию большого количества сшивок между волокнами коллагена, что ведет к упрочнению и снижению эластичности ткани, тем самым способствуя развитию ПТО (Сухих и др., 2012). У женщин менопаузального возраста с ПТО отмечается утоньшение вагинальных стенок и снижение уровня эстрадиола по сравнению с женщинами пременопаузального возраста (Da Silva Lara et al., 2009). Большинство исследований свидетельствуют о целесообразности применения гормонозаместительной терапии при дефиците эстрогенов женщинами с

опущением тазовых органов (Bernier, Jenkins, 1997; Shahryarinejad et al., 2010; Rahn et al., 2015), однако ряд работ показывает отсутствие эффекта от данной процедуры (Hendrix et al., 2002; Trutnovsky et al., 2013).

Немаловажную роль в развитии ПТО играет наследственность, о чем свидетельствуют семейные формы данной патологии, частота которых может достигать 28% в структуре заболеваемости (Lince et al., 2012; Mothes et al., 2016). На основе данных Шведского близнецового регистра (the Swedish Twin Registry), выявлено, что более 40% вариабельности, связанной с риском развития ПТО, составляет наследственный фактор (Altman et al., 2008). В исследовании женщин моложе 55 лет с тяжелыми формами пролапса (III-IV стадии) показано, что семейная отягощенность ПТО увеличивает риск развития данного заболевания в пять раз. Изучение генеалогического древа данных пациенток позволило сделать вывод, что в этих семьях пролапс наследовался по доминантному типу с высокой степенью пенетрантности (Jack et al., 2006). По результатам исследования Norton с коллегами (2013) в группе из 1292 женщин с пролапсом риск развития данной патологии увеличивается в 4.15 раз при наличии семейного анамнеза в первой степени родства и в 1.24 раза при наличии семейного анамнеза в третьей степени родства. Годом ранее был выполнен систематический обзор, который включил в себя имеющиеся на тот момент работы по изучению наследственности ПТО (Lince et al., 2012). Общая выборка из восьми включенных в мета-анализ работ составила 3,048 женщин. Несмотря на различный подход изучения семейного анамнеза и критерии отбора, во всех работах (Chiaffarino et al., 1999; Sharma et al., 2003; McLennan et al., 2008; Miedel et al., 2009; Rodrigues et al., 2009; Slieker-ten Hove et al., 2009) за исключением двух исследований (Sewell et al., 2007; Braekken et al., 2009) была показана достоверная корреляция опущения тазовых органов с наследственностью. По результатам мета-анализа вероятность развития ПТО среди женщин, отягощенных семейной историей составила 2.58 (рисунок 1.3.3).

Наряду с выше описанными рисковыми факторами, одним из самых важных в развитии ПТО является дефект соединительной ткани, о чем свидетельствуют случаи развития пролапса среди нерожавших женщин и женщин, имевших одни

неосложненные роды (Harris et al., 1998; Буянова и др., 2008). Женщины, страдающие наиболее известными наследственными соединительнотканными заболеваниями, - синдромом Элерса-Данлоса и синдромом Марфана, а также синдромом вялой кожи (Cutis laxa) имеют более высокий риск развития ПТО. Синдром Марфана связан с дефектом гена фибриллина-1, приводящим к нарушению структуры эластических волокон, тогда как синдром Элерса—Данлоса включает как минимум 10 различных субтипов, происходящих из дефекта гена коллагена, приводящего к патологической продукции коллагена (Нафтулович и др., 2013). Сопряженность пролапса с данными патологиями позволяет предположить, что нарушение функции СТ выступает в качестве важного этиологического фактора (Carley, Schaffer, 2000; Paladini et al., 2007; Нафтулович и др., 2013).

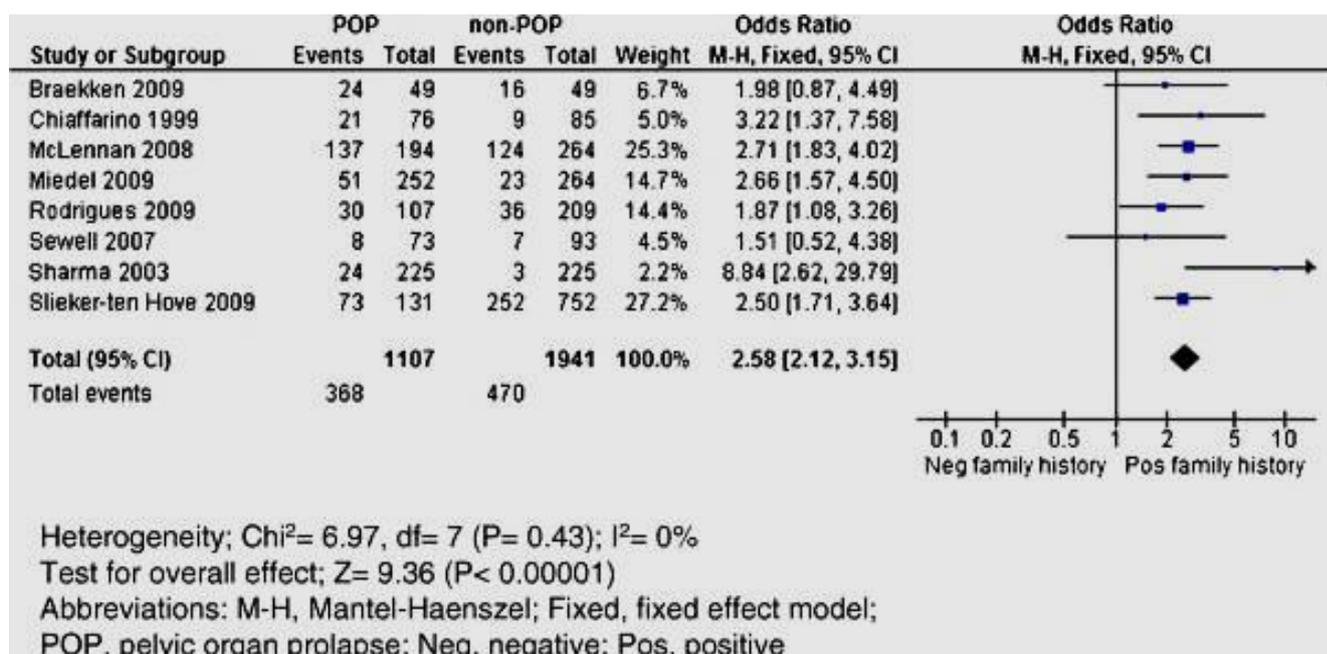


Рисунок 1.3.3 Вклад семейного анамнеза в развитие ПТО (Lince et al., 2012)

#### 1.4 Пролапс тазовых органов как проявление недифференцированной дисплазии соединительной ткани

Недифференцированная дисплазия соединительной ткани (НДСТ) - группа состояний, при которых совокупность фенотипических признаков не укладывается ни в один из синдромов дифференцированной ДСТ. Данная группа

является генетически гетерогенной и ассоциируется с развитием многофакторных заболеваний, характеризующихся прогрессивным течением, возникающих у людей с определенной генетической предрасположенностью в период раннего эмбриогенеза или постнатально под действием экзогенных факторов (Нафтулович и др., 2013). К клинко-морфологическим проявлениям НДСТ относятся скелетные изменения (астеническое телосложение, арахнодактилия, деформация грудной клетки, сколиозы, кифозы и лордозы позвоночника, синдром «прямой спины», плоскостопие и др.), изменения со стороны кожи (гиперэластичность, истончение), гипермобильность суставов, патология органов зрения (миопия), поражения сердечно-сосудистой системы (пролапс митрального клапана, варикозная болезнь, патологии гемостаза), бронхолегочные поражения, образование грыж различной локализации и др.

В работе отечественных коллег из 208 обследованных пациенток репродуктивного возраста, страдающих ПТО, 83,9% имели признаки синдрома ДСТ, в том числе гипермобильность суставов была выявлена у 46,1% больных, плоскостопие – у 69,2%, искривление позвоночника – у 38%. Варикозной болезнью страдали 53,8% больных, вегетососудистыми дисфункциями – 49% женщин, пролапс митрального клапана выявлен у 43,3%, аномально-расположенные хорды – у 87% больных, нарушение сердечного ритма и проводимости – у 38%. Гастроптоз, нефроптоз, грыжи выявлены у 12%, 6,7%, 14,4% больных, соответственно, нестабильность тазовых органов – у 70,9% пациенток. Для участниц исследования было характерно раннее развитие ПТО (в 30-35 лет) после единственных неосложненных родов; а наличие тяжелых форм пролапса находилось в прямой взаимосвязи с тяжестью проявлений ДСТ (Смольнова и др., 2008).

Veit-Rubin с коллегами выполнил систематический обзор работ, посвященных ассоциации пролапса тазовых органов с гипермобильностью суставов. Мета-анализ данных из 14 исследований выявил клинически значимую корреляцию между рассматриваемыми патологиями (OR=2.37; 95% ДИ 1.54–3.64) (Veit-Rubin et al., 2015). Некоторые исследователи рассматривают ПТО как

разновидность грыжи тазового дна, развивающейся в области влагалищного входа (von Theobald et al., 2011; Камоева, 2015), однако сведения о сопряженности данных заболеваний в настоящее время довольно скудные. В исследовании, посвященном изучению предрасполагающих к развитию ПТО факторов у молодых женщин (до 45 лет), было показано, что женщин, перенесших операции по поводу абдоминальных грыж, а также страдающих астмой в группе с пролапсом больше чем в контрольной группе (Rinne, Kirkinen, 1999). Корреляция опущения тазовых органов с паховыми грыжами и грыжами пищеводного отверстия диафрагмы была зарегистрирована Segev Y с коллегами (2009). Стрии (растяжки) так же, как и пролапс возникают в результате нарушения целостности соединительной ткани, вызванной растяжением; при этом обе патологии характеризуются снижением количества коллагена (Salter et al., 2006). Развитие ПТО связано не только с наличием стрий, но и с их количеством (Kurt et al., 2014; Miranne et al., 2014). При изучении сопряженности пролапса тазовых органов с другими коллаген-зависимыми заболеваниями, наряду с гипермобильностью суставов, достоверная совместная встречаемость с ПТО была зарегистрирована для варикоза вен нижних конечностей (Lammers et al., 2012). Доказано, что возникновение и интенсивность прогрессирования варикоза предопределяется степенью выраженности дисплазии соединительной ткани (Захарьян, 2013). Сочетание опущения тазовых органов с комплексом заболеваний соединительнотканной этиологии (варикозом, грыжами и геморроем) было отмечено в работе Miedel с коллегами (2009), направленной на изучение рисков факторов симптоматического пролапса. Как для пролапса тазовых органов, так и для грыж различной локализации, стрий, гипермобильности суставов и варикозной болезни вен отмечается нарушение метаболизма коллагена (Lammers et al., 2012).

Таким образом, можно предположить, что пролапс тазовых органов является частичным проявлением системной дисплазии соединительной ткани на уровне репродуктивной системы.

### 1.5 Генетические факторы развития пролапса тазовых органов

Так как пролапс тазовых органов в последнее время всё чаще рассматривается как проявление НДСТ, основной пул генетических исследований направлен на изучение генов, участвующих в синтезе и деградации компонентов СТ влагалища (Довгалева и др., 2012). Первой гипотезой о роли нарушения метаболизма коллагена в развитии опущения тазовых органов была доказана в 1996 году Jackson S.R. с коллегами, которые выявили у женщин с ПТО уменьшение содержания коллагена на 25% по сравнению со здоровыми женщинами, а также увеличение активности матриксных металлопротеиназ (ММП), ответственных за деградацию компонентов внеклеточного матрикса, в том числе и коллагеновых волокон (Jackson et al., 1996). Коллаген представляет собой фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани и обеспечивающий ее прочность. Молекула коллагена состоит из трех  $\alpha$ -цепей, скрученных в одну регулярную спираль, стабилизированную водородными связями между боковыми группами составляющих ее аминокислот (Фадеев и др., 1999). Аминокислотный состав коллагена является уникальным и характеризуется высоким содержанием остатков глицина, аминокислот и оксикислот, причем на долю глицина приходится 33 %, пролина – 10 %, оксипролина – 10 %. Последовательность аминокислотных остатков в молекуле коллагена отличается высокой степенью регулярности, где каждый третий остаток является глицином (Коновалов, 2007). Из 28 известных типов коллагена наиболее важными для поддержки тазовых органов являются коллагены I и III типов. В большей степени связывающий аппарат представлен коллагеном I типа, придающий связкам прочность за счет длины и толщины волокон, и в меньшей степени коллагеном III типа, увеличение количества которого ассоциировано со снижением механической прочности СТ (Lim et al., 2014). Работы по оценке изменения соотношения данных типов коллагена в связках и стенках влагалища при развитии ПТО конкретной закономерности не выявили (Kerkhof et al., 2009; Lim et al., 2014). В ассоциации с пролапсом неоднократно был изучен полиморфный вариант rs1800012 гена *COL1A1* (альфа-1 цепь коллагена I типа), расположенный

в сайте связывания транскрипционного фактора Sp1. Замена G на T приводит к нарушению нормального соотношения субъединиц в молекуле коллагена, и как следствие к ухудшению его механических свойств. Данный полиморфный вариант ассоциирован со снижением минеральной плотности костной ткани и остеопорозом, особенно среди женщин постменопаузального периода (Mann et al., 2001). Однако в отношении развития ПТО результаты исследований rs1800012 оказались противоречивыми (Ward et al., 2014; Cartwright et al., 2015).

В мета-анализе, выполненном Ward R.M. с коллегами (2014) было показано, что носительство генотипа rs1800255-A/A гена *COL3A1* увеличивает вероятность развития ПТО в 4.79 раз. Нуклеотидная замена 2092G>A (rs1800255) приводит к замене аланина на треонин (Ala698Thr), что возможно влияет на прочность коллагеновых волокон. Кроме ассоциации с ПТО, rs1800255-A коррелирует с развитием интракраниальной (внутричерепной) аневризмы, повышенной вероятностью разрывов передней крестообразной связки и с развитием первичной открытоугольной глаукомы (Киселева и др., 2013; Varinder et al., 2013; Stępień-Słodkowska et al., 2015).

Наряду с коллагеном в тканях тазового дна у женщин с пролапсом снижается и общее содержание эластина. Активированный коллагенолиз и усиленная эластолитическая активность обуславливают разрыхление ЭЦМ в связочном аппарате матки и могут приводить к развитию ПТО. Матриксные металлопротеиназы (ММП) относятся к семейству внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса. Они играют важную роль в ремоделировании тканей, ангиогенезе, пролиферации, миграции и дифференциации клеток, апоптозе, сдерживании роста опухолей (Радзинский и др., 2014). При пролапсе отмечается повышенная активность матриксных металлопротеиназ во влагалищных стенках и крестцово-маточных связках, в частности ММП-1,-2 и -9, регулирующих деградацию коллагенов (Liang et al., 2010; Budatha et al., 2011; Dviri et al., 2011). ММП-1 (известна как интестинальная коллагеназа, коллагеназа фибробластов или коллагеназа I) расщепляет коллагены I, II и III типов; синтезируется фибробластами,

хондроцитами, макрофагами, кератиноцитами, эндотелиальными клетками и остеобластами. Мутации в гене *MMP1* ассоциированы с хронической обструктивной болезнью легких, раком молочной железы, колоректальным раком, воспалительными заболеваниями кишечника (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

*MMP-2* (желатиназа) прежде всего экспрессируется в мезенхимальных клетках (главным образом в фибробластах) в период развития и регенерации ткани, а также синтезируется нейтрофилами, макрофагами и моноцитами. *MMP-2* необходима для ингибирования процесса ангиогенеза в опухолях, и ее уровень повышен в эндотелии сосудов опухоли и в моче пациентов с различными опухолевыми образованиями. *MMP-2* участвует в деградации коллагена IV, V, VII и X типов, эластина и фибронектина ([www.biochemmack.ru](http://www.biochemmack.ru)). *MMP-9* (также известная как желатиназа B) секретируется как зимоген массой 92 kDa. Субстраты для *MMP-9* включают денатурированный коллаген I типа (желатин), нативные коллагены типов IV, V, VII, X и XI, фибриноген, витронектин, IL-1 и энтактин, который соединяет ламинин и коллаген IV типа. *MMP-9* принимает участие в процессах воспаления, ремоделирования ткани и репарации, мобилизации матрикс-связанных факторов роста и процессинга цитокинов. Ее экспрессия коррелирует с десмоплазией, которая сопровождает рак поджелудочной железы, метастазами лимфатических узлов при раке молочной железы и болезнями периодонта ([www.biochemmack.ru](http://www.biochemmack.ru)). Активность *MMP* регулируется ингибиторами тканевых металлопротеиназ (*TIMP*), которые могут блокировать разрушение экстрацеллюлярного матрикса (Сухих и др., 2012; Хе, 2012). У пациенток с ПТО наблюдается снижение уровня экспрессии генов *TIMP-1* и *TIMP-2* с одновременным повышением активности матриксных металлопротеиназ (Alarab et al., 2014; Wang et al., 2014). В корреляции с пролапсом выявлена комбинация инсерции гуанина в положении -1607/-1608 промоторной области гена *MMP1* (rs1799750) и инсерции аденина в положении -1612/-1617 промоторной области гена *MMP3* (rs3025058) (Skorupski et al., 2013). При изучении восьми таргентных SNP гена *MMP9* были зарегистрированы значимые эффекты для rs3918253 и rs3918256 (Wu et al., 2012). Вклад в развитие ПТО также был показан для гена

*LAMC1*, кодирующего ламинин – адгезивный гликопротеин, являющийся важным компонентом базальных мембран (Chen et al., 2010). Ламинин вовлечен в широкий спектр биологических процессов, включая клеточную адгезию, дифференцировку, миграцию, сигнализацию и метастазирование. Rs10911193-Т гена *LAMC1* коррелирует с развитием семейного ПТО среди молодых женщин (Nikolova et al., 2007), а полиморфные варианты rs1413390, rs20563 и rs20558 показали пограничную значимость при изучении несемейного пролапса (Wu et al., 2012).

В крестцово-маточных связках женщин с опущением тазовых органов отмечается низкое содержание эстрогеновых и прогестероновых рецепторов (Bai et al., 2005). Пониженный уровень экспрессии *ESR1* (estrogen receptor 1) также выявлен в пубоцервикальной фасции и вокруг уретры у женщин постменопаузального возраста, страдающих ПТО (Grigoriadis et al., 2015). Пониженный уровень  $ER\alpha$  и  $ER\beta$  в крестцово-маточных связках был зарегистрирован у женщин с пролапсом на фоне повышенной экспрессии ингибирующих ангиогенез *microRNA-221/222* и *microRNA-92*, соответственно (Shi et al., 2012; He et al., 2016). При исследовании генов *ESR1* (estrogen receptor 1), *ESR2* (estrogen receptor 2) и *PGR* (progesterone receptor) в ассоциации с пролапсом выявлены полиморфные варианты rs2228480 (*ESR1*), rs484389 (*PGR*) и рисковый гаплотип гена *ESR2* (Chen et al., 2008; Chen et al., 2008; Chen et al., 2009).

Homeobox (HOX) гены являются регуляторами транскрипции, контролирующими эмбриональное развитие уrogenитального тракта. У нокаутных по гену *HOXA11* мышей отсутствуют крестцово-маточные связки. Показано, что в крестцово-маточных связках женщин, страдающих ПТО, была значительно снижена экспрессия коллагенов I и III типов и *HOXA11*, а экспрессия *MMP2* повышена по сравнению со здоровыми женщинами (Connell et al., 2008). Однако вариабельность данного гена в отношении ПТО не изучена.

В фибробластах маточно-крестцовых связок женщин постменопаузального возраста, с ПТО и без, была измерена экспрессия мРНК и белков митофузина-2 (*Mfn2*) и проколлагенов I и III типов (1A1/1A2/3A1). *Mfn2* участвует в слиянии митохондрий и их слиянии с эндоплазматическим ретикуломом, регулирует

деление клеток, а также окислительный метаболизм; предполагают, что его функционирование путем воздействия на митохондриальный синтез связано с клеточным старением, пролиферацией и апоптозом клеток. В основной группе уровень экспрессии Mfn2 был достоверно выше, а проколлагенов I и III типов ниже, чем в контрольной группе, причем данная закономерность находилась в корреляции с длительностью постменопаузы. Полученные результаты автор объясняет апоптозом фибробластов, который связывает с высокой экспрессией митафузина-2 (Chen et al., 2014).

При изучении роли окситоцина, релаксина-2 и их рецепторов в развитии ПТО, было выявлено повышенное содержание релаксина-2 в крестцово-маточных связках женщин пременопаузального возраста с ПТО по сравнению с женщинами без пролапса (Schott et al., 2014). Релаксин-2 представляет собой полипептидный гормон, относящийся к пептидам семейства инсулина. Релаксин вызывает расслабление связок малого таза и обладает противовоспалительным и антифиброзным эффектом, снижает накопление коллагена и других белков внеклеточного матрикса (Hao et al., 2016).

Ослабление поддерживающего тазовые органы аппарата сопровождается усилением апоптоза в крестцово-маточных связках, в том числе за счет окислительного стресса (Kim et al., 2013). В связи с этим в качестве генов-кандидатов развития ПТО были рассмотрены гены фазы II системы детоксикации (*NAT2*, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*). Kim JY с коллегами выявили протективные эффекты аллеля rs1695-G (Ile105Val) гена *GSTP1* (glutathione S-transferase pi 1) (Kim et al., 2014) и rs1136410-C (Val762Ala) гена *PARP1* (poly(ADP-ribose) polymerase 1), участвующий в репарации ДНК (Kim et al., 2014).

В двух полногеномных исследованиях (Genome-Wide Association Studies, GWAS и Genome Wide Linkage Study) в ассоциации с повышенным риском развития пролапса тазового дна в семьях европейцев, включающих 2-3-х родственников первого порядка (матери, дочери, сестры), было выявлено шесть отдельных генетических вариантов участков хромосом 4q21 (rs1455311), 8q24 (rs1036819), 9q22 (rs430794), 15q11 (rs8027714), 20p13 (rs1810636), 21q22

(rs2236479) и участок хромосомы 9q21 (Allen-Brady et al., 2009; Allen-Brady et al., 2011). В 2015 году опубликована работа, представляющая результаты полногеномного исследования ПТО среди женщин афроамериканского и испанского происхождения. Ассоциированным с пролапсом в группе афроамериканок с уровнем значимости  $p > 10^{-6}$  оказались ген *CPE* (carboxypeptidase E, rs28573326), среди испанок - *AL132709.5* (rs1950626), а в общей выборке значимые эффекты были зарегистрированы для *DPP6* (dipeptidyl peptidase like 6, rs11243354) и для окологенных вариантов генов *PGBD5* (piggyBac transposable element derived 5, rs740494), *SHC3* (SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3, rs2209875) (Giri et al., 2015).

Китайские исследователи выполнили экзомное секвенирование 8 образцов, полученных от женщин с III-IV степенью пролапса, по результатам которого были зарегистрированы две миссенс-мутации в гене *WNK1*: с.2668G>A (p.G890R) и с.6761C>T (p.P2254L). Валидация методом Сэнгера полученных данных в гене *WNK1* выявила еще восемь дополнительных вариантов, ассоциированных с ПТО (Rao et al., 2015). Ген *WNK1* (WNK lysine deficient protein kinase 1) кодирует белок, который является ключевым регулятором артериального давления, контролируя транспорт ионов натрия и хлорид-ионов. Мутации в этом гене связаны с псевдогипоальдостеронизмом II типа и наследственной сенсорной невропатией II типа. Примечательно, что WNK киназы активируют канонический Wnt/ $\beta$ -катенин сигнальный путь, роль которого в патогенезе ПТО была доказана ранее Wang с коллегами (Wang et al., 2012). Было отмечено ингибирование Wnt16 сигнального пути в фибробластах, полученных из маточно-крестцовых связок пациенток с опущением тазовых органов, в связи с чем отмечалась низкая скорость роста и сниженная пролиферативная активность фибробластов, а также редуцированная секреция коллагена на фоне повышенной активности MMP2.

### **1.6 Гены, контролирующие процессы эластогенеза (*FBLN5*, *LOXLI*, *FBLN3*)**

Одним из ключевых компонентов связочного аппарата тазовых органов является эластическое волокно, обуславливающее растяжимость и эластичность

соединительной ткани (Камоева и др., 2013). Синтез эластина начинается в фибробластах с образования предшественника - белка тропоэластина, растворимого мономера, гидрофильные участки которого обогащены остатками лизина. В межклеточном матриксе при участии медьзависимой лизилоксидазы и/или лизилоксидазоподобных белков (LOX/LOXL1-4) остатки лизина окисляются до аллизина, которые формируют поперечные сшивки, стабилизирующие молекулу эластина. Фибулин-5 (FBLN5) при этом способствует связыванию тропоэластина с LOXL1. Эластические волокна образуются из неупорядоченных сплетений фибрилл эластина вокруг микрофибриллярной сердцевины, состоящей из кислого гликопротеина (фибриллина) (рисунок 1.6.1). Такая структура обеспечивает уникальную эластичность волокон (Вавилова, 2008).

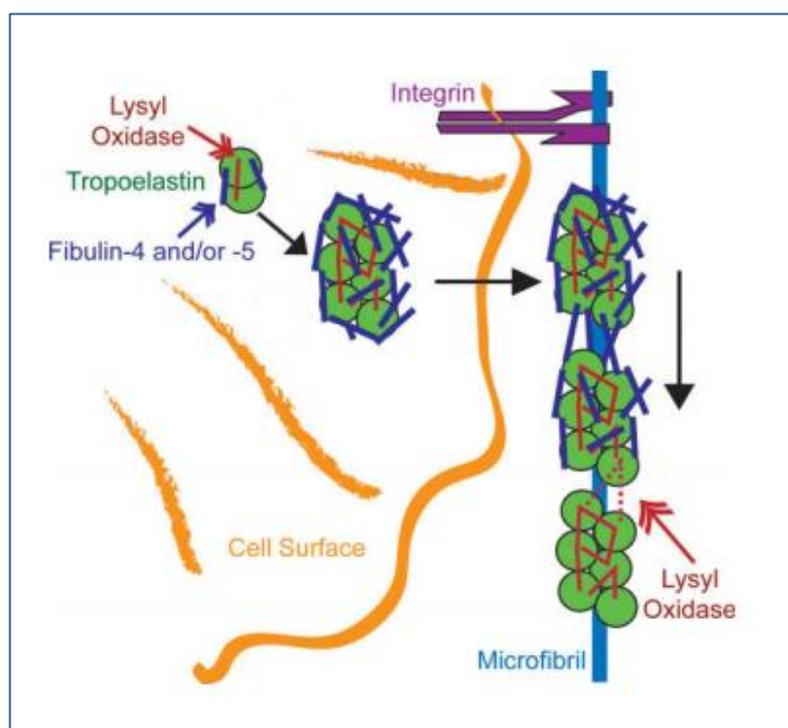


Рисунок 1.6.1 Схематическое изображение сборки эластических волокон (Wagenseil, Mecham, 2007)

Синтез и сборка эластических волокон имеет решающее значение для восстановления поддержки тазовых органов после вагинальных родов, а нарушение эластогенеза играет основную роль в развитии пролапса (Drewes et al., 2007; Liu et al., 2006). У женщин, страдающих ПТО, отмечается снижение

содержания эластина в стенках влагалища и в связках, а также уменьшение ширины эластических волокон, что приводит к ослаблению поддерживающего тазовые органы аппарата (Yamamoto et al., 1997; Karam et al., 2007).

Фибулин-5 является гликопротеином, принадлежащим семейству фибулинов, которое состоит из 7 членов (Yanagisawa et al., 2002). FBLN-5 экспрессируется в богатых эластином тканях, таких как аорта, почки, легкие, матка, взрослое сердце, яичники и толстый кишечник в основном клетками эндотелия, гладкомышечными клетками и фибробластами, и действует как медиатор межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий (Tang et al., 2014). Данный белок участвует в регуляции развития, морфогенеза и ремоделирования сосудов и тканей (Капустин, 2005). В процессе эмбриогенеза данный белок вовлечен в эластогенез, в то время, как во взрослом организме его экспрессия снижена, за исключением матки, в которой происходит циклический ангиогенез. Экспрессия фибулина-5 также повышается при повреждении тканей и развитии различных заболеваний: развитии атеросклеротических повреждений, ретинозе сосудов, в период активной миграции и пролиферации гладкомышечных и эндотелиальных клеток, повреждении легких в гипероксических условиях или после обработки их эластазой и в процессе ранозаживления кожи (Yanagisawa et al., 2002; Капустин, 2005).

FBLN-5 состоит из 448 аминокислотных остатков и имеет два структурных модуля (EGF-подобные домены и уникальные C-концевые модули фибулинового типа (рисунок 1.6.2) (Wang, Brekken, 2013; Tang et al., 2014). Благодаря этим доменам фибулин-5 взаимодействует с белками экстрацеллюлярного матрикса и секретируемыми белками. По сравнению с другими членами семейства FBLN5 имеет уникальный RGD-домен (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота последовательность) в N-терминальном регионе, который связывается с интегринами и опосредует адгезию (Nakamura et al., 1999; Wang, Brekken, 2013). Подобная доменная структура фибулина-5 предполагает, что он может связывать несколько рецепторов или лигандов, интегрины и внеклеточный матрикс, или интегрины и другие клеточные рецепторы (Капустин, 2005). N-концевая область

FBLN-5 необходима для взаимодействия с LOXL1 и селекции подходящих микрофибрилл для образования эластических волокон в результате взаимодействия с латентным TGF- $\beta$ -связывающим белком 2 (LTBP2) (Tang et al., 2014).

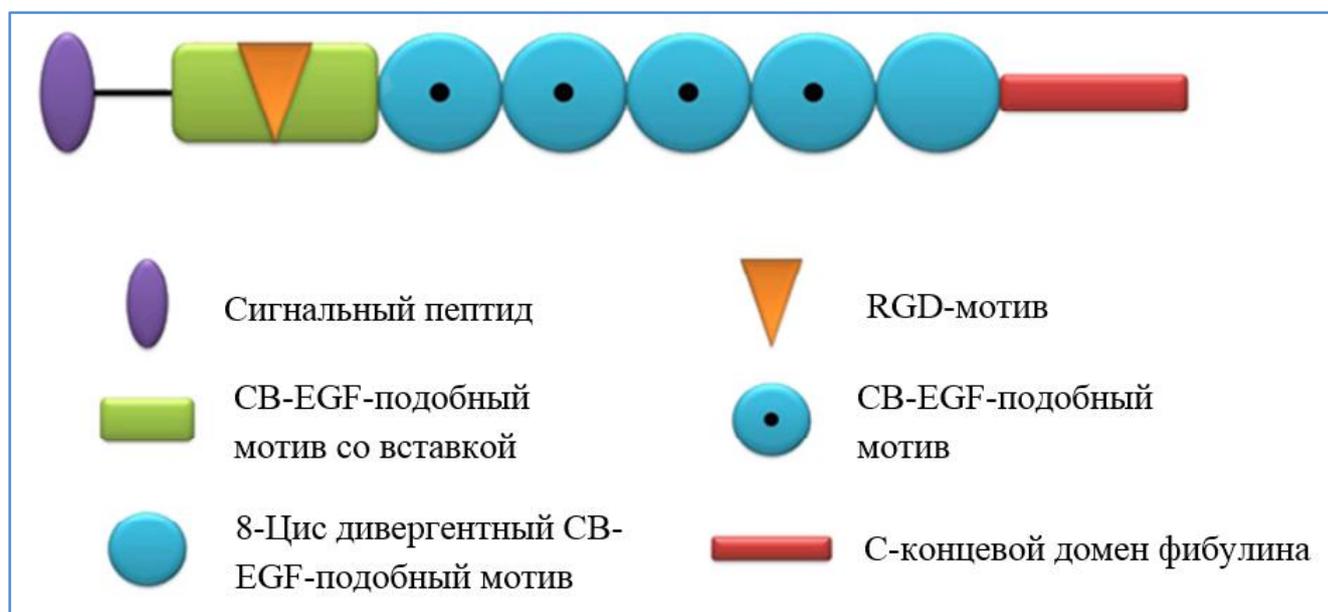


Рисунок 1.6.2. Доменная структура фибулина-5. Фибулин-5 содержит консервативную RGD-последовательность в первом CB-EGF-like (Calcium Binding-Epidermal Growth Factor-like) мотиве и С-концевой домен фибулинового типа (Wang, Brekken, 2013).

Лизилоксидазоподобный белок 1 является членом семейства лизилоксидаз - медь-зависимых аминоксидаз, участвующих в формировании поперечных сшивок в белках экстрацеллюлярного матрикса – коллагене и эластине (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Все представители семейства лизилоксидаз характеризуются высокой консервативностью аминокислотной последовательности каталитического домена и проявляют схожую субстратную специфичность (Оккельман, 2013). Структура белка представлена на рисунке 1.6.3. Семейство лизилоксидаз (LOX и LOX1-4) окисляет лизин и гидроксизин, которые участвуют в образовании коллагена и эластина в костях, легких, сердечно-сосудистой системы и др. Данный фермент необходим для ковалентной «сшивки», а также поддержания эластичности и структурной целостности

внеклеточного матрикса. Нарушение поперечных сшивок коллагена и эластина приводит к нарушению формирования соединительной ткани и развитию заболеваний опорно-двигательного аппарата. Вовлеченность этого семейства отмечается в развитии рака, эксфолиативного синдрома, регенеративных процессах, подвижности клеток, хемотаксисе, развитии фиброза (Парахонский, 2015).

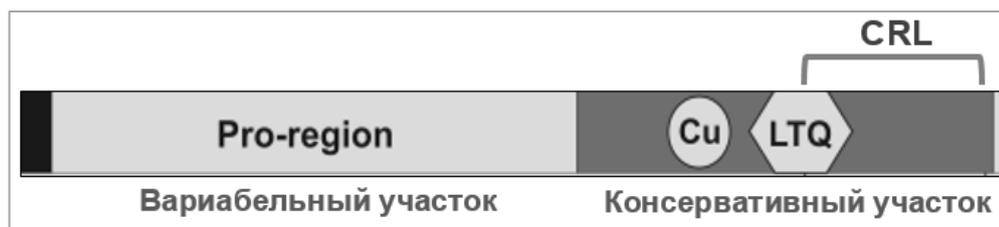


Рисунок 1.6.3. Доменная структура лизилоксидазоподобного белка 1 (LOXL1) (Mäki, 2009). Сигнальные пептиды представлены черным участком; Pro-region – пролин-богатый участок; Cu – медь-связывающий сайт; LTQ (lysine tyrosylquinone cofactor) – сайт связывания лизилтирозил хинонового кофактора; CRL (cytokine receptor-like) domain - домен цитокин-подобного рецептора.

FBLN5 и LOXL1 играют важную роль в синтезе и сборке эластических волокон, а нарушения в генах, кодирующих данные белки, обуславливают развитие заболеваний, связанных с дефектом соединительной ткани. У *Fbln5*<sup>-/-</sup> мышей отмечается синдром вялой кожи, острая эмфизема легких, расширение и ветвление артерий. Выявлено, что данные нарушения вызваны фрагментацией эластина, обусловленной дефектным развитием, а не повышенной эластазной активностью (Nakamura et al., 2002). При наличии мутаций в данном гене у человека кроме аналогичных заболеваний также развивается наследственная невральная амиотрофия (амиотрофия Шарко-Мари-Тута) и возрастная дегенерация макулы (Jones et al., 2010; Auer-Grumbach et al., 2011).

За последнее десятилетие накопилось достаточное количество работ, доказывающих важную роль фибулина-5 в развитии ПТО (Drewes et al., 2007; Klutke et al., 2008; Budatha et al., 2011; Northington, 2011; Zhao, Zhou, 2012; Zhou et al., 2013). При выполнении эксперимента на животных, заключающегося в

растяжении влагалища (имитация родов) у *Fbln5*<sup>-/-</sup> мышей, отмечено быстрое прогрессирование ПТО, которое впоследствии никогда уже не устранялось (Drewes et al., 2007; Камоева и др., 2013). Wieslander с коллегами показали, что у более, чем 90% нокаутных по данному гену мышей пролапс развивался на шестом месяце жизни даже при отсутствии вагинальных родов, причем иные проявления эластинопатии наблюдались еще на ранних этапах развития, при этом формирование ПТО сопровождалось повышенной активностью MMP9 в стенках влагалища (Wieslander et al., 2009).

*LOXLI* известен как важный генетический фактор развития эксфолиативного синдрома и глаукомы (Ji et al., 2015). У *Loxli*<sup>-/-</sup> мышей наряду с опущением тазовых органов в послеродовом периоде, также отмечается повышенная дряблость и избыточность кожи, эмфизема легких и сосудистые патологии. Данные нарушения сопровождаются накоплением тропоэластина, что свидетельствует о нарушении процесса эластогенеза (Liu et al., 2004). Показано, что у нокаутных по *Loxli* мышей тяжелые формы пролапса развиваются уже после первого помета (Ferrell et al., 2009). Экспрессия фибулина-5 и лизилоксидазоподобного белка 1 в кардинальных связках женщин с ПТО снижена по сравнению со здоровыми женщинами, причем, чем тяжелее форма ПТО, тем ниже уровень данных белков (Zhou et al., 2013). Ozbek E. с коллегами (2013) зарегистрировали ассоциацию генотипов rs2165241-T/T и rs1048661-T/T гена *LOXLI* со стрессовым недержанием мочи. В 2009 году был исследован однонуклеотидный полиморфизм (NT\_010194(LOXL1): g.45008784A>C) из промоторной области гена *LOXLI* в ассоциации с развитием опущения тазовых органов и преждевременного разрыва плодных оболочек, однако достоверно значимых результатов получено не было (Ferrell et al., 2009).

Функция FBLN3 (фибулина-3), гликопротеина внеклеточного матрикса, также известного как EFEMP1 (epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1) остается до сих пор до конца не ясной. Как и все члены этого семейства, кодируемый белок содержит N-концевой сигнальный пептид, тандемные повторы EGF-подобных доменов, за которыми следует C-

концевой домен фибулинового типа (рисунок 1.6.4) (<http://oftalmic.ru>). EFEMP1 широко экспрессируется во всем теле во время развития и во взрослых тканях, особенно в эпителиальных и эндотелиальных клетках (Zhou, 2013).

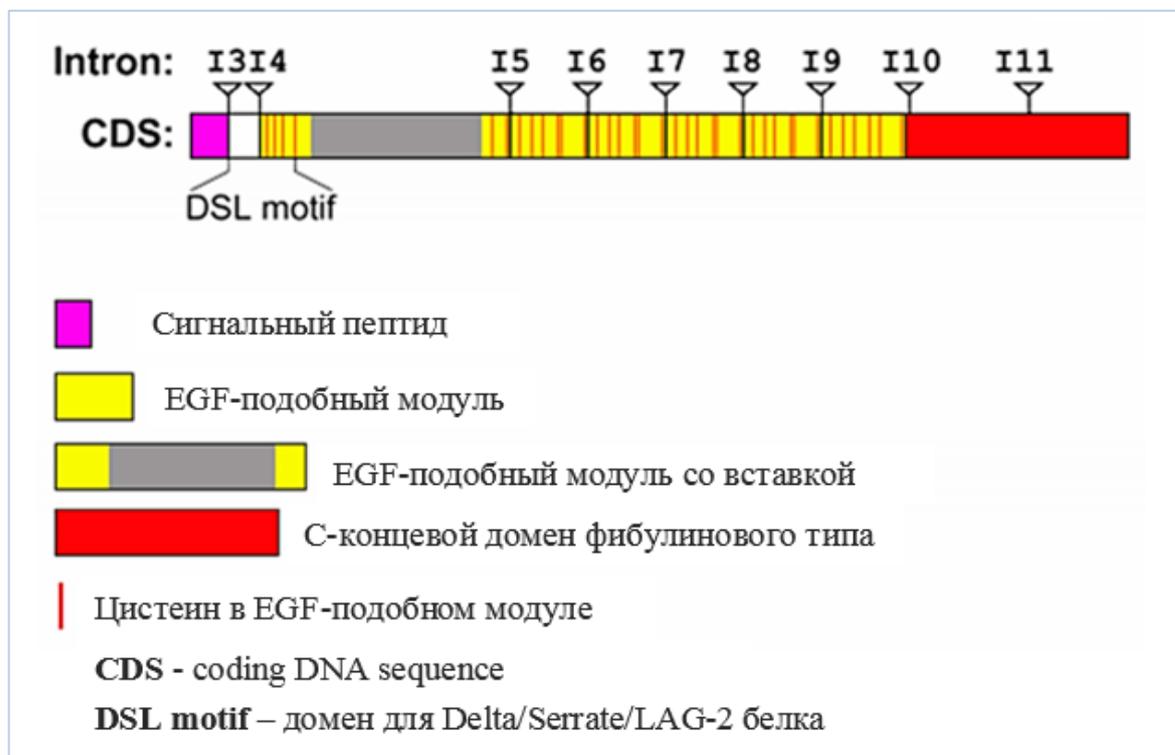


Рисунок 1.6.4. Доменная структура белка EFEMP1 и модульная структура соответствующего гена (Zhou, 2013).

Предположительно, EFEMP1 способствует целостности базальной мембраны и эластических волокон, а также является ингибитором ангиогенеза (Albig et al., 2006). За счет стимулирования экспрессии тканевых ингибиторов металлопротеиназ фибулин-3 участвует в сохранении целостности ткани (Rahn et al., 2009). EFEMP1 взаимодействует с рецепторами эпидермального фактора роста. Его инактивация наблюдается при раке молочной железы, простаты, легкого и при колоректальном раке (Pass et al., 2012; Xu et al., 2014), а миссенс-мутация R345W данного гена вызывает развитие коллоидной дистрофии сетчатки Дойна (Zhang et al., 2014). *Fbln3*-нокаутные мыши подвержены нарушениям в организации эластических волокон, образованию грыж передней брюшной стенки и раннему старению, а у 27% таких особей развивается опущение половых органов (McLaughlin et al., 2007; Rahn et al., 2009). Однако при изучении уровня

экспрессии данного гена в маточно-кrestцовых связках у здоровых женщин и страдающих пролапсом значимых различий обнаружено не было (Takacs et al., 2010).

Все выше изложенное послужило основанием для проведения исследования, в рамках которого будет изучен с учетом клинических факторов вклад в формирование ПТО вариабельности генов, контролирующих процессы эластиогенеза (*FBLN5*, *LOXL1*, *FBLN3*), верифицированы на российской выборке ранее выявленные для европеоидов рисковые аллели, а также выполнен поиск потенциальных генов-кандидатов развития ПТО с помощью биоинформатических методов.

## ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Клинические методы

Общее состояние пациенток и локального статуса заболевания оценивалось на основе комплекса клинических, лабораторных, ультразвуковых и уродинамических методов исследования. Для оценки степени пролапса использовали общепринятую систему количественной оценки ПТО (Pelvic Organ Prolapse Quantification, POP-Q), предложенную Международным обществом по удержанию мочи (International Continence Society, ICS) (Bump et al., 1996). Стадия заболевания определяется по позиции наиболее нисходящей точки относительно гименального кольца. Упрощённая схема классификации POP-Q представлена в таблице 1.2.2. Также был выполнен ряд исследований для выявления генитальной патологии (миомы матки, опухоли яичников, гиперпластических процессов эндометрия и др.), нарушения мочеиспускания (выявления скрытых форм стрессового недержания мочи, гиперактивного мочевого пузыря, смешанных форм мочевого инконтиненции), определения степени дисплазии соединительной ткани, выявления нарушения сердечного ритма и проводимости, органических изменений сердца (пороки сердца) и т.д. При объективном исследовании оценивали индекс массы тела пациенток (ИМТ) по формуле:

$I = m / h^2$ , где:  $m$  — масса тела в килограммах,  $h$  - рост в метрах. В таблице 2.1.2 представлена интерпретация показателей ИМТ в соответствии с рекомендациями ВОЗ (таблица 2.1.2) (<https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Для подробного выяснения жалоб и характерных симптомов заболевания пациенткам с ПТО было предложено заполнить специальные краткие формы вопросников PFIQ-7 (Pelvic Floor Impact Questionnaire) и PFDI-20 (Pelvic Floor Distress Inventory) (приложение 1) (Barber et al. 2007). Данные вопросники были использованы для определения тяжести расстройств мочеиспускания, функции нижнего отдела желудочного тракта (ректальной, анальной дисфункции), а также симптомов, вызванных самим ПТО (Камоева, 2015).

## Интерпретация показателей ИМТ

Индекс массы тела (кг/м <sup>2</sup> )	Соответствие между массой человека и его ростом
16 и менее	Выраженный дефицит массы тела
16—18.5	Недостаточная (дефицит) масса тела
18.5—24.99	Норма
25—30	Избыточная масса тела (предожирение)
30—35	Ожирение первой степени
35—40	Ожирение второй степени
40 и более	Ожирение третьей степени (морбидное)

**2.2 Молекулярно-генетические методы****2.2.1 Подбор полиморфных вариантов**

Подбор полиморфных вариантов для ассоциативного исследования выполнялся несколькими способами. Для генов *FBLN3*, *FBLN5* и *LOXLI* был применен подход, заключающийся в подборе таргетных (tagger) SNPs. Такой подход всё чаще используют для оценки роли наследственных факторов в развитии многофакторных заболеваний. Стратегия применения tagSNPs основана на блочной структуре генома, каждый такой блок включает в себя соседние или близко расположенные аллели, наследуемые совместно чаще, чем это можно ожидать при случайном распределении; данное явление известно как неравновесное сцепление (linkage disequilibrium, LD). Полиморфный вариант с частотой минорного аллеля (MAF) не менее 5% маркирует соответствующий гаплотипический блок при условии, что он находится в пороговой корреляции хотя бы с одним SNP из данного блока ( $D' \geq 0.8$ ). Исследование tagSNPs из каждой группы сцепления обеспечивает покрытие всего гена, а также позволяет значительно снизить финансовые и трудовые затраты (Трифонов и др., 2012). Подбор полиморфных вариантов был выполнен с помощью программы

HaploView (version 4.2), которая определяет гаплотипическую структуру гена для конкретной популяции, в данном случае CEU+TSI (CEU – американцы европейского происхождения (Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection); TSI – жители Тосканы (Tuscans in Italy)), основываясь на данных проекта HapMap (haplotype map) (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Таким образом, нами были исследованы 11 tagSNPs гена *FBLN5*, 3 tagSNPs гена *LOXLI* и 4 SNPs гена *FBLN3* (из которых все, кроме rs1367228 являются таргетными).

SNPexp (<http://tinyurl.com/snpexp>) – еще одно программное обеспечение, с помощью которого производился выбор сайтов для генотипирования. SNPexp методом линейной регрессии оценивает ассоциацию полиморфных вариантов с уровнем экспрессии генов в лимфобластоидных клеточных линиях 269 человек (представителей четырех популяций) из проекта HapMap. В ассоциации с ПТО с помощью ресурса SNPexp нами были отобраны и изучены полиморфные варианты rs2284338 и rs2267989, коррелирующие в группе родителей-европеоидов (n=60) с уровнем экспрессии гена *FBLN5*, и rs2415231 с уровнем экспрессии гена *LOXLI*.

Ранее Allen-Brady К. с коллегами в ходе двух полногеномных исследований (Genome-Wide Association Studies, GWAS и Genome Wide Linkage Study) в ассоциации с повышенным риском развития пролапса тазового дна в семьях европеоидов, включающих 2-3-х родственников первого порядка (матери, дочери, сестры), выявили шесть отдельных генетических вариантов участков хромосом 4q21 (rs1455311), 8q24 (rs1036819), 9q22 (rs430794), 15q11 (rs8027714), 20p13 (rs1810636), 21q22 (rs2236479) и участок хромосомы 9q21 (Allen-Brady et al., 2009; 2011), однако полученные результаты ранее не были верифицированы на независимых выборках. Для подбора полиморфных вариантов участка хромосомы 9q21 мы воспользовались ресурсом RegulomeDB (<http://www.regulomedb.org/>), кумулирующий информацию о регуляторном потенциале преимущественно интронных и межгенных SNPs из ENCODE (The Encyclopedia of DNA Elements), GEO (Gene Expression Omnibus) и других баз данных. Такой подход подбора

полиморфных вариантов в рамках ассоциативного исследования применен впервые, тогда как обычно RegulomeDB используют для *post-hoc* анализа результатов полногеномных исследований (Boyle et al., 2012). Полиморфным вариантам в RegulomeDB присваиваются коэффициенты от 1 до 6 на основе данных по экспрессии локусов количественных признаков (expression Quantitative trait loci — eQTL), сайтам связывания транскрипционных факторов (TF binding), белковых мотивов, а также результатов определения положения регуляторных регионов. Чем выше предполагаемый регуляторный потенциал исследуемого варианта, тем меньше присваиваемый коэффициент. Категория 1 делится на подкатегории 1a-1f, 1a оценивается как самый высокий показатель функциональной активности исследуемого варианта (таблица 2.2.1.1).

Таблица 2.2.1.1

Категории предполагаемой функциональной активности полиморфных вариантов по RegulomeDB

Категория	Категории
1a	eQTL + TF binding + matched TF motif + matched DNase Footprint + DNase peak
1b	eQTL + TF binding + any motif + DNase Footprint + DNase peak
1c	eQTL + TF binding + matched TF motif + DNase peak
1d	eQTL + TF binding + any motif + DNase peak
1e	eQTL + TF binding + matched TF motif
1f	eQTL + TF binding / DNase peak
2a	TF binding + matched TF motif + matched DNase Footprint + DNase peak
2b	TF binding + any motif + DNase Footprint + DNase peak
2c	TF binding + matched TF motif + DNase peak
3a	TF binding + any motif + DNase peak
3b	TF binding + matched TF motif
4	TF binding + DNase peak
5	TF binding or DNase peak
6	Other

Таким образом, из участка хромосомы 9q21 для верификации полногеномного исследования было выбрано 6 SNPs с различным регуляторным

потенциалом: rs12237222 (1a), rs11139451 (5), rs12551710 (1d), rs4077632 (нет данных), rs2807303 (2a), rs2777781(3a) (приложение 3, таблица 1).

Кроме того, для последующего мета-анализа с учетом наших результатов были исследованы одиночные варианты *COL3A1* (rs1800255), *MMP9* (rs17576), *ESR1* (rs2228480), *PGR* (rs484389), ассоциированные с ПТО по литературным данным. Все полиморфные варианты, изученные в рамках диссертационной работы, представлены в таблице 2.2.1.2.

Таблица 2.2.1.2

## Исследованные полиморфные варианты

Ген или участок хромосомы	SNP	Функция	Аллели	MAF	Способ подбора
<i>FBLN5</i>	rs2430339	nearGene-3	G:A	0.151	HaploView
	rs12586948	intron	G:A	0.32	
	rs2284337	intron	G:A	0.29	
	rs2498841	intron	C:A	0.28	
	rs2018736	intron	C:A	0.456	
	rs12589592	intron	G:A	0.30	
	rs2430369	intron	T:C	0.324	
	rs2245701	intron	G:A	0.234	
	rs2474028	intron	C:T	0.388	
	rs929608	intron	C:T	0.49	
	rs2430347	exon	G:A	0.293	
<i>LOXL1</i>	rs2165241	intron	C:T	0.438	HaploView
	rs2304719	intron	C:T	0.301	
	rs893821	intron	T:C	0.226	
<i>FBLN3</i>	rs3791679	intron	T:C	0.250	HaploView
	rs1367228	intron	A:C	0.544	
	rs3791660	intron	C:A	0.420	
	rs2033316	intron	A:G	0.223	

<i>FBLN5</i>	rs2284338	intron	G:A	0.248	SNPexp
<i>FBLN5</i>	rs2267989	missense	G:A	0.475	
<i>LOXL1</i>	rs2415231	-	C:T	0.474	
4q21	rs1455311	intron	C:T	0.217	Литературные данные (GWAS)
8q24 ( <i>ZFAT</i> )	rs1036819	nearGene-3	A:C	0.128	
9q22	rs430794	-	A:C	0.272	
15q11	rs8027714	-	A:G	0.040	
20p13	rs1810636	-	G:T	0.332	
21q22( <i>COL18A1</i> )	rs2236479	intron	A:G	0.339	
9q21	rs12237222	intron	G:T	0.425	RegulomeDB
9q21	rs11139451	-	C:T	0.221	
9q21( <i>FRMD3</i> )	rs12551710	intron	C:T	0.042	
9q21	rs4077632	-	A:G	0.310	
9q21 ( <i>TLE4</i> )	rs2807303	nearGene-5	C:T	0.336	
9q21 ( <i>TLE1</i> )	rs2777781	intron	A:T	0.309	
<i>COL3A1</i>	rs1800255	missense	G:A	0.250	Литературные данные
<i>MMP9</i>	rs17576	missense	A:G	0.375	
<i>PGR</i>	rs484389	UTR-3	T:C	0.265	
<i>ESR1</i>	rs2228480	cds-synon	G:A	0.133	

MAF – частота минорного аллеля для популяций CEU/TSI по базе данных HarMap

### 2.2.2 Пробоподготовка

Образцы венозной крови пациенток собирали в вакутейнеры, содержащие ЭДТА, и хранили при -20-80 °С до выделения ДНК. Для последующего генотипирования ДНК выделяли с помощью набора реактивов Diatom DNA Prep 200 (Isogene Lab.Ltd, Россия). Метод основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента – гуанидина изотиоционата (GuSCN) высокой молярности с последующей сорбцией ДНК на поверхности стеклянных шариков. После нескольких отмывок ДНК, сорбированная на носителе снимается с помощью элюирующего буфера. Выделенная ДНК хранится при -20-80 °С.

### 2.2.3 Постановка и детекция результатов ПЦР

Генотипирование выполнялось методом тетра-праймерной аллель-специфической ПЦР с помощью лиофилизированных наборов Master Mix (Isogene Lab.Ltd, Россия). Метод тетра-праймерной ПЦР отличается от известных аналогов аллель-специфической реакции тем, что позволяет в одной пробирке амплифицировать фрагменты ДНК различной длины, соответствующие альтернативным аллелям. Кроме экономичности, данная реакция обладает высокой специфичностью за счет конкурентного связывания праймеров с субстратом, а также за счет нахождения вариантного аллеля не в середине праймера, как принято при проведении традиционной аллель-специфической амплификации, а на 3'-конце, что принципиально увеличивает специфичность реакции (Hamajima, 2001). Подбор праймеров выполнялся в программе Primer3web version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) с последующей оптимизацией условий ПЦР. Праймеры и условия амплификации представлены в приложении 2. Амплификацию проводили в амплификаторах Veriti® Thermal Cycler и GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Визуализация результатов осуществлялась методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Качество генотипирования проверялось повторным слепым генотипированием 10% образцов методом ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green (прибор Real-Time CFX96 Touch, Bio-Rad).

### 2.3. Статистическая обработка результатов

Для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню признаков, измеренных количественно, был использован U-критерий Манна-Уитни (пакет программ «WinSTAT 2003.1», интегрированный в Excel). Для бинарных показателей значимость межгрупповых различий частот оценивали с помощью точного двустороннего критерия Фишера (пакет программ WinPePi) (<http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>), статистически достоверными считались результаты при вероятности ошибки  $p < 0.05$ . Соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга оценивали методом  $\chi^2$

( $p > 0.05$ ). Оценки частот генотипов и гаплотипов и их эффектов были получены методом логистического регрессионного анализа с помощью компьютерной программы SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>), выбор лучших генетических моделей (доминантная, рецессивная, аддитивная) производился в соответствии с наименьшим значением информационного критерия Акаике (AIC). Для генотипов с частотой минорного аллеля менее 5% рассматривались только доминантная и аддитивная модели. Результат считался статистически значимым при  $p < 0.05$ . Вклады различных генотипов в заболеваемость определяли с помощью показателя «odd ratio» (OR – мера коррелятивной связи). При отсутствии корреляций между генотипом и заболеванием  $OR = 1$ ; при  $OR > 1$  говорят о повышенном риске заболевания при данном генотипе; эффект рассматривался как клинически значимый при  $OR \geq 2$  (Shapiro, 2004).

Мощность теста вычислялась в программе WinPePi (<http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>). Для полиморфных вариантов с наиболее значимыми результатами с OR в диапазоне 0.41-2.36 *post hoc* мощность теста варьировала в пределах 61-89%. Отсутствие значимых эффектов по другим полиморфным вариантам мы обуславливаем либо отсутствием ассоциаций, либо недостаточным размером исследуемой выборки. Поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хокберга (FDR, False Discovery Rate) также выполнялась в программе WinPePi (Benjamini, Hochberg, 1995).

Анализ межгенных взаимодействий был выполнен с помощью теста отношения правдоподобия (log-likelihood ratio tests, LRTs) пакетом SNPAssoc для R. С целью сравнения результатов, полученных для нашей выборки, с другими популяциями был проведен сравнительный анализ структуры неравновесия по сцеплению генов *FBLN5*, *FBLN3*, *LOXL1* при помощи программы Haploview (version 4.2), а также дискриминантный анализ главных компонент для участка хромосомы 9q21 с помощью программного обеспечения R для оценки генетического разнообразия выборки. Мета-анализ проводился в программе Review Manager 5 (RevMan 5).

Дополнительный поиск полиморфных вариантов и генов, ассоциированных с ПТО, производился по каталогу PheWAS (Phenome-Wide Association Study) (<https://phewas.mc.vanderbilt.edu>). Функциональный анализ генов выполнялся с помощью программ GSA-SNP (Gene Set Analysis SNP), KOBAS 2.0 и VLAD (Visual annotation display) (Nam et al., 2010; Xie et al., 2011; Richardson, Bult, 2015). Визуализация результатов осуществлялась в программной среде R (<http://www.R-project.org/>).

### ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОК

В исследовании, направленном на поиск генетических факторов, ассоциированных с риском развития ПТО, приняли участие 502 женщины, проходившие лечение на клинических базах кафедры акушерства и гинекологии №1 лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова. Все пациентки подписали форму информированного согласия на участие в данном исследовании. Исследование одобрено Этическим Комитетом РНИМУ им. Н.И.Пирогова (протокол №117 от 16 апреля 2012г.). Из исследования были исключены пациентки с дифференцированной дисплазией соединительной ткани (синдром Марфана, синдром Элерса-Данлоса, несовершенный остеогенез, синдром вялой кожи), а также с приобретенными нарушениями соединительной ткани (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, склеродермия, полимиозит, дерматомиозит и т.д.). Основную группу составили 210 женщин с различными формами ПТО (пролапсом матки и влагалища, цистоцеле, ректоцеле и выпадением свода влагалища после экстирпации матки); контрольная группа состояла из 292 женщин без данной патологии. Степень выраженности пролапса тазовых органов в исследуемой группе представлена в таблице 3.1.

Таблица 3.1

#### Степень выраженности пролапса тазовых органов в основной группе

Формы проявления ПТО	Основная группа (n=210)	
	Абс.	Отн. (%)
ПТО II степени (POPQ)	142	67.6
ПТО III степени (POPQ)	55	26.1
ПТО IV степени (POPQ)	10	4.8
Постгистерэктомическое энтероцеле	6	2.9
Несостоятельность мышц тазового дна	99	47.1
ПТО с преобладанием цистоцеле	115	54.8
ПТО с преобладанием ректоцеле	72	34.3
Элонгация шейки матки и культи шейки матки	74	35.2

Преимуществом данной выборки, несмотря на небольшой объем, является применение подхода «экстремальных» фенотипов, который заключался в отборе в основную группу пациенток только с четко выраженным проявлением ПТО (II-IV стадии пролапса по системе POP-Q), в то время как контрольную группу представляли женщины без клинического проявления заболевания. Возраст участниц исследования варьировал от 25 до 86 лет; средний возраст женщин составил  $57.65 \pm 10.80$  в основной и  $57.25 \pm 12.70$  лет в контрольной группе. Большая часть участниц, как с ПТО, так и здоровых, находилась в диапазоне 46-65 лет. Распределение женщин по возрасту представлено на рисунке 3.1.

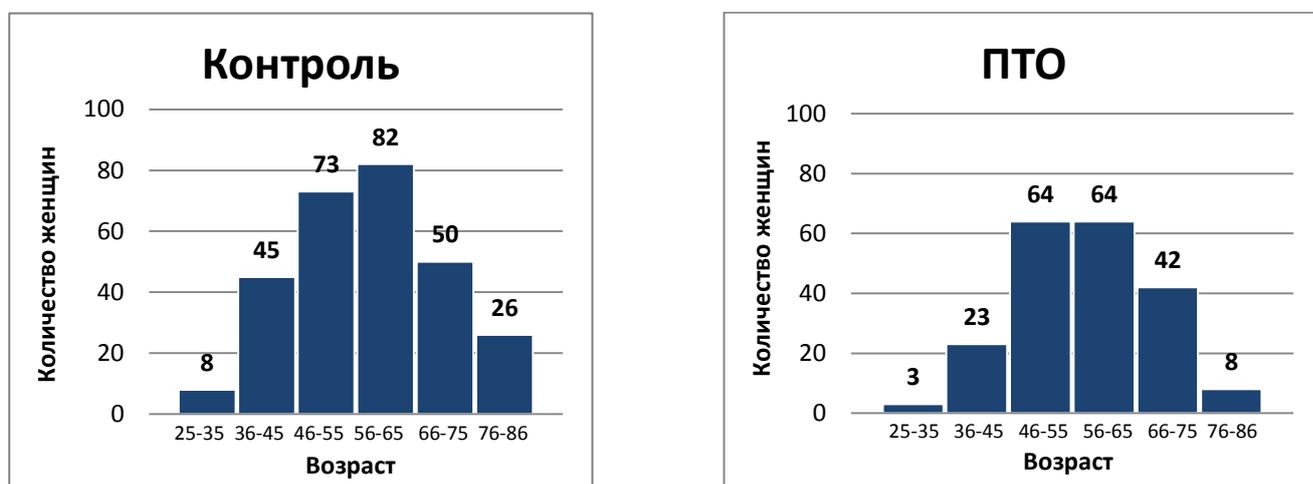


Рисунок 3.1 Распределение женщин по возрасту в контрольной и основной группах.

Пролапс тазовых органов сопровождается рядом функциональных расстройств, такими как нарушение мочеиспускания и дефекации, половая дисфункция, постоянное чувство дискомфорта и тяжести в области промежности, кровянистые выделения из половых путей. Сравнительные показатели предъявляемых жалоб в основной и контрольной группах отражены в таблице 3.2. Пациентки из основной группы жаловались на ощущение инородного тела в области промежности (44.1%) и затрудненное мочеиспускание (12.3%), в то время, как ни одна здоровая женщина аналогичными расстройствами не страдала. Стрессовое недержание мочи встречалось у 5 (1.8%) женщин из контрольной

группы и 56 (27.6%) женщин с ПТО ( $p < 0.001$ ). Различия по жалобам на кровянистые выделения из половых путей и тянущие боли внизу живота в исследуемых группах не достоверны.

Таблица 3.2

Сравнительные показатели предъявляемых жалоб в основной и контрольной группах

Жалобы	Контрольная группа (n=292)		Основная группа (n=210)		p
	Да	Нет	Да	Нет	
Кровянистые выделения из половых путей	28 (9.9%)	255 (90.1%)	24 (11.8%)	180 (88.2%)	0.553
Тянущие боли внизу живота	26 (9.2%)	257 (90.8%)	15 (7.4%)	189 (92.6%)	0.512
Ощущение инородного тела в области промежности	0 (0%)	283 (100%)	90 (44.1%)	114 (55.9%)	$4.3 \times 10^{-9}$
Затрудненное мочеиспускание	0 (0%)	283 (283%)	25 (12.3%)	179 (87.7%)	$1.4 \times 10^{-10}$
Стрессовое недержание мочи	5 (1.8%)	278 (98.2%)	56 (27.6%)	147 (72.4%)	$7 \times 10^{-9}$

\* Различия достоверны при  $p < 0.05$

В настоящее время известно, что тяжелый физический труд, избыточный вес, неоднократные роды и другие факторы могут спровоцировать развитие пролапса тазовых органов. В связи с этим мы сравнили женщин из контрольной и основной групп по наличию признанных для ПТО рисков факторов (таблица 3.3). Женщины с опущением тазовых органов значительно чаще страдали избыточным весом и ожирением, чем здоровые женщины ( $p < 0.001$ ), что свидетельствует о важности нарушения жирового обмена в патогенезе ПТО. Несмотря на то, что традиционно развитие пролапса связывают с тяжелым физическим трудом и поднятием тяжестей (Woodman et al., 2006), нами данная закономерность выявлена не была ( $p = 1.0$ ), тяжелым физическим трудом

занимались 20 (9.9%) женщин с ПТО и 28 (10%) представительниц контрольной группы. Также мы оценили сопряженность перенесенных ранее гинекологических операций (предшествующая коррекция ПТО, тубэктомия, гистерэктомия, резекция яичника и др.) с формированием пролапса. Различий по данному показателю в контрольной и основной группах не выявлено; число женщин с гинекологическими операциями в анамнезе составило 131 (46.1%) и 103 (50.2%), соответственно ( $p=0.409$ ).

Одним из ключевых факторов, увеличивающих риск развития опущения тазовых органов, являются роды через естественные родовые пути, причем значение имеет не только количество вагинальных родов, но и характер родоразрешения. Статистически достоверные различия были выявлены по количеству родов; в группе с ПТО неоднократные роды ( $\geq 2$  родов) перенесла 121 пациентка (59.6%), в то время как в контрольной группе лишь 106 женщин (38.5%). По некоторым литературным данным молодой возраст при первых родах является провоцирующим ПТО фактором, однако в нашей выборке данная гипотеза не подтвердилась (Sajan, Fikree, 2002; Walker, Gunasekera, 2011). Первые роды до 19 лет были отмечены у 14.2% (31) здоровых женщин и 10.4% (21) пациенток из основной группы. Различия в двух группах были выявлены по количеству родов крупным плодом, макросомия плода достоверно чаще встречалась среди женщин с ПТО и составила 31.4% против 14.9% в контрольной группе ( $p<0.001$ ). Частота родовых травм (разрывы промежности/шейки матки, эпизиотомия/перинеотомия) в основной группе (52.2%) также оставалась достоверно выше в сравнении с контрольной группой (32.7%). Различий по группе акушерских операций (наложение акушерских щипцов, вакуумэкстракция плода и ручное отделение плаценты) в нашем исследовании не обнаружено ( $p=0.854$ ). Согласно литературным данным кесарево сечение снижает риск развития пролапса, предостерегая от растяжения и повреждения мягкие родовые пути (Gyhagen et al., 2015). В контрольной группе кесарево сечение проводилось 22 (9.2%) женщинам, примерно в 6 раз чаще в сравнении с основной группой, в которой данная операция проводилась лишь 3 (1.5%) пациенткам.

## Факторы риска ПТО

Факторы риска	Контрольная группа (n=292)		Основная группа (n=210)		p
	Да	Нет	Да	Нет	
Тяжелый физический труд	28 (10%)	253	20 (9.9%)	183	1.0
Избыточный вес (ИМТ 25-29.9 в сравнении с ИМТ до 25)	84 (42.9%)	112 (57.1%)	74 (62.7%)	44 (37.3%)	$7.3 \times 10^{-4}$
Ожирение (ИМТ $\geq 30.0$ в сравнении с ИМТ до 25)	85 (43.1%)	112 (56.9%)	80 (64.5%)	44 (35.5%)	$2.3 \times 10^{-4}$
Перенесенные гинекологические операции	131 (46.1%)	153 (53.9%)	103 (50.2%)	102 (49.8%)	0.409
Молодой возраст при первых родах ( $\leq 19$ лет)	31 (14.2%)	187 (85.8%)	21 (10.4%)	180 (89.6%)	0.299
Роды через естественные родовые пути	217 (90.8%)	22 (9.2%)	200 (98.5%)	3 (1.5%)	$3.2 \times 10^{-4}$
Кесарево сечение	22 (9.2%)	217 (90.8%)	3 (1.5%)	200 (98.5%)	$3.2 \times 10^{-4}$
$\geq 2$ родов	106 (38.5%)	169 (61.5%)	121 (59.6%)	83 (40.4%)	$8.4 \times 10^{-6}$
Вес ребенка $\geq 4000$ г	30 (14.9%)	171 (85.1%)	50 (31.4%)	109 (68.6%)	$2.1 \times 10^{-4}$
Родовые травмы (разрывы промежности/шейки матки, эпизиотомия/перинеотомия)	93 (32.7%)	191 (67.3%)	107 (52.2%)	98 (47.8%)	$1.8 \times 10^{-5}$
Наложение акушерских щипцов, вакуумэкстракция плода, ручное отделение плаценты	18 (6.3%)	266 (93.8%)	14 (6.8%)	191 (93.2%)	0.854

При сравнении экстрагенитальных патологий, которые могут выступать в качестве сопутствующих факторов развития ПТО, в контрольной и основной группах были выявлены различия по ряду заболеваний (рисунок 3.2). Такие сердечно-сосудистые заболевания, как артериальная гипертония, ишемическая болезнь сердца (ИБС) и варикозная болезнь вен нижних конечностей достоверно чаще встречались у женщин с ПТО ( $p < 0.001$ ). Частота хронических заболеваний дыхательной системы (бронхиальная астма, хронический бронхит) в контрольной и

основной группе была примерно одинаковой и составила 7.7% и 6.8%, соответственно ( $p=0.73$ ).

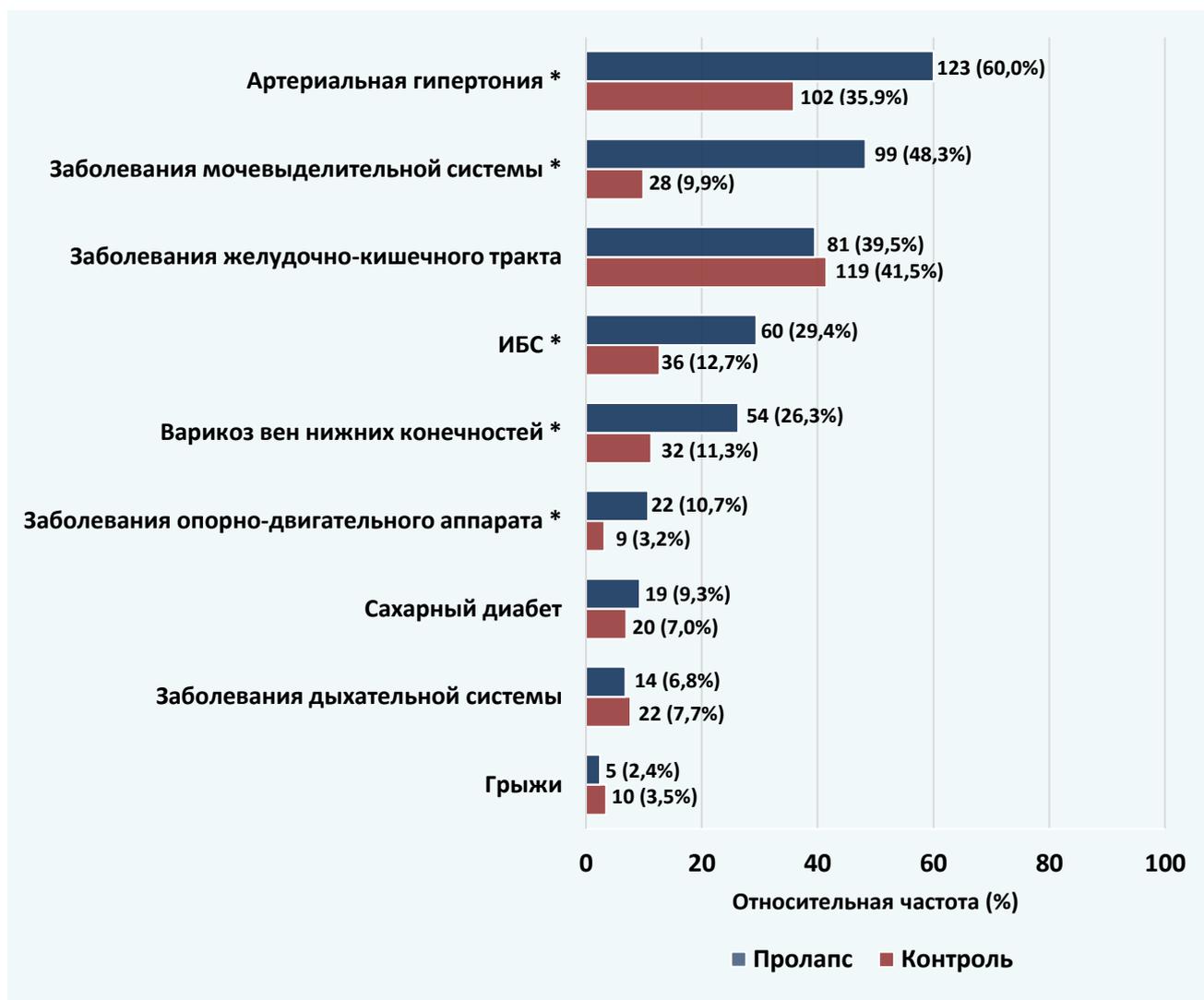


Рисунок 3.2 Сравнительная характеристика экстрагенитальной патологии в основной и контрольной группах. (\*) - Различия достоверны при  $p<0.05$ .

Заболеваниями желудочно-кишечного тракта (хронический гастрит, хронический гастродуоденит, хронический холецистит, желчнокаменная болезнь, хронический панкреатит, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки, язвенная болезнь желудка, хронический геморрой, дивертикулез кишечника) страдали 119 (41.5%) женщин без пролапса и 81 (39.5%) пациентка с ПТО ( $p=0.641$ ). Достоверных различий также не обнаружено по частоте заболеваемости сахарным диабетом ( $p=0.40$ ) и наличию грыж различной локализации ( $p=0.60$ ). В основной

группе в три раза чаще, чем в контроле встречались женщины с заболеваниями опорно-двигательного аппарата (артроз, дорсопатия, ревматизм) ( $p=0.001$ ). Заболеваниями мочевыделительной системы, такими как хронический цистит, гиперактивный мочевой пузырь, мочекаменная болезнь, хронический пиелонефрит, хронический гломерулонефрит, обструктивное или учащенное мочеиспускание и стрессовое недержание мочи, страдала почти половина пациенток из основной группы (48.3%), в то время как в контроле лишь 9.9% женщин ( $p=0.001$ ).

Таким образом, в исследуемой выборке женщины с пролапсом чаще здоровых страдали заболеваниями мочевыделительной системы (в том числе затрудненным мочеиспусканием и стрессовым недержанием мочи), ощущением инородного тела в области промежности, избыточным весом, заболеваниями сердечно-сосудистой системы и опорно-двигательного аппарата, для данных групп также были выявлены различия по количеству родов и характеру родоразрешения.

## ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Полиморфизм генов, контролирующих процессы эластогенеза, и риск развития пролапса тазовых органов

В качестве потенциальных генов-кандидатов, вовлеченных в патогенез ПТО, нами были рассмотрены гены лизилоксидазоподобного белка 1 (*LOXLI*), фибулин-3 (*FBLN3*) и фибулин-5 (*FBLN5*), участвующие в контроле процесса синтеза и организации эластических волокон. Полиморфные варианты подбирались с помощью программ HaploView и SNPexp. Все изученные сайты находились в состоянии равновесия по Харди-Вайнбергу. Частоты аллелей, а также результаты статистического анализа исследованных SNPs в ассоциации с пролапсом тазовых органов представлены в таблице 4.1.1. Анализ проводился как в общей выборке, так и с поправкой на возраст, индекс массы тела, наличие родовых травм и количество родов.

Для гена *FBLN5* были выявлены рисковые аллели rs2284337-A (рецессивная модель,  $P^a=0.043$ , OR=2.36, 95% ДИ: 1.01-5.49), rs2018736-C (доминантная модель,  $P^a=0.032$ , OR=1.58, 95% ДИ: 1.04-2.40), rs2474028-T (доминантная модель,  $P^a=0.037$ , OR=1.54, 95% ДИ: 1.03-2.30), достоверно чаще встречающиеся в основной группе по сравнению с контролем, а также протективный аллель rs12589592-A (рецессивная модель,  $P^a=0.0022$ , OR=0.41, 95% ДИ: 0.23-0.74). Ассоциированными с ПТО также оказались rs2304719-T гена *LOXLI* (доминантная модель,  $P^a=0.0051$ , OR=1.79, 95% ДИ: 1.19-2.70) и rs3791660-C гена *FBLN3* (рецессивная модель,  $P=0.041$ , OR=1.56, 95% ДИ: 1.02-2.40). При анализе без учета клинических факторов риска пограничную значимость в ассоциации с ПТО показали аллели, выбранные с помощью SNPexp, rs2284338-A (аддитивная модель,  $P=0.065$ , OR=1.33, 95% ДИ: 0.98-1.81) и rs2267989-G (доминантная модель,  $P=0.058$ , OR=1.46, 95% ДИ: 0.98-2.17) гена *FBLN5* (таблица 4.1.1).

Распределение аллелей генов *FBLN5*, *FBLN3* и *LOXL1* в группе с пролапсом и в контроле

SNPs, аллели	Контроль		ПТО		P (модель), OR (95% ДИ)	P <sup>a</sup> (модель), OR (95% ДИ)
	Число (%)	HWP	Число (%)	HWP		
<b><i>FBLN5</i></b>						
rs2430339	n=291		n=209			
G	504 (87.0)	0.80	358 (86.0)	1.0	0.73 (дом.)	0.64 (дом.)
A	78 (13.0)		60 (14.0)		1.07 (0.72– 1.61)	1.11 (0.71-1.74)
rs12586948	n=288		n=209			
G	447 (78.0)	0.87	302 (72.0)	0.73	0.19 (рец.)	0.17 (рец.)
A	129 (22.0)		116 (28.0)		1.61 (0.79– 3.31)	1.72 (0.79-3.76)
rs2284337	n=292		n=209			
G	433 (74.0)	0.22	293 (70.0)	0.62	0.18 (рец.)	<b>0.043 (рец.)</b>
A	151 (26.0)		125 (30.0)		1.64 (0.80– 3.35)	<b>2.36 (1.01-5.49)</b>
rs2498841	n=292		n=209			
G	464 (79.0)	0.59	330 (79.0)	0.53	0.90 (дом.)	0.64 (дом.)
T	120 (21.0)		88 (21.0)		1.00 (0.71– 1.48)	0.91 (0.60-1.37)
rs2018736	n=292		n=209			
A	366 (63.0)	0.45	225 (54.0)	0.89	<b>0.0059(адд.)</b>	<b>0.032 (дом.)</b>
C	218 (37.0)		193 (46.0)		<b>1.42 (1.11– 1.83)</b>	<b>1.58 (1.04-2.40)</b>
rs12589592	n=291		n=209			
G	339 (58.0)	0.15	271 (65.0)	0.29	<b>0.0052(рец.)</b>	<b>0.0022 (рец.)</b>
A	243 (42.0)		147 (35.0)		<b>0.48 (0.28– 0.82)</b>	<b>0.41 (0.23-0.74)</b>
rs2430369	n=286		n=204			
T	424 (74.0)	0.88	290 (71.0)	0.39	0.23 (дом.)	0.41 (дом.)
C	148 (26.0)		118 (29.0)		1.25 (0.87– 1.79)	1.18 (0.79-1.77)
rs2245701	n=290		n=208			
G	486 (84.0)	1.0	349 (84.0)	0.31	0.85 (дом.)	0.58 (дом.)
A	94 (16.0)		67 (16.0)		1.04 (0.70– 1.53)	1.13 (0.73-1.74)
rs2474028	n=289		n=209			
C	402 (70.0)	0.4	259 (62.0)	1.0	<b>0.013 (дом.)</b>	<b>0.037 (дом.)</b>
T	176 (30.0)		159 (38.0)		<b>1.58 (1.10– 2.27)</b>	<b>1.54 (1.03-2.30)</b>
rs929608	n=291		n=208			
T	333 (57.0)	0.72	229 (55.0)	0.78	0.5 (адд.)	0.5 (адд.)
C	249 (43.0)		187 (45.0)		1.09 (0.85– 1.40)	1.10 (0.83-1.46)
rs2430347	n=286		n=198			
G	446 (78.0)	0.86	293 (74.0)	1.0	0.15 (адд.)	0.37 (адд.)
A	126 (22.0)		103 (26.0)		1.25 (0.92– 1.69)	1.17 (0.83-1.63)
rs2284338	n=290		n=209			
G	471 (81.0)	0.56	319 (76.0)	0.85	0.065(адд.)	0.34 (адд.)
A	109 (19.0)		99 (24.0)		1.33 (0.98– 1.81)	1.18 (0.84-1.66)

rs2267989	A G	n=288 325 (56.0) 251 (44.0)	0.34	n=208 212 (51.0) 204 (49.0)	0.89	0.058 (дом.) 1.46 (0.98– 2.17)	0.086 (дом.) 1.47 (0.95-2.28)
<b><i>LOXLI</i></b>							
rs2165241	T C	n=290 303 (52.0) 277 (48.0)	0.29	n=209 209 (50.0) 209 (50.0)	0.33	0.50 (адд.) 1.09 (0.85– 1.39)	0.50 (дом.) 1.17 (0.75-1.83)
rs2304719	C T	n=290 453 (78.0) 127 (22.0)	0.3	n=203 289 (71.0) 117 (29.0)	1.0	<b>0.012 (дом.)</b> <b>1.59 (1.10– 2.28)</b>	<b>0.0051 (дом.)</b> <b>1.79 (1.19-2.70)</b>
rs893821	T C	n=286 475 (83.0) 97 (17.0)	1.0	n=204 342 (84.0) 66 (16.0)	0.79	0.69 (дом.) 0.92 (0.62– 1.36)	0.31 (дом.) 0.80 (0.51-1.23)
rs2415231	T C	n=291 294 (51.0) 288 (49.0)	0.48	n=208 209 (50.0) 207 (50.0)	0.78	0.86 (рец.) 1.04 (0.68-1.58)	0.74 (рец.) 0.92 (0.58-1.47)
<b><i>FBLN3</i></b>							
rs3791660	A C	n=291 323 (55.0) 259 (45.0)	0.29	n=209 214 (51.0) 204 (49.0)	0.27	<b>0.041 (рец.)</b> <b>1.56 (1.02-2.40)</b>	0.16 (рец.) 1.41 (0.87-2.29)
rs1367228	C A	n=290 324 (56.0) 256 (44.0)	0.63	n=209 230 (55.0) 188 (45.0)	1.0	0.68 (рец.) 1.10 (0.70-1.72)	0.56 (рец.) 1.16 (0.70-1.94)
rs3791679	T C	n=284 409 (72.0) 159 (28.0)	0.24	n=209 312 (75.0) 106 (25.0)	0.58	0.18 (дом.) 0.78 (0.55-1.12)	0.12 (дом.) 0.73 (0.49-1.09)
rs2033316	A G	n=290 484 (83.0) 96 (17.0)	0.67	n=207 332 (80.0) 82 (20.0)	0.51	0.12 (дом.) 1.35 (0.93-1.98)	0.27 (дом.) 1.27 (0.83-1.93)

HWP- P-value соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга; OR- отношение шансов; 95%ДИ - 95% доверительный интервал; дом.-доминантная модель; рец.-рецессивная модель; адд.-аддитивная модель.

<sup>a</sup> Анализ с поправкой на возраст, индекс массы тела, наличие родовых травм и количество родов.

Значимые результаты выделены полужирным шрифтом

Гаплотипический анализ тринадцати полиморфных вариантов гена *FBLN5* выявил группы аллелей, ассоциированные с развитием пролапса тазовых органов, результаты анализа представлены в таблице 4.1.2. Эффект был обнаружен для гаплотипа из 12 аллелей, который достоверно чаще встречался среди женщин, страдающих ПТО, по сравнению с контролем ( $P=0.039$ ,  $OR=2.28$ , 95% ДИ: 1.04-4.97; общая частота встречаемости 5.43%).

Гаплотипический анализ ассоциации *FBLN5* с пролапсом тазовых органов

№	rs2430339	rs929608	rs12586948	rs2284337	rs2430347	rs2498841	rs2018736	rs12589592	rs2430369	rs2245701	rs2474028	rs2284338	rs2267989	Частота встречаемости	OR (95% ДИ)	P
Гаплотипический анализ 12 SNPs гена <i>FBLN5</i>																
1	-	T	G	G	G	G	A	A	T	G	C	G	A	0.1643	1.00	---
2	-	T	A	A	A	T	C	G	C	G	T	A	G	<b>0.0543</b>	<b>2.28 (1.04-4.97)</b>	<b>0.039</b>
Гаплотипический анализ 11 SNPs гена <i>FBLN5</i>																
1	-	-	G	G	G	G	A	A	T	G	C	G	A	0.2299	1.00	---
2	-	-	A	A	A	T	C	G	C	G	T	A	G	<b>0.0926</b>	<b>1.90 (1.10-3.29)</b>	<b>0.021</b>
Гаплотипический анализ 10 SNPs гена <i>FBLN5</i>																
1	-	-	G	G	G	G	A	A	T	-	C	G	A	0.2227	1.00	---
2	-	-	A	A	A	T	C	G	C	-	T	A	G	<b>0.0947</b>	<b>1.87 (1.09-3.20)</b>	<b>0.024</b>
3	-	-	G	G	G	G	A	A	T	G	-	G	A	0.2714	1.00	---
4	-	-	A	A	A	T	C	G	C	G	-	A	G	<b>0.1132</b>	<b>1.68 (1.03-2.76)</b>	<b>0.04</b>
Гаплотипический анализ 9 SNPs гена <i>FBLN5</i>																
1	-	-	G	G	G	G	A	A	-	-	C	G	A	0.2272	1.00	---
2	-	-	A	A	A	T	C	G	-	-	T	A	G	<b>0.0915</b>	<b>1.87 (1.08-3.23)</b>	<b>0.026</b>
3	-	T	G	-	-	G	A	A	-	G	C	G	A	0.167	1.00	---
4	-	T	A	-	-	G	C	G	-	G	T	A	G	<b>0.019</b>	<b>8.19(2.21-30.39)</b>	<b>0.0018</b>
Гаплотипический анализ 8 SNPs гена <i>FBLN5</i>																
1	-	-	G	G	G	G	A	A	-	-	-	G	A	0.2733	1.00	---
2	-	-	A	A	A	T	C	G	-	-	-	A	G	<b>0.1172</b>	<b>1.95 (1.20-3.19)</b>	<b>0.0077</b>
Гаплотипический анализ 6 SNPs гена <i>FBLN5</i>																
1	-	-	-	G	-	-	A	A	-	-	C	G	A	0.2382	1.00	---
2	-	-	-	A	-	-	C	G	-	-	T	A	G	<b>0.1185</b>	<b>1.82 (1.10-3.01)</b>	<b>0.02</b>
3	-	-	-	A	-	-	C	G	-	-	C	A	G	<b>0.0543</b>	<b>2.17 (1.05-4.48)</b>	<b>0.038</b>

Различные комбинации исследуемых SNPs выявили и другие группы аллелей, связанные с развитием пролапса. Шесть рискованных аллелей гена *FBLN5*, для которых была показана ассоциация с пролапсом тазовых органов, формируют гаплотип rs2284337(A) - rs2018736(C) - rs2474028(T) -rs12589592(G) - rs2284338(A) - rs2267989(G), встречающийся в основной группе достоверно чаще чем в контроле ( $P=0.02$ ,  $OR=1.82$ , 95% ДИ: 1.10-3.01; частота встречаемости 14.05% против 10.26%). Данный гаплотип является вторым по частоте встречаемости после референсного.

При стратификации выборки в группах с неоднократными родами ( $\geq 2$  родов), макросомией плода ( $\geq 4000$ г) и наличием травм мягких родовых путей ассоциированными с пролапсом оказались аллели rs2018736-C, rs12589592-A, rs2474028-T и rs2267989-G гена *FBLN5*, выявленные ранее в общей выборке (таблица 4.1.3). Примечательно, что в стратах с 0-1 родами, нормосомией плода ( $<4000$ г) и без родовых травм значимых эффектов по данным полиморфным вариантам не получено (результаты не представлены).

Таблица 4.1.3

Распределение аллелей гена *FBLN5*, ассоциированных с ПТО, при стратификации выборки по основным клиническим факторам риска (неоднократные роды, травмы мягких родовых путей, макросомия плода)

<b>Неоднократные роды (<math>\geq 2</math> родов), n=227</b>				
Аллель	Контроль (n=106)	ПТО (n=121)	OR, 95% ДИ	$P^*$ (модель)
rs2018736-C	77 (36.3%)	115 (48.7%)	1.64 (1.11-2.43)	0.012 (адд.)
rs12589592-A	98 (46.2%)	83 (35.2%)	0.38 (0.18-0.79)	0.0081 (рец.)
rs2474028-T	68 (32.7%)	96 (40.7%)	1.87 (1.06-3.28)	0.03 (дом.)
<b>Травмы мягких родовых путей, n=200</b>				
Аллель	Контроль (n=93)	ПТО (n=107)	OR, 95% ДИ	$P^{**}$ (модель)
rs2018736-C	58 (31.5%)	99 (47.1%)	2.41 (1.31-4.45)	0.0043 (дом.)
rs12589592-A	82 (44.6%)	67 (31.9%)	0.27 (0.11-0.64)	0.0018 (рец.)
rs2474028-T	49 (26.9%)	85 (40.5%)	1.72 (1.09-2.72)	0.017 (адд.)
rs2267989-G	69 (37.5%)	104 (49.5%)	2.69 (1.42-5.09)	0.0021 (дом.)

Макросомия плода ( $\geq 4000$ г), n=80				
Аллель	Контроль (n=30)	ПТО (n=50)	OR, 95% ДИ	P*** (модель)
rs2018736-C	17 (29.3%)	51 (51.0%)	2.31 (0.96-5.57)	0.054 (адд.)
rs12589592-A	26 (44.8%)	29 (29.0%)	0.14 (0.03-0.71)	0.013 (рец.)
rs2474028-T	10 (17.9%)	40 (40.0%)	2.77 (1.12-6.89)	0.02 (адд.)

\* анализ с поправкой на возраст, индекс массы тела и наличие родовых травм;

\*\* анализ с поправкой на возраст, индекс массы тела и количество родов;

\*\*\* анализ с поправкой на возраст, индекс массы тела, наличие родовых травм и количество родов

В связи с полученными результатами возник вопрос о роли фибулина-5, как гена, контролирующего различия в строении (недостаточную эластичность), или в эффективности регенерации тканей мягких родовых путей. Для получения ответа на этот вопрос выборка была переформирована по наличию/отсутствию разрывов во время родов, безотносительно пролапса тазовых органов. *Post hoc* анализ, ориентированный на поиск ассоциации генетических вариантов *FBLN5* с эластичностью тканей мягких родовых путей (с учетом возраста и массы плода), значимых результатов не выявил (таблица 4.1.4). Таким образом, можно сделать вывод о вовлеченности гена *FBLN5* в генетический контроль процессов поддержания баланса и синтеза *de novo* в уже поврежденных или активно обновляющихся тканях мягких родовых путей, а не исходной эластичности в дородовом периоде.

Таблица 4.1.4

Распределение генотипов гена *FBLN5* у женщин с наличием/отсутствием разрывов во время родов

tagSNPs и генотипы	Без разрывов во время родов	С разрывами во время родов	P <sup>a</sup> OR, 95% ДИ
	Число (%)		
rs2430339	n=179	n=108	
	G/G 132 (73.7)	84 (77.8)	0.57 (дом.)
	G/A 45 (25.1)	22 (20.4)	0.85
A/A 2 (1.1)	2 (1.8)	0.48– 1.50	
rs929608	n=182	n=107	
	T/T 60 (33.0)	33 (30.8)	0.81 (дом.)
	T/C 85 (46.7)	51 (47.7)	1.07
C/C 37 (20.3)	23 (21.5)	0.63–1.79	

rs12586948		n=180	n=109	
	G/G	101 (56.1)	63 (57.8)	0.80 (дом.)
	G/A	58 (32.2)	43 (39.5)	0.94
	A/A	21 (11.7)	3 (2.8)	0.58–1.53
rs2284337		n=182	n=109	
	G/G	87 (47.8)	60 (55.0)	0.17 (дом.)
	G/A	80 (44.0)	46 (42.2)	0.71
	A/A	15 (8.2)	3 (2.8)	0.44–1.16
rs2430347		n=175	n=105	
	G/G	99 (56.9)	66 (62.9)	0.28 (дом.)
	G/A	67 (38.5)	32 (30.5)	0.76
	A/A	9 (4.6)	7 (6.7)	0.46–1.25
rs2498841		n=182	n=109	
	G/G	115 (63.2)	71 (65.1)	0.62 (дом.)
	G/T	59 (32.4)	31 (28.4)	0.88
	T/T	8 (4.4)	7 (6.4)	0.53–1.46
rs2018736		n=175	n=105	
	A/A	58 (33.1)	39 (37.1)	0.40 (дом.)
	C/A	82 (46.9)	45 (42.9)	0.80
	C/C	35 (20.0)	21 (20.0)	0.48–1.34
rs12589592		n=181	n=109	
	G/G	77 (42.5)	41 (37.6)	0.33 (дом.)
	G/A	78 (43.1)	49 (45.0)	1.28
	A/A	26 (14.4)	19 (17.4)	0.78–2.10
rs2430369		n=174	n=109	
	T/T	93 (53.5)	60 (55.0)	0.76 (дом.)
	T/C	70 (40.2)	43 (39.5)	0.93
	C/C	11 (6.3)	6 (5.5)	0.57–1.51
rs2245701		n=180	n=108	
	G/G	127 (70.6)	76 (70.4)	0.97 (дом.)
	G/A	49 (27.2)	30 (27.8)	1.01
	A/A	4 (2.2)	2 (1.8)	0.60–1.71
rs2474028		n=179	n=108	
	C/C	81 (45.2)	42 (38.9)	0.28 (дом.)
	C/T	72 (40.2)	53 (49.1)	1.31
	T/T	26 (14.5)	13 (12.0)	0.80–2.14

OR- отношение шансов; 95%ДИ - 95% доверительный интервал; дом.-доминантная модель

<sup>a</sup> Анализ с поправкой на возраст и массу плода

Гаплотипический анализ полиморфных вариантов гена *LOXLI* с учетом клинических факторов риска выявил гаплотип с частотой встречаемости 23% rs2165241(C) - rs2304719(T) - rs893821(T), ассоциированный с повышенным риском развития ПТО ( $P=0.045$ , OR=1.43, 95% ДИ: 1.01-2.03). Достоверная корреляция с ПТО также была выявлена для гаплотипа rs3791679(T) - rs1367228(A) - rs3791660(C) - rs2033316(A) гена *FBLN3* ( $P=0.028$ , OR=1.98, 95% ДИ: 1.08-3.65, частота встречаемости 6.3%).

При стратификации выборки по количеству родов (0-1 роды и  $\geq 2$  родов) в группе с неоднократными родами, как и в общей выборке, статистически значимый результат получен для рискового аллеля rs2304719-T гена *LOXLI* (множественный регрессионный анализ: доминантная модель,  $P^a=0.036$ , OR=1.79, 95% ДИ: 1.04-3.10; таблица 4.1.5).

Таблица 4.1.5

Распределение генотипов гена *LOXLI* при стратификации выборки по количеству родов (0-1 роды и  $\geq 2$ )

SNP и генотипы	0-1 роды			$\geq 2$ родов		
	Контроль	Пролапс	$P^a$ (модель)	Контроль	Пролапс	$P^a$ (модель)
	Число (%)		OR, 95%ДИ <sup>a</sup>	Число (%)		OR, 95%ДИ <sup>a</sup>
rs2165241 T/T T/C C/C	n=173	n=80		n=115	n=118	
	57 (33.0)	20 (25.0)	0.14 (адд.)	30 (26.1)	31 (26.3)	0.54 (рец.)
	77 (44.5)	36 (45.0)	1.33	53 (46.1)	58 (49.1)	0.83
	39 (22.5)	24 (30.0)	0.91-1.93	32 (27.8)	29 (24.6)	0.46-1.51
rs2304719 C/C C/T T/T	n=174	n=77		n=114	n=115	
	105 (60.3)	38 (49.4)	0.14 (адд.)	74 (64.9)	58 (50.4)	<b>0.036 (дом.)</b>
	60 (34.5)	32 (41.6)	1.40	32 (28.1)	48 (41.7)	<b>1.79</b>
	9 (5.2)	7 (9.1)	0.89-2.20	8 (7.0)	9 (7.8)	<b>1.04-3.10</b>
rs893821 T/T T/C C/C	n=171	n=78		n=112	n=115	
	123 (71.9)	60 (76.9)	0.68 (адд.)	74 (66.1)	77 (67.0)	0.8 (дом.)
	44 (25.7)	16 (20.5)	0.89	34 (30.4)	34 (29.6)	0.93
	4 (2.3)	2 (2.6)	0.50-1.57	4 (3.6)	4 (3.5)	0.53-1.63
rs2415231 C/C C/T T/T	n=174	n=79		n=115	n=118	
	40 (23.0)	14 (17.7)	0.23 (рец.)	26 (22.6)	32 (27.1)	0.33 (дом.)
	88 (50.6)	45 (57.0)	0.65	66 (57.4)	58 (49.1)	0.74
	46 (26.4)	20 (25.3)	0.32-1.33	23 (20.0)	28 (23.7)	0.40-1.36

Примечание: OR- отношение шансов; 95% ДИ- 95% доверительный интервал; дом.- доминантная модель, рец.- рецессивная модель, адд.- аддитивная модель.

<sup>a</sup> Множественный регрессионный анализ с поправкой на возраст, индекс массы тела и наличие родовых травм. Значимые результаты выделены полужирным шрифтом

Гаплотипический анализ в данной группе выявил протективный гаплотип rs2165241(C) - rs2304719(C) - rs893821(T), встречающийся чаще в группе здоровых женщин ( $P=0.024$ , OR=0.41, 95% ДИ: 0.19-0.89; частота встречаемости в

контрольной и основной группе 13.16% и 5.83% соответственно). Примечательно, что обнаруженный в общей выборке рисковый гаплотип rs2165241(C) - rs2304719(T) - rs893821(T) гена *LOXLI* отличается от протективного rs2165241(C) - rs2304719(C) - rs893821(T) только аллельным вариантом rs2304719, данный факт позволяет предположить, что из числа изученных нами SNP именно rs2304719-T ассоциирован с повышенным риском развития ПТО.

С целью оценки применимости полученных результатов для европейской популяции при помощи программы Haploview (version 4.2) был проведен сравнительный анализ структуры неравновесия по сцеплению генов *FBLN5*, *LOXLI* и *FBLN3* между исследованной в данной работе российской выборкой (RUS) и европейской популяцией (CEU/TSI) из проекта HapMap. LD оценивали посредством коэффициентов Левонтина ( $D'$ ) и корреляции Пирсона ( $r^2$ ), блочную структуру определяли с помощью алгоритма «Solid spine of LD» с заданным порогом  $D' \geq 0.8$  (Barrett et al., 2005).

Три tagSNPs гена *LOXLI* (rs2165241, rs2304719, rs893821) образуют единый блок сцепления как в российской, так и в европейской популяции (рис.4.1.1 а, б). Анализ четырех полиморфных вариантов гена *FBLN3* (rs3791679, rs1367228, rs3791660 и rs2033316) выявил сильное сцепление только между rs3791679 и rs1367228 (рис. 4.1.1 в, г). Для 11 изученных tagSNPs гена *FBLN5* (rs2430339, rs12586948, rs2284337, rs2498841, rs2018736, rs12589592, rs2430369, rs2245701, rs2474028, rs929608, rs2430347) в нашей выборке определено три блока сцепления, в то время как в европейской популяции четыре (рисунок 4.1.1 д, е). Несмотря на незначительные различия в значениях  $D'$ , характер сцепления исследованных SNPs генов *LOXLI* и *FBLN3* в сравниваемых группах очень похож в связи с чем полученные нами результаты можно экстраполировать не только на российскую, но и на европейскую популяцию, в меньшей степени данное заключение применимо для гена *FBLN5*.

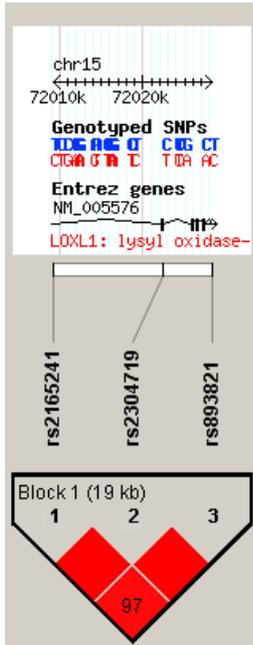


Рис. 4.1.1а

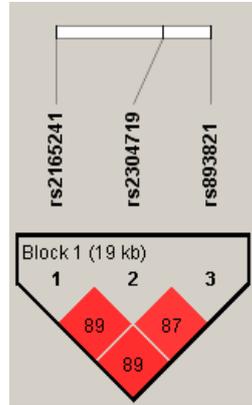


Рис. 4.1.1б

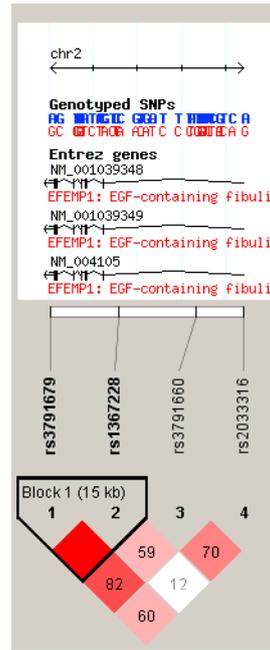


Рис. 4.1.1в

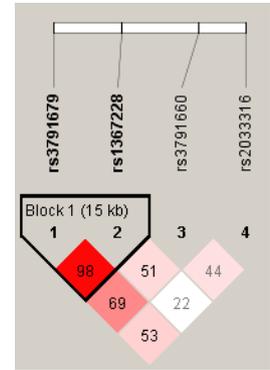


Рис. 4.1.1г

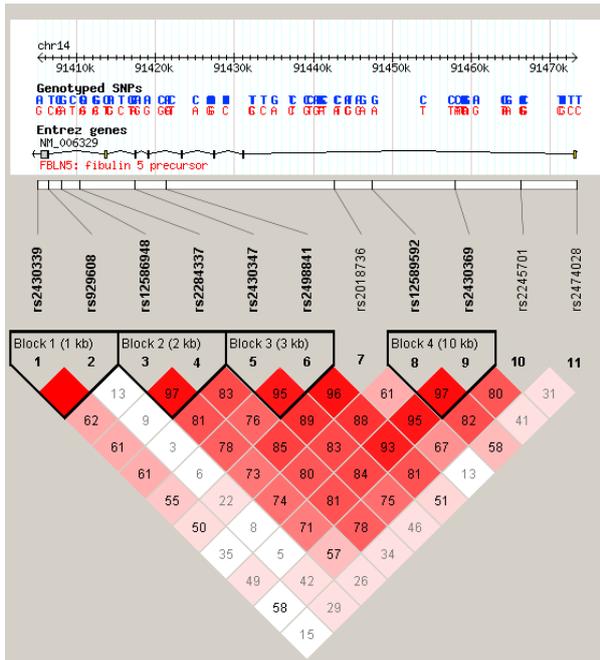


Рис. 4.1.1д

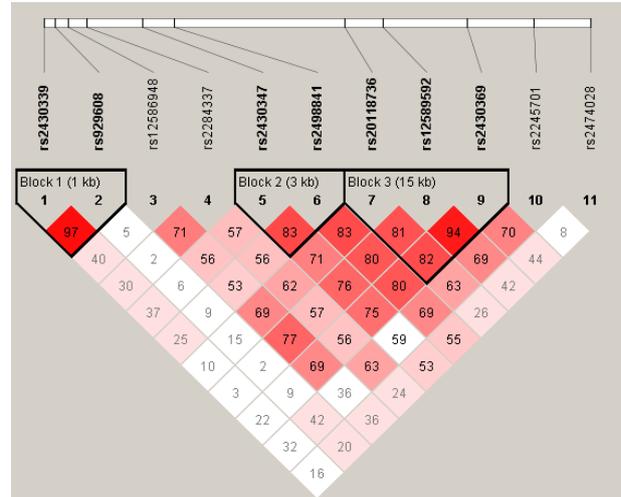


Рис. 4.1.1е

Рисунок 4.1.1. Структура неравновесия по сцеплению генов *LOXL1* (а - в европейской популяции, б - в российской), *FBLN3* (в - в европейской популяции, г - в российской) и *FBLN5* (д - в европейской популяции, е - в российской). В ячейках указаны значения коэффициента неравновесия по сцеплению  $D'$  (в ячейках без указанных значений  $D'=1$ ). Оттенок красного отражает силу сцепления между SNPs; от ярко-красного (сильное сцепление) до белого (слабое сцепление). Блоки сцепления очерчены черными линиями.

## 4.2 Верификация результатов полногеномных исследований

Для верификации результатов двух полногеномных исследований, выполненных Allen-Brady К. с коллегами в ассоциации с семейным пролапсом тазовых органов у европеоидов, нами были изучены 12 генетических вариантов участков хромосом 4q21 (rs1455311), 8q24 (rs1036819), 9q22 (rs430794), 15q11 (rs8027714), 20p13 (rs1810636), 21q22 (rs2236479) и 9q21 (rs12237222, rs11139451, rs12551710, rs4077632, rs2807303, rs2777781). Изучение участка хромосомы 9q21 в корреляции с ПТО в данном случае является неклассическим репликативным исследованием, так как полиморфные варианты данного участка подбирались нами самостоятельно с помощью программы RegulomeDB, определяющей регуляторный потенциал SNPs (приложение 3, таблица 1).

Все сайты находились в состоянии равновесия по Харди-Вайнбергу. Достоверно значимый результат был получен для аллеля rs12237222-G, который встречался чаще у женщин, страдающих ПТО (доминантная модель,  $P=0.023$ , OR=1.57, 95% ДИ: 1.06-2.31), однако множественный регрессионный анализ с поправкой на возраст, индекс массы тела, наличие родовых травм и количество родов аналогичный эффект не выявил. Для остальных 11 исследуемых SNPs ни при обработке общей выборки, ни при проведении множественного регрессионного анализа ассоциаций с пролапсом не обнаружено (таблица 4.2.1).

При подборе полиморфных вариантов для участка хромосомы 9q21 с помощью программы RegulomeDB, rs12237222 была присвоена категория 1a как SNP с максимальной функциональностью. Среди относительно небольшого числа полиморфных вариантов данной категории ( $n=352$ ) во всем человеческом геноме, единственным таким SNP в районе 9q21 является rs12237222.

Распределение генотипов в контрольной и основной группах

tagSNPs и генотипы	Контроль		ПТО		<i>P</i> , OR, (95% ДИ)	<i>P<sup>a</sup></i> , OR, (95% ДИ)
	Число (%)	HWP	Число (%)	HWP		
rs1455311	n=287		n=210			
T/T	187 (65.2)	0.70	146 (69.5)	0.61	0.24 (адд)	0.10 (адд)
T/C	91 (31.7)		60 (28.6)		0.82	0.72
C/C	9 (3.1)		4 (1.9)		(0.58 – 1.15)	0.48 – 1.07
rs1036819	n=290		n=211			
A/A	232 (80.0)	0.55	156 (74.3)	1.00	0.13 (дом)	0.11 (дом)
A/C	54 (18.6)		50 (23.8)		1.38	1.49
C/C	4 (1.4)		4 (1.9)		(0.91 – 2.11)	0.92 – 2.41
rs4077632	n=291		n=209			
A/A	128 (44.0)	0.51	79 (37.8)	0.77	0.094 (адд)	0.22 (адд)
A/G	134 (46.0)		101 (48.3)		1.26	1.20
G/G	29 (10.0)		29 (13.9)		(0.96 – 1.64)	(0.89 – 1.62)
rs2807303	n=285		n=210			
C/C	102 (35.8)	0.53	80 (38.1)	0.13	0.19 (рец)	0.38 (рец)
C/T	142 (49.8)		108 (51.4)		0.79	0.76
T/T	41 (14.4)		22 (10.5)		(0.40 – 1.21)	(0.41 – 1.40)
rs2777781	n=292		n=210			
A/A	154 (52.7)	0.23	111 (52.9)	0.73	0.25 (рец)	0.56 (рец)
A/T	122 (41.8)		82 (39.0)		1.52	1.25
T/T	16 (5.5)		17 (8.1)		(0.75 – 3.08)	(0.59 – 2.67)
rs11139451	n=291		n=210			
T/T	185 (63.6)	0.11	131 (62.4)	1.00	0.78 (дом)	0.74 (дом)
T/C	88 (30.2)		70 (33.3)		1.05	1.07
C/C	18 (6.2)		9 (4.3)		(0.73 – 1.52)	(0.71 – 1.62)
rs12237222	n=291		n=210			
T/T	104 (35.7)	0.63	55 (26.2)	0.21	<b>0.023 (дом)</b>	0.12 (дом)
T/G	136 (46.7)		114 (54.3)		<b>1.57</b>	1.41
G/G	51 (17.5)		41 (19.5)		<b>(1.06-2.31)</b>	(0.91-2.18)
rs12551710	n=291		n=210			
C/C	233 (80.1)	0.75	171 (81.4)	0.23	0.58 (адд)	0.70 (адд)
C/T	56 (19.2)		39 (18.6)		0.88	0.91
T/T	2 (0.7)		0 (0.0)		(0.57 – 1.37)	(0.56 – 1.47)

rs430794		n=289		n=210			
	C/C	148 (51.2)	0.39	122 (58.1)	0.27	0.13 (дом)	0.11 (дом)
	C/A	113 (39.1)		72 (34.3)		0.76	0.72
A/A	28 (9.7)	16 (7.6)		(0.53 – 1.08)		(0.49 – 1.08)	
rs8027714		n=290		n=210			
	G/G	278 (95.9)	1.00	197 (93.8)	1.00	0.30 (дом)	0.27 (дом)
	G/A	12 (4.1)		13 (6.2)		1.53	1.66
A/A	0 (0.0)	0 (0.0)		(0.68 – 3.42)		(0.67 – 4.09)	
rs1810636		n=290		n=210			
	G/G	119 (41.0)	0.09	101 (48.1)	0.75	0.12 (дом)	0.25 (дом)
	G/T	144 (49.7)		91 (43.3)		0.75	0.79
T/T	27 (9.3)	18 (8.6)		(0.53 – 1.07)		(0.53 – 1.18)	
rs2236479		n=287		n=207			
	G/G	131 (45.6)	0.29	81 (39.1)	0.66	0.14 (адд)	0.097 (адд)
	A/G	120 (41.8)		94 (45.4)		1.22	1.28
A/A	36 (12.5)	32 (15.5)		(0.94 – 1.57)		(0.96 – 1.71)	

HWP- P-value соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга; OR- отношение шансов; 95%ДИ - 95% доверительный интервал; дом.-доминантная модель; рец.-рецессивная модель; адд.-аддитивная модель.

<sup>a</sup> Анализ с поправкой на возраст, индекс массы тела, наличие родовых травм и количество родов.

Значимые результаты выделены полужирным шрифтом

Гаплотипический анализ с учетом клинических факторов риска был выполнен для шести SNPs, расположенных на участке хромосомы 9q21. Гаплотип, включающий в свой состав рисковый аллель rs12237222-G, встречался достоверно чаще в основной группе ( $P=0.029$ ,  $OR=3.36$ , 95% ДИ: 1.13- 9.95), частота встречаемости составила 10,2% против 5,9% в контроле. Ассоциированным с ПТО также оказалось сочетание аллелей rs2777781-A и rs12237222-G ( $P=0.0091$ ,  $OR=1.72$ , 95% ДИ: 1.15-2.59). Ключевая роль rs12237222 подтверждается тем, что при проведении гаплотипического анализа 5 SNPs без данного варианта, рисковых гаплотипов обнаружено не было (таблица 4.2.2).

Примечательно, что rs12237222 имеет невысокое, но при этом достоверное неравновесное сцепление с rs11139451 ( $D'=0.257$ ,  $P=1.45 \times 10^{-6}$ ; приложение 3,

таблица 2), для которого в исследовании Allen-Brady с коллегами было показано максимальное значение HLOD (Heterogeneity Logarithm of Odds), равное 3.42 (Allen-Brady, et al., 2009).

Таблица 4.2.2

Гаплотипический анализ ассоциации 9q21 с пролапсом тазовых органов (с учетом клинических факторов риска)

№	rs4077632	rs2807303	rs2777781	rs11139451	rs12237222	rs12551710	Частоты		P - value	OR (95% CI)
							Контроль	ПТО		
<b>Гаплотипический анализ с учетом 6 SNPs</b>										
1	A	T	A	T	T	C	0.1334	0.0985	---	1.00
2	A	C	A	T	T	C	0.1185	0.0943	0.38	0.59 (0.19-1.90)
3	G	C	A	T	G	C	0.0436	0.0937	0.24	1.92 (0.65-5.71)
<b>4</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>0.059</b>	<b>0.1019</b>	<b>0.029</b>	<b>3.36 (1.13-9.95)</b>
<b>Гаплотипический анализ с учетом 5 SNPs при исключении rs12237222</b>										
1	A	C	A	T	-	C	0.1807	0.205	---	1.00
2	A	T	A	T	-	C	0.1662	0.1324	0.96	1.02 (0.48-2.16)
3	G	C	A	T	-	C	0.1146	0.1171	0.68	0.85 (0.39-1.86)
4	A	C	T	T	-	C	0.0949	0.0763	0.63	0.81 (0.34-1.92)
<b>Гаплотипический анализ с учетом 2 SNPs (rs2777781 и rs12237222)</b>										
1	-	-	A	-	T	-	0.4581	0.3663	---	1.00
<b>2</b>	-	-	<b>A</b>	-	<b>G</b>	-	<b>0.2782</b>	<b>0.3575</b>	<b>0.0091</b>	<b>1.72 (1.15-2.59)</b>
3	-	-	T	-	T	-	0.1328	0.167	0.064	1.62 (0.97-2.70)
4	-	-	T	-	G	-	0.1309	0.1092	0.63	0.88 (0.53-1.47)

В основе многофакторных заболеваний лежат сложные межгенные и ген-средовые взаимодействия, которые необходимо учитывать при прогнозировании риска развития заболевания и разработке профилактических мероприятий (Батожаргалова, 2013). В связи с этим мы выполнили анализ межгенных взаимодействий двенадцати полиморфных вариантов участков хромосом 4q21,

8q24, 9q21, 9q22, 15q11, 20p13, 21q22 в генезе пролапса тазовых органов (рисунок 4.2.1).

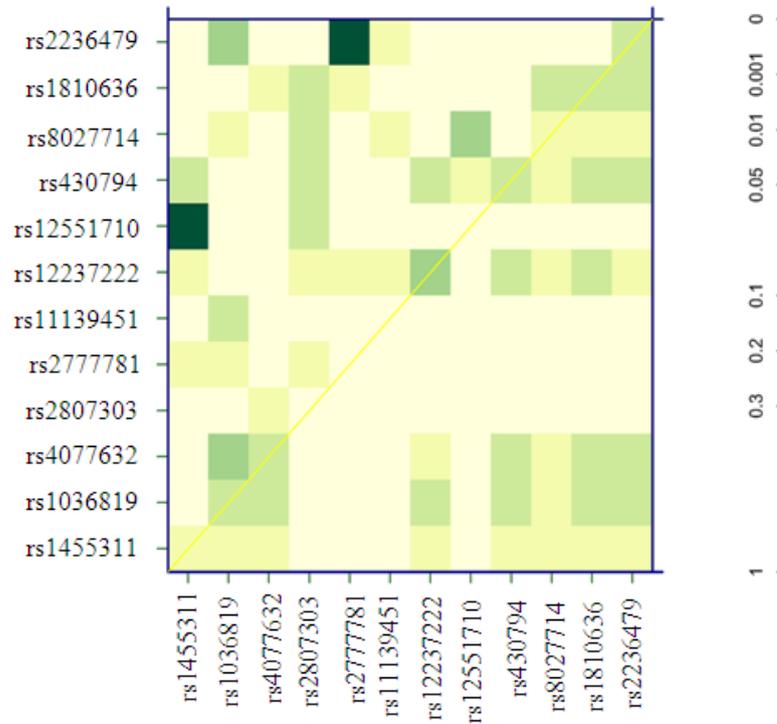


Рисунок 4.2.1 Анализ межгенных взаимодействий двенадцати полиморфных вариантов участков хромосом 4q21, 8q24, 9q21, 9q22, 15q11, 20p13, 21q22; доминантная модель.

Цвет ячеек отражает уровень значимости взаимодействия соответствующих аллелей, от бледно-желтого (низкий уровень значимости) до темно-зеленого (максимально значимый эффект). Диагональная линия содержит значения  $p$  теста отношения правдоподобия для каждого полиморфного варианта в генезе заболевания. Верхний треугольник является матрицей, представляющей уровень значимости для межгенных взаимодействий. Нижний треугольник показывает значение  $p$ , полученное при сравнении межлокусной аддитивной модели с лучшей из моделей для индивидуальных SNPs. Максимально значимое эпистатическое взаимодействие было выявлено для пары rs12551710 - rs1455311 ( $P=7.3 \times 10^{-5}$ ), а также rs2236479 - rs2777781 ( $P=1.7 \times 10^{-4}$ ). Следует подчеркнуть, что эти результаты не отражают статистические взаимодействия, поскольку индивидуальные SNPs из вышеперечисленных не были ассоциированы с риском

развития ПТО. Результаты оставались значимыми после коррекции Бонферрони на множественность сравнений ( $12 \times 12 = 144$  сравнения;  $P = 0.011$  и  $P = 0.024$  соответственно).

Для оценки и визуализации генетического разнообразия исследуемой выборки на основе частот аллелей изученных нами 12 SNPs мы выполнили дискриминантный анализ главных компонент российской популяции (RUS) и популяций из базы данных HarMap: жители штата Юта европейского происхождения (CEU - Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection), жители Тосканы (TSI - Tuscans in Italy), азиатские популяции (CHD - Chinese in Metropolitan Denver, Colorado; JPT - Japanese in Tokyo), африканские популяции (YRI - Yoruba in Ibadan, Nigeria; LWK - Luhya in Webuye, Kenya), а также индийская (GIH - Gujarati Indians in Houston, Texas) и мексиканская популяции (MEX - Mexican ancestry in Los Angeles, California). Из базы данных HarMap были отобраны частоты генотипов исключительно для женщин, таким образом численность сравниваемых групп составила: 89 (CEU); 44 (TSI); 44 (CHD); 45 (JPT); 80 (YRI); 45 (LWK); 43 (GIH); 43 (MEX).

На рисунке 4.2.2, отражающего результаты анализа генетического разнообразия, видно, что популяция RUS кластеризуется совместно с другими кавказоидными популяциями (CEU и TSI). Африканские (YRI и LWK) и азиатские (CHD и JPT) популяции отличаются от кавказоидов, в то время как мексиканская (MEX) и индийская (GIH) популяции заняли промежуточное положение. Таким образом, представленная в диссертационной работе группа женщин является репрезентативной относительно европеоидов, а роль полиморфных вариантов участка хромосомы 9q21 в семьях европеоидов подтверждена на российской выборке со спорадической формой ПТО.

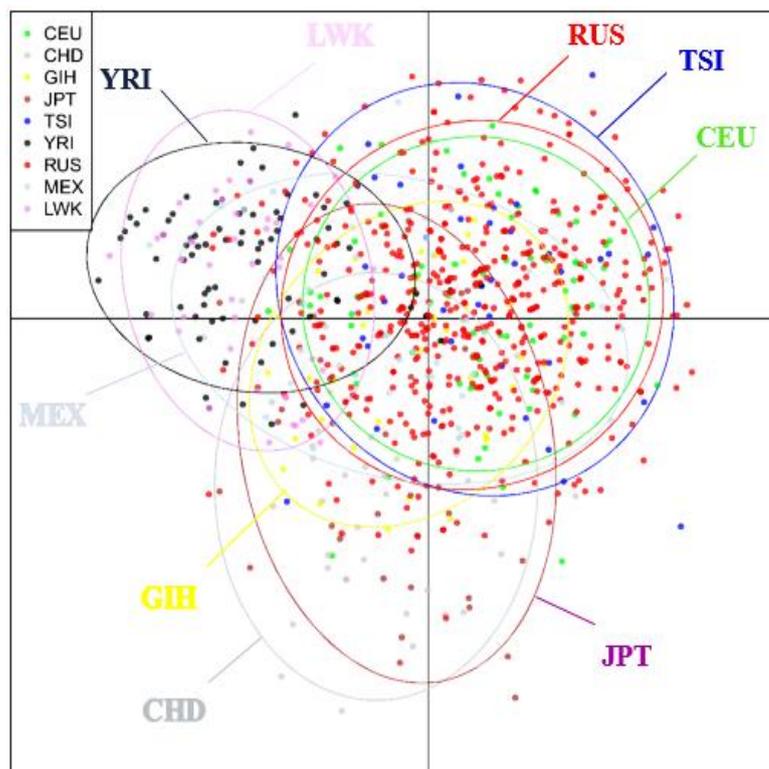


Рисунок 4.2.2. Оценка репрезентативности российской выборки; анализ главных компонент по 12 изученным SNPs для российской (RUS) и популяций из HarMap: индийской (GIH - Gujarati Indians in Houston, Texas), мексиканской (MEX - Mexican ancestry in Los Angeles, California), азиатских (CHD - Chinese in Metropolitan Denver, Colorado; JPT - Japanese in Tokyo), африканских популяций (YRI - Yoruba in Ibadan, Nigeria; LWK - Luhya in Webuye, Kenya), для жителей штата Юта европейского происхождения (CEU - Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection) и жителей Тосканы (TSI - Tuscans in Italy).

### 4.3 Полиморфизм генов *COL3A1*, *MMP9*, *ESR1* и *PGR* и риск развития пролапса тазовых органов. Мета-анализ

За последние два десятилетия выполнен ряд работ по изучению молекулярно-генетической природы пролапса тазовых органов. В качестве генов-кандидатов определены гены, участвующие в сборке и синтезе коллагеновых и эластических волокон (*COL3A1*, *LAMC1*, *LOXL1*, *FBLN5*, *FBLN3*), гены семейства матриксных металлопротеиназ (*MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*), ответственные

за ремоделирование компонентов экстрацеллюлярного матрикса, а также тканевой ингибитор металлопротеиназ-1 (*TIMP-1*) (Northington, 2011; Venkataraman et al., 2012; Xu et al., 2014; Zhang et al., 2014; Ji et al., 2015).

Мы изучили четыре полиморфных варианта (*COL3A1* rs1800255, *MMP9* rs17576, *ESR1* rs2228480 и *PGR* rs484389), которые ранее уже были рассмотрены в ассоциации с ПТО зарубежными коллегами.

Таблица 4.3.1

Распределение генотипов генов *COL3A1*, *MMP9*, *ESR1* и *PGR* в контрольной и основной группах

SNP и генотипы		Контроль		ПТО		P, OR, (95% ДИ)	P <sup>a</sup> , OR, (95% ДИ)
		Число (%)	HWP	Число (%)	HWP		
rs1800255 <i>COL3A1</i>	G/G	n=287 183 (63.8)	1.0	n=209 125 (59.8)	1.0	0.37 (дом) 1.18 0.82-1.71	0.51 (дом) 1.15 0.76-1.72
	G/A	93 (32.4)		74 (35.4)			
	A/A	11 (3.8)		10 (4.8)			
rs17576 <i>MMP9</i>	A/A	n=290 111 (38.3)	0.9	n=210 70 (33.3)	0.57	0.26 (дом) 1.24 0.85-1.80	0.12 1.39 0.92-2.12
	A/G	136 (46.9)		107 (51.0)			
	G/G	43 (14.8)		33 (15.7)			
rs2228480 <i>ESR1</i>	G/G	n=290 195 (67.2)	1.0	n=210 137 (65.2)	0.21	0.4 (адд) 1.15 (0.83-1.61)	0.44 (адд) 1.16 0.80-1.68
	G/A	90 (31.0)		65 (30.9)			
	A/A	5 (1.7)		8 (3.8)			
rs484389 <i>PGR</i>	T/T	n=291 159 (54.6)	0.64	n=210 115 (54.8)	0.023	0.56 (адд) 0.91 0.67-1.24	0.9 (адд) 0.98 0.70-1.37
	T/C	115 (39.5)		89 (42.4)			
	C/C	17 (5.8)		6 (2.9)			

HWP- P-value соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга; OR- odds ratio; 95%ДИ - 95% доверительный интервал; дом.-доминантная модель; рец.-рецессивная модель; адд.-аддитивная модель.

<sup>a</sup> Анализ с поправкой на возраст, индекс массы тела, наличие родовых травм и количество родов.

При обработке как общей выборки, так и при выполнении множественного регрессионного анализа достоверно значимых эффектов не зарегистрировано (таблице 4.3.1). В стратах, сформированных в зависимости от основных клинических факторов (количества родов, массы плода и наличия родовых травм) ассоциаций с ПТО также не выявлено.

На основе полученных результатов и имеющихся литературных данных мы провели мета-анализ ассоциации полиморфных вариантов в генах *COL3A1* (rs1800255), *MMP9* (rs17576), *ESR1* (rs2228480), *PGR* (rs484389) и риска развития пролапса тазовых органов. Систематический поиск оригинальных ассоциативных исследований проводился с помощью баз данных NCBI, eLIBRARY.RU, Google Academia и HuGE Navigator, поисковые термины: «пролапс тазовых органов», «pelvic organ prolapse». Критериями включения в анализ явились следующие условия: 1) исследование должно иметь дизайн случай-контроль и изучать ассоциации между выше перечисленными полиморфными вариантами и ПТО, и 2) наличие данных генотипирования для вычисления отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения RevMan (версия 5.3). Гетерогенность исследований оценивалась с помощью Q критерия Кохрена и  $I^2$ . Отношения шансов (OR), вычисленные для каждого исследования, объединяли, используя модель с фиксированными эффектами (метод Мантеля-Хэнзеля). В случае высокой статистической неоднородности ( $I^2 \geq 50\%$ ) применялась модель случайных эффектов. В мета-анализ было включено 5 полнотекстовых статей. Основные характеристики исследований (фамилия первого автора, год издания, размеры выборок, этническая или расовая принадлежность участников, характеристика контрольных и основных групп, изученные SNP, частоты генотипов и выявленные эффекты) представлены в таблице 4.3.2.

## Характеристика статей, включенных в мета-анализ

Первый автор, год	Раса/ этнич. группа Страна	ПТО (n)	Контроль (n)	Фенотип ПТО	Фенотип Контроль	Ген (SNP), генотипы	Частоты (n)		HWP	Рисковый генотип	P, OR, 95% ДИ
							ПТО	Контроль			
Chen HY (2008)	NR, Тайвань	84	147	ПТО II-IV степени	ПТО 0-I степени	<i>COL3A1</i> (rs1800255) GG GA AA	n=84 54 22 8	n=147 93 51 3	0.62	A/A	0.02 5.05 1.30-19.60
Chen HY (2008)	NR, Тайвань	88	153	ПТО II-IV степени	ПТО 0-I степени	<i>ESR1</i> (rs2228480) GG GA AA	n=88 45 41 2	n=153 102 44 7	0.44	G/A	0.038 1.87 1.04-3.38
Kluyvers KB (2009)	Европейцы, Голландия	202	102	Женщины с ПТО (степень не указана)	Женщины с вагинальными родами без ПТО	<i>COL3A1</i> (rs1800255) GG GA AA	n=202 100 77 27	n=102 55 44 3	0.38	A/A	0.06 5.0 1.4-17.1
Chen HY (2009)	NR, Тайвань	87	150	ПТО II-IV степени	ПТО 0-I степени	<i>PGR</i> (rs484389) TT TC CC	n=87 63 19 5	n=150 130 13 7	0.001	C/T	0.0048 3.02 1.40-6.49
Chen HY (2010)	NR, Тайвань	92	152	ПТО II-IV степени	ПТО 0-I степени	<i>MMP9</i> (rs17576) GG GA AA	n=92 60 30 2	n=152 88 47 17	0.053	A/G	0.031 5.41 1.17-25.04
										G/G	0.0219 5.77 1.29-25.86

NR – этническая группа не указана; HWP- P-value соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга; OR- odds ratio; 95% ДИ - 95% доверительный интервал

Исследование ассоциации полиморфного варианта rs1800255 гена *COL3A1* с пролапсом тазовых органов было представлено в трех работах, однако одна из них (Lince et al., 2014) частично была выполнена на выборке, рассмотренной ранее в работе Kluivers с коллегами (Kluivers et al., 2009). Таким образом, систематический анализ rs1800255 был осуществлен на основе результатов двух исследований (Chen et al., 2008; Kluivers et al., 2009), исключив работу Lince SL с коллегами. В данных работах был выявлен рисковый аллель А, достоверно чаще встречающийся среди женщин с пролапсом (рецессивная модель). Общий объем выборки с учетом нашей составил 1031 женщин, из которых 495 с ПТО и 536 без данной патологии. При анализе мы использовали рецессивную модель (А/А против G/G+G/A). Результаты мета-анализа rs1800255 гена *COL3A1* продемонстрированы на рисунке 4.3.1. Так как коэффициент гетерогенности  $I^2$  составил 58%, была использована модель случайного эффекта. Несмотря на то, что в нашей выборке для rs1800255 значимых результатов не обнаружено, в общей выборке генотип А/А оказался ассоциированным с ПТО (OR = 2.90, 95% ДИ: 1.05 – 7.99,  $P = 0.04$ ).

Из двух работ, в которых рассматривался вклад rs17576 гена *MMP9* в развитие пролапса, исследование Wu JM с коллегами пришлось исключить в связи с отсутствием данных генотипирования (Wu et al., 2012). В работе Chen NY с коллегами, включенной в мета-анализ, ПТО достоверно чаще встречался у носительниц А/Г и G/G генотипов (OR: 5.41, 95% ДИ: 1.17–25.04,  $P=0.031$  и OR: 5.77, 95% ДИ: 1.29–25.86,  $P=0.0219$ , соответственно) (Chen et al., 2010). В исследование было включено 744 женщин, из которых 442 составили контрольную группу и 302 пациентки – основную. Для сравнения частот генотипов использовали доминантную модель (G/G против G/A+A/A). Общее значение OR вычисляли с помощью модели с фиксированными эффектами, коэффициент гетерогенности  $I^2$  равен 0%. Ассоциации с пролапсом для полиморфного варианта rs17576 гена *MMP9* в общей выборке обнаружено не было (OR: 1.20, 95% ДИ: 0.83–1.72,  $P=0.33$ , рисунок 4.3.1).

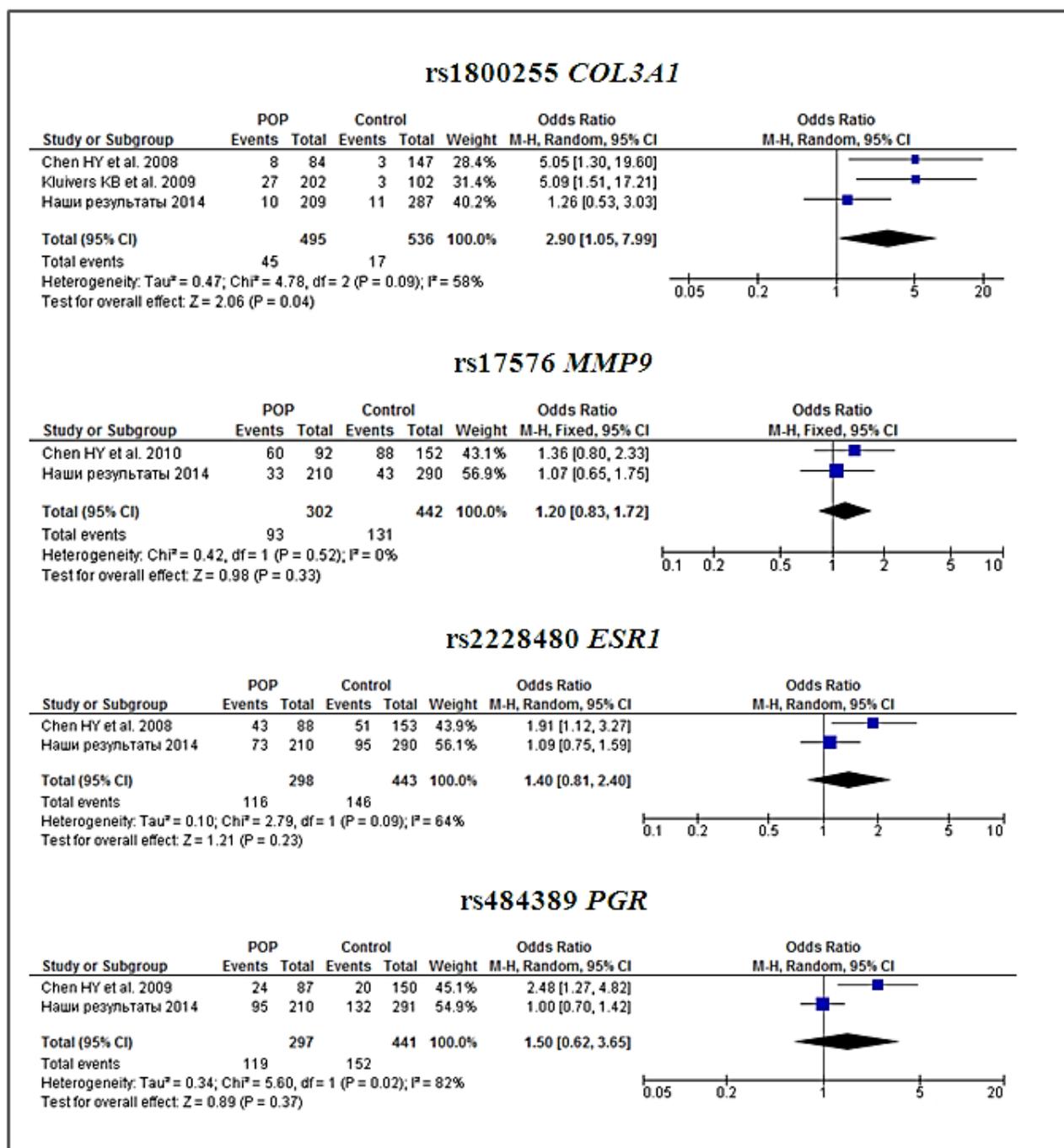


Рисунок 4.3.1 Результаты мета-анализа ассоциации полиморфных вариантов генов *COL3A1* (rs1800255), *MMP9* (rs17576), *ESR1* (rs2228480), *PGR* (rs484389) с пролапсом тазовых органов

Изучение связи полиморфных вариантов генов *ESR1* (rs2228480) и *PGR* (rs484389) с развитием пролапса тазовых органов представлено в единичных работах Chen HY с коллегами (Chen et al., 2008; Chen et al., 2009). Достоверно значимый эффект был выявлен для генотипа rs2228480-G/A (OR: 1.87, 95% ДИ:

1.04–3.38,  $P=0.038$ ), а также rs484389-C/T (OR: 3.02, 95% ДИ: 1.40–6.49,  $P=0.0048$ ). Выборка для мета-анализа rs2228480 состояла из 741 женщины, у 298 из которых был диагностирован пролапс тазовых органов и 443 здоровых женщины. Коэффициент гетерогенности  $I^2$  составил 64%, значения отношения шансов (OR) объединяли, используя модель случайного эффекта. Анализ частот был произведен для G/A+A/A генотипов. Мета-анализ значимых эффектов для гена *ESR1* (rs2228480) не выявил (OR: 1.40, 95% ДИ: 0.81–2.40,  $P=0.23$ , рисунок 4.3.1). Систематический анализ ассоциаций полиморфного варианта rs484389 гена *PGR* с ПТО выполнен на группе из 738 женщин (297 с ПТО и 441 без данной патологии) с применением доминантной модели (T/C+C/C); значимых ассоциаций не обнаружено (OR: 1.50, 95% ДИ: 0.62–3.65,  $P=0.37$ , рисунок 4.3.1).

Таким образом, из четырех полиморфных вариантов rs1800255 (*COL3A1*), rs17576 (*MMP9*), rs2228480 (*ESR1*), rs484389 (*PGR*), по результатам мета-анализа достоверно значимая ассоциация с пролапсом тазовых органов была выявлена только для генотипа rs1800255-A/A.

Поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хокберга выполнялась с учетом, что из тринадцати исследованных SNPs гена *FBLN5* десять (за исключением rs2430339, rs929608, rs2245701) являются значимо сцепленными ( $p<0.05$ ), три сцепленных SNPs из четырех в гене *LOXLI* (кроме rs2415231), все четыре сцепленных SNPs гена *FBLN3* и четыре одиночных полиморфных варианта генов *COL3A1*, *MMP9*, *ESR1* и *PGR* (приложение 3). Шесть SNPs участка хромосомы 9q21 и шесть одиночных вариантов участков хромосом 4q21, 8q24, 9q22, 15q11, 20p13, 21q22 при поправке на множественность сравнений не учитывались, так как данные SNPs изучались с целью верификации высоко значимых результатов полногеномных исследований. Считается, что в таком случае коррекция на множественность сравнений не обязательна (Thomas et al., 2009). Таким образом, при поправке на множественность сравнений (число сравнений составило 11) ассоциации с ПТО

остались значимыми для rs12589592 гена *FBLN5* ( $p=0.024$ ) и rs2304719 гена *LOXL1* ( $p=0.028$ ).

#### **4.4 Анализ полиморфных вариантов и групп генов, ассоциированных с пролапсом тазовых органов в каталоге PheWAS**

Учитывая сравнительно небольшой объем информации по ассоциативным исследованиям ПТО, важным представляется использование мировых ресурсов, позволяющих получить дополнительные сведения по данному клиническому фенотипу. К таким ресурсам относится PheWAS (Phenome-Wide Association Study) Catalog (<https://phewas.mc.vanderbilt.edu>). Каталог PheWAS содержит результаты ассоциативных исследований 1358 фенотипов с 3144 SNPs (из представленных в GWAS каталоге) для 13835 европеоидов с доступными электронными историями болезней из сети eMERGE (Electronic Medical Records and Genomics), в том числе в каталоге имеются данные о наличии/отсутствии ПТО (Denny et al., 2013). В PheWAS каталог включены корреляции с уровнем значимости  $p<0.05$ ; каждому фенотипу присвоен индивидуальный код. Средний возраст пациентов составил  $69.5\pm 15.0$  лет; 52.6% от общей выборки - женщины; средний период наблюдения  $15.7\pm 10.3$  лет.

Поиск ассоциаций «заболевание-ген» по каталогу PheWAS, производившийся в группе женщин с генитальным пролапсом ( $n=718$ ), привел к отбору 159 SNPs. Ни по одному из найденных полиморфных вариантов уровень значимости не достигал полногеномного ( $p<5\times 10^{-8}$ ), значение  $p$  варьировало в диапазоне от  $2.0\times 10^{-4}$  до 0.05. С уровнем значимости  $p<0.001$  было обнаружено только два SNPs: rs710446 гена *KNG1* (kininogen 1) ( $p=2.1\times 10^{-4}$ ) и rs314253, расположенного между генами *ASGR1* (asialoglycoprotein receptor 1) и *DLG4* (discs large MAGUK scaffold protein 4) ( $p=6.1\times 10^{-4}$ ) (рисунок 4.4.1).

Для выявления групп генов, связанных с развитием ПТО, вторичная обработка полученных данных проводилась несколькими способами. Набор полиморфных вариантов с учетом уровня значимости корреляции с пролапсом

гениталий по каталогу PheWAS был проанализирован в программе GSA-SNP (Gene Set Analysis SNP). Данная программа осуществляет поиск групп генов, вовлеченных в общие биологические процессы по базам Gene Ontology (GO) и/или KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Nam et al., 2010). GSA-SNP значительно увеличивает мощность ассоциативного анализа и точно определяет список соответствующих генов, определяя его на основе неравновесного сцепления по референсному геному hg18. Анализ осуществлялся для групп, состоящих как минимум из пяти генов при  $P < 0.05$  с учётом поправки Бенджамини-Хокберга (Benjamini-Hochberg) на множественность сравнений. Из 17 выявленных групп генов, основная часть оказалась вовлечена в регуляцию системных процессов, передачу нервного импульса, поведение, клеточный ионный гомеостаз и функционирование везикулярной системы клетки; результаты представлены в таблице 4.4.1.

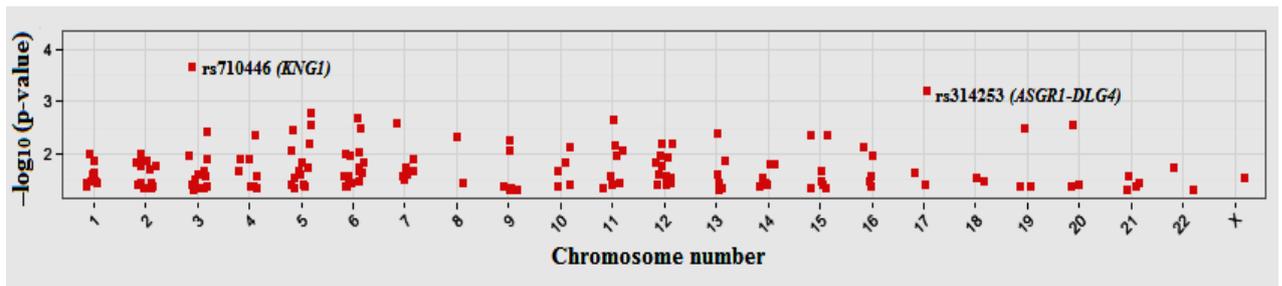


Рисунок 4.4.1 Manhattan plot, отражающий значения  $-\log_{10}(P\text{-values})$  ассоциаций полиморфных вариантов с генитальным пролапсом по каталогу PheWAS; SNPs с уровнем значимости  $p < 0.001$  подписаны.

На следующем этапе мы воспользовались интернет-ресурсом KOBAS 2.0 (KEGG Orthology Based Annotation System), который позволяет выполнить анализ обогащения по общедоступным функциональным онтологиям с целью определения биологических путей, процессов и заболеваний, характерных для изучаемого набора генов (Xie et al., 2011). В данном случае сформированный программой GSA-SNP список генов мы сравнили с ассоциациями «ген-признак» по NHGRI GWAS каталогу (The National Human Genome Research Institute Catalog).

Результаты анализа функциональных категорий групп генов по базе Gene Ontology (GO)

Термин и номер категории GO	Число генов	Общее для GO-категории число генов	<i>p</i> -value	Скорректир. <i>p</i> -value	Гены
Системный процесс (GO:0003008, system process)	18	1495	4.76E-4	0.031	<i>KNG1, DLG4, PARK2, CHRNA3, IREB2, AAAS, NAV2, ALOX5, KCNQ1, HNF1A, NPPC, SLC26A3, PDE3A, TFF1, GABRB3, TRPM8, MYH6, SCN10A</i>
Регуляция системных процессов (GO:0044057, regulation of system process)	9	432	1.33E-5	0.0068	<i>KNG1, DLG4, PARK2, CHRNA3, ALOX5, KCNQ1, NPPC, TFF2, MYH6</i>
Поведение (GO:0007610, behavior)	6	394	3.21E-5	0.0082	<i>DLG4, PARK2, CHRNA3, AAAS, NAV2, TSHR</i>
Локомоторное поведение (GO:0007626, locomotory behavior)	5	138	5.66E-5	0.0097	<i>DLG4, PARK2, CHRNA3, NAV2, TSHR</i>
Синаптическая передача (GO:0007268, synaptic transmission)	5	534	4.39E-4	0.031	<i>DLG4, PARK2, CHRNA3, KCNQ1, GABRB3</i>
Передача нервного импульса (GO:0019226, transmission of nerve impulse)	5	601	4.39E-4	0.031	<i>DLG4, PARK2, CHRNA3, KCNQ1, GABRB3</i>
Сигнализация многоклеточного организма (GO:0035637, multicellular organismal signaling)	5	605	4.39E-4	0.031	<i>DLG4, PARK2, CHRNA3, KCNQ1, GABRB3</i>
Клеточный ионный гомеостаз (GO:0006873, cellular ion homeostasis)	10	491	8.29E-5	0.011	<i>KNG1, DLG4, CHRNA3, IREB2, CACNA1C, SLC30A7, KCNQ1, TMPRSS3, TRPM8, SLC22A17</i>

Термин и номер категории GO	Число генов	Общее для GO-категории число генов	<i>p</i> -value	Скорректир. <i>p</i> -value	Гены
Ионный гомеостаз (GO:0050801, ion homeostasis)	10	544	8.29E-5	0.011	<i>KNG1, DLG4, CHRNA3, IREB2, CACNA1C, SLC30A7, KCNQ1, TMPRSS3, TRPM8, SLC22A17</i>
Клеточный гомеостаз (GO:0019725, cellular homeostasis)	11	607	4.52E-4	0.031	<i>KNG1, DLG4, CHRNA3, IREB2, CACNA1C, SLC30A7, KCNQ1, TMPRSS3, TRPM8, SLC22A17, GCKR</i>
Клеточный химический гомеостаз (GO:0055082, cellular chemical homeostasis)	11	518	4.52E-4	0.031	<i>KNG1, DLG4, CHRNA3, IREB2, CACNA1C, SLC30A7, KCNQ1, TMPRSS3, TRPM8, SLC22A17, GCKR</i>
Везикула (GO:0031982, vesicle)	7	926	3.61E-4	0.031	<i>KNG1, DLG4, MARCH8, SLC30A7, KCNQ1, WLS, HLA-B</i>
Везикула, связанная с цитоплазматической мембраной (GO:0016023, cytoplasmic membrane-bounded vesicle)	7	828	3.61E-4	0.031	<i>KNG1, DLG4, MARCH8, SLC30A7, KCNQ1, WLS, HLA-B</i>
Везикула, связанная с мембраной (GO:0031988, membrane-bounded vesicle)	7	849	3.61E-4	0.031	<i>KNG1, DLG4, MARCH8, SLC30A7, KCNQ1, WLS, HLA-B</i>
Цитоплазматическая везикула (GO:0031410, cytoplasmic vesicle)	7	886	3.61E-4	0.031	<i>KNG1, DLG4, MARCH8, SLC30A7, KCNQ1, WLS, HLA-B</i>
Составная часть цитоплазматической везикулы (GO:0044433, cytoplasmic vesicle part)	6	383	3.78E-4	0.031	<i>KNG1, DLG4, MARCH8, KCNQ1, WLS, HLA-B</i>
Связывание углеводов (GO:0030246, carbohydrate binding)	7	422	5.74E-4	0.031	<i>KNG1, ASGR1, MANBA, NAV2, TNXB, LPL, GCKR</i>

Критериями отбора выступили размер группы (минимум 5 генов) и значение скорректированного поправкой Бенжамина-Хокберга FDR (False Discovery Rate)  $P < 0.10$ . Удовлетворяющей заданным условиям оказалась группа из шести генов (*WLS*, *SP7*, *MEPE*, *C6ORF10*, *CCDC170*, *SPTBN1*), связанная по NHGRI каталогу с минеральной плотностью костной ткани (позвоночник) (МПКТ) ( $P_{\text{скор.}} = 0.0936$ ). Наиболее выраженный эффект был показан для гена *SP7* (Sp7 transcription factor), ответственного за дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток и остификацию костной ткани; аллель rs10876432-А данного гена ассоциирован с пониженной МПКТ в каталоге GWAS ( $P = 1 \times 10^{-7}$ ) и с генитальным пролапсом по каталогу PheWAS ( $P = 0.006243$ , OR=1.195).

Для подтверждения выявленных закономерностей мы выполнили сравнительный анализ ассоциаций «генотип-фенотип» для мыши и человека, используя Mouse Genome Informatics (MGI) Database и PheWAS каталог (Eppig et al., 2015). Гены, ассоциированные с генитальным пролапсом по каталогу PheWAS ( $n = 175$ ), были конвертированы в мышинные ортологи. Группа генов для мышинной модели в свою очередь была сформирована на основе данных из раздела сайта MGI MouseMine (<http://www.mousemine.org/>), поиск осуществлялся по ключевому термину «генитальный пролапс» и близким ему по значению («пролапс тазовых органов», «опущение матки», «выпадение матки», «опущение мочевого пузыря», «пролапс тонкой кишки», «тазовый пролапс», «выпадение прямой кишки»); всего в MouseMine было найдено 36 генов, связанных с развитием пролапса у мышей. Дальнейший сравнительный анализ мышинных ортологов PheWAS и мышинных генов MGI выполнялся с помощью приложения VLAD (Visual annotation display) (Richardson, Bult, 2015). Данный ресурс осуществляет функциональный анализ генов относительно фенотипов млекопитающих (Mammalian Phenotype Ontology). В связи с небольшим количеством генов, ассоциированных с развитием пролапса у мышей ( $n = 36$ ), поиск фенотипических категорий производился для групп как минимум из трех генов (вместо пяти) со значением скорректированного FDR  $P < 0.05$ . Для генов из PheWAS каталога и базы MGI было выявлено 175 и 897

фенотипов, соответственно. Общие для обеих групп фенотипы были визуализированы в программной среде R в виде тепловой карты по верхним категориям иерархической структуры Mammalian Phenotype Ontology (Core Team R, 2014) (рисунок 4.4.2).

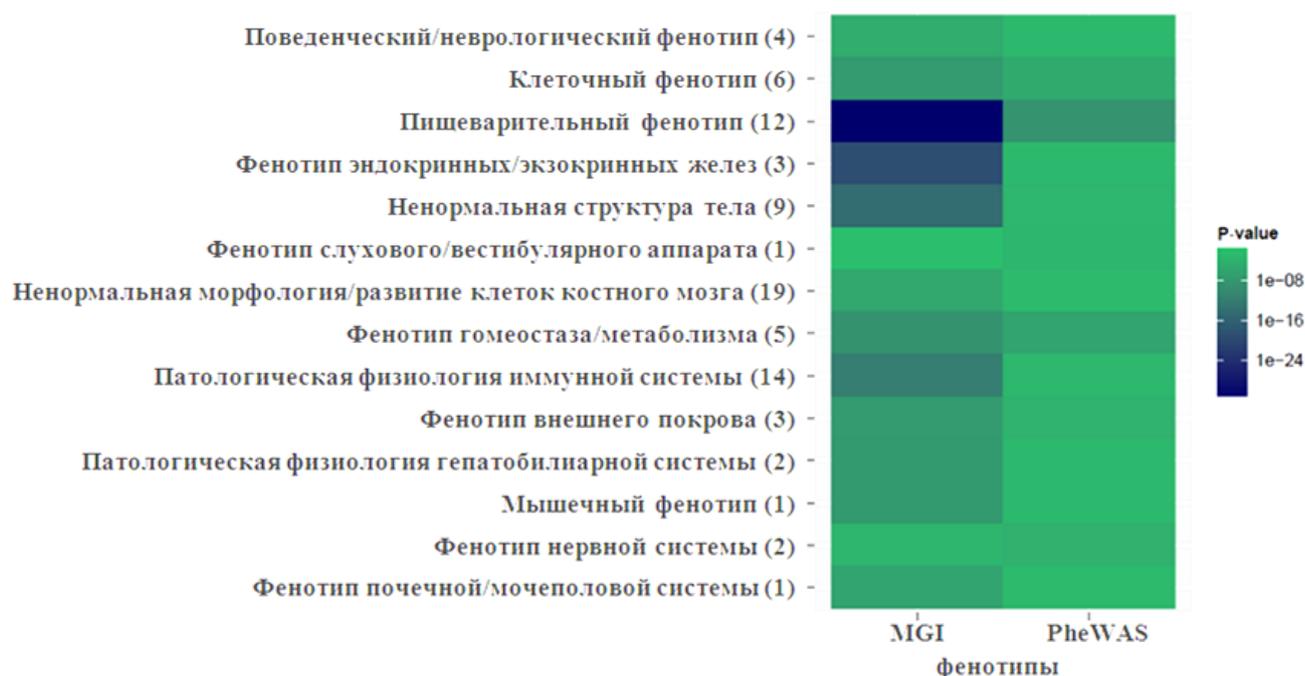


Рисунок 4.4.2 Сравнительный функциональный анализ генов, ассоциированных с генитальным пролапсом по Mouse Genome Informatics (MGI) Database и PheWAS каталогу. В скобках указано количество совпадающих фенотипов-подкатегорий.

Несмотря на то, что группы генов MGI и PheWAS значительно отличались друг от друга по составу, было выявлено значительное количество общих промежуточных фенотипов ( $n=82$ ). Наибольшее число совпадающих фенотипических подкатегорий зафиксировано для категорий «пищеварительный фенотип» ( $n=12$ ), «ненормальная морфология/развитие клеток костного мозга» ( $n=19$ ) и «патологическая физиология иммунной системы» ( $n=14$ ). Самой достоверной в обеих группах оказалась корреляция с пищеварительным фенотипом ( $1.58E-32$  и  $3.58E-09$  для MGI и PheWAS генов, соответственно). Функциональный анализ генов с помощью ресурса VLAD так же, как и анализ в GSA-SNP показал, что развитие генитального пролапса связано с

поведенческим/неврологическим и нервным фенотипом, а также с клеточным гомеостазом/метаболизмом.

#### 4.5 Обсуждение полученных результатов

Под пролапсом тазовых органов понимают аномальную потерю поддержки одного или более тазовых органов, приводящую к их опущению во влагалище или за его пределы. ПТО – полиэтиологичное заболевание, обусловленное рядом факторов (системной дисплазией соединительной ткани, нейрогенной дисфункцией тазового дна, астеническим телосложением, хроническим повышением внутрибрюшного давления, гипоэстрогенией, менопаузальным статусом, гистерэктомией и т.д.), однако основными причинами, провоцирующими развитие опущения тазовых органов, являются вагинальные роды и старение (Nygaard et al., 2008; Memon, Handa, 2013). В процессе родов через естественные родовые пути происходит перерастяжение и повреждение тканей связочного аппарата матки и тазового дна, в частности эластических волокон, придающих связкам растяжимость и эластичность. Риск развития ПТО увеличивается с каждым последующим рождением, а также при родах с осложнениями, в том числе при стремительных родах, разрывах промежности, наложении акушерских щипцов, вакуум-экстракции плода, эпизио- и перинеотомии, и крупном плоде (Rortveit et al., 2007; Handa et al., 2012). В исследованиях на мышцах с нулевыми мутациями по генам *Fbln5* и *Loxl1*, ответственных за эластогенез, было показано, что синтез и сборка эластических волокон имеет решающее значение для восстановления поддержки тазовых органов после вагинальных родов, а нарушение эластогенеза играет основную роль в развитии пролапса (Consonni et al., 2012). Таким образом, одной из задач диссертационной работы явилось изучение роли генетической вариативности генов, участвующих в организации и восстановлении эластических волокон (*LOXLI*, *FBLN3*, *FBLN5*) в связи с риском развития ПТО. В ассоциативном исследовании приняли участие 502 женщины, основную группу составили 210

пациенток с различными формами ПТО (пролапсом матки и влагалища, цистоцеле, ректоцеле, выпадением свода влагалища после экстирпации матки), контрольную группу - 292 женщины без данной патологии.

Экстрацеллюлярный белок *FBLN3*, также известный как EFEMP1 (epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1), является одним из семи членов семейства фибулинов, характеризующихся наличием кальций-связывающих EGF-подобных повторов и C-концевым фибулиновым рецептором (Zhang, Marmorstein, 2010; Камоева и др., 2013). Функция фибулина-3 в настоящий момент ясна не до конца, однако известно, что инактивация *FBLN3* наблюдается при раке молочной железы, простаты, легкого и при колоректальном раке (Pass et al., 2012; Xu et al., 2014), а миссенс-мутация R345W данного гена вызывает развитие коллоидной дистрофии сетчатки Дойна (Zhang et al., 2014). Данные по ассоциации гена *FBLN3* с пролапсом немногочисленны, а результаты противоречивы. В работах McLaughlin PJ и Rahn DD показано, что *Fbln3*<sup>-/-</sup> мыши подвержены развитию ПТО (McLaughlin et al., 2007; Rahn et al., 2009), тогда как при изучении уровня экспрессии данного гена в маточно-крестцовых связках у здоровых женщин и страдающих пролапсом достоверно значимых различий обнаружено не было (Takacs et al., 2010). В нашем исследовании *FBLN3* проявил слабую ассоциацию с повышенным риском развития ПТО. Из четырех изученных SNPs гена *FBLN3*, сопряженным с ПТО оказался аллель rs3791660-C, а также был выявлен рисковый гаплотип rs3791679(T) - rs1367228(A) - rs3791660(C) - rs2033316(A).

Лизилоксидазоподобный белок 1 относится к семейству лизилоксидаз (LOXs), участвующих в организации коллагеновых и эластических волокон. LOXL1 инициирует поперечное ковалентное связывание молекул тропоэластина между собой и тем самым способствует образованию зрелых волокон эластина (Northington, 2011). Ген, кодирующий этот белок, известен как важный генетический фактор развития эксфолиативного синдрома и глаукомы (Ji et al., 2015). Роль гена *LOXL1* в развитии ПТО была неоднократно доказана, в частности

на *Lox11*<sup>-/-</sup> мышах, которые характеризуются нарушением эластогенеза в генитальном тракте, накоплением тропоэластина и, как следствие, развитием ПТО после родов (Liu et al., 2006; Venkataraman et al., 2012). Мы исследовали четыре полиморфных варианта гена *LOXLI*, три из которых являются таргетными (rs2165241, rs2304719, rs893821), а rs241523 в программе SNPexpl показал корреляцию с уровнем экспрессии *LOXLI*. В общей выборке и в страте с неоднократными родами был выявлен рисковый аллель rs2304719-Т. В общей выборке с учетом клинических факторов риска также был обнаружен гаплотип rs2165241(С) - rs2304719(Т) - rs893821(Т), достоверно чаще встречающийся среди женщин с пролапсом.

Еще одним ключевым компонентом в сборке эластических волокон, кроме *LOXLI*, является белок экстрацеллюлярного матрикса фибулин-5 (*FBLN5*), который связывает тропоэластин с лизилоксидазоподобным белком 1. В настоящее время доказано, что недостаточная экспрессия или блокирование *FBLN5* провоцирует аномальный эластогенез и развитие ПТО (Drewes et al., 2007; Northington, 2011; Takacs et al., 2010). Мутации в гене *FBLN5* обуславливают развитие синдрома вялой кожи и возрастную дегенерацию макулы (Jones et al., 2010; Камоева, 2015). При искусственном растяжении влагалища *Fbln5*-нокаутных мышей (имитация родов) отмечено быстрое прогрессирование пролапса, которое впоследствии никогда уже не устранялось (Drewes et al., 2007). Нашим коллективом было изучено 13 полиморфных вариантов гена *FBLN5*, 11 из которых были таргетными (rs2430339, rs12586948, rs2284337, rs2498841, rs2018736, rs12589592, rs2430369, rs2245701, rs2474028, rs929608, rs2430347) и 2 SNPs были ассоциированы с уровнем экспрессии соответствующего гена в лимфобластоидных клеточных линиях (rs2284338, rs2267989). В общей выборке в ассоциации с пролапсом было выявлено три рисковых аллеля (rs2284337-А, rs2018736-С, rs2474028-Т), а также один протективный (rs12589592-А). При анализе без учета клинических факторов риска пограничную значимость показали аллели rs2284338-А и rs2267989-Г. Гаплотипический анализ гена *FBLN5* выявил

различные комбинации аллелей достоверно чаще встречающиеся среди женщин с пролапсом, в том числе гаплотип, состоящий из 12 аллелей с частотой встречаемости 5.43% ( $P=0.039$ ,  $OR=2.28$ , 95% ДИ: 1.04-4.97). Эффекты также были обнаружены в стратах, сформированных по наличию основных клинических факторов риска развития ПТО (неоднократным родам ( $\geq 2$  родов), макросомии плода ( $\geq 4000$ г) и наличию травм мягких родовых путей). Сопряженными с пролапсом в данных группах оказались аллели rs2018736-C, rs12589592-A, rs2474028-T и rs2267989-G. Так как неоднократные роды, крупный плод и травмы мягких родовых путей приводят к повреждению целостности эластических волокон, мы решили определить роль полиморфизма гена *FBLN5* в эластогенезе. Для этого выборка была переформирована по наличию/отсутствию разрывов во время родов, безотносительно ПТО. В данной выборке ассоциаций полиморфных вариантов гена *FBLN5* с эластичностью тканей мягких родовых путей выявлено не было. В связи с этим, можно предположить, что фибулин-5 участвует в процессах поддержания баланса и синтеза *de novo* в уже поврежденных или активно обновляющихся тканях мягких родовых путей, а не в исходной эластичности в дородовом периоде. Эти результаты согласуются с литературными данными, указывающими на высокую значимость гена *FBLN5* в формировании и развитии пролапса тазовых органов у нокаутных мышей не с рождения, а после наступления репродуктивного периода (Budatha et al., 2011).

Таким образом, полученные результаты позволяют убедиться в значимости родов как основного фактора, провоцирующего ПТО, а также сделать вывод, что вариабельность генов *LOXL1* и *FBLN5* влияет на риск развития данной патологии, в то время как влияние вариабельности гена *FBLN3* незначительно. Схожесть характера неравновесного сцепления изученных tagSNPs выше перечисленных генов в исследованной нами выборке и европейской популяции доказывает применимость результатов не только для российской популяции, но и для жителей Европы.

Ранее американскими коллегами было выполнено два полногеномных исследования семейной формы ПТО среди европеоидов, в ходе которых в ассоциации с пролапсом было зарегистрировано шесть отдельных генетических вариантов участков хромосом 4q21 (rs1455311), 8q24 (rs1036819), 9q22 (rs430794), 15q11 (rs8027714), 20p13 (rs1810636), 21q22 (rs2236479), а также участок хромосомы 9q21 (Allen-Brady et al., 2009, 2011). Так как результаты GWAS не всегда подтверждаются на независимых выборках, особенно в различных этнических группах, мы решили провести верификацию результатов, полученных Allen-Brady с коллегами, на российской выборке. Для участка хромосомы 9q21 полиморфные варианты были подобраны с помощью ресурса RegulomeDB, который определяет степень предполагаемой функциональной активности SNPs. Данный подход позволил выявить рисковый аллель rs12237222-G из шести исследованных вариантов (rs12237222, rs11139451, rs12551710, rs4077632, rs2807303, rs2777781), а также гаплотипы, достоверно чаще встречающиеся среди женщин с ПТО. В базе данных SCAN (SNP and CNV Annotation Database) (<http://www.scandb.org/newinterface/about.html>) rs12237222 представлен как полиморфный вариант, ассоциированный с уровнем экспрессии гена *CAT* (каталаза) в лимфобластоидных клетках европеоидов ( $p=9 \times 10^{-5}$ ). Окислительный стресс играет важную роль в развитии многих хронических и возрастных заболеваний, в том числе и в развитии ПТО (Kim et al., 2013), а каталаза в свою очередь является одним из ключевых ферментов антиоксидантной системы и выполняет функцию антиперекисной защиты (Безручко и др., 2012). Для отдельных генетических вариантов участков хромосом 4q21, 8q24, 9q22, 15q11, 20p13, 21q22 достоверно значимых результатов получено не было.

Несмотря на отсутствие или незначительный вклад полиморфных генов по отдельности, носительство определенных аллельных сочетаний генов может влиять на развитие многофакторного заболевания (Львов и др., 2012). В связи с этим мы выполнили анализ межгенных взаимодействий 12 SNPs, в ходе которого для rs12551710 (9q21) и rs2777781 (9q21) было зарегистрировано нелинейное

(эпистатическое) взаимодействие с rs1455311 (4q21) и rs2236479 (21q22), соответственно. Два полиморфных варианта (rs2777781 и rs2236479) локализованы в генах *TLE1* (Transducin-Like Enhancer Of Split 1) и *COL18A1* (Collagen, type XVIII, alpha 1), которые возможно оказывают влияние на развитие и формирование мышечной и соединительной ткани тазового дна. В программе RegulomeDB варианты rs12237222, rs12551710 и rs2236479 входят в группу с высокой функциональной активностью (категории 1a, 1d и 1f, соответственно; приложение 3, таблица 1), причем rs12237222 является единственным SNP в районе 9q21 с коэффициентом 1a (самым высоким показателем функциональной активности). Таким образом, можно считать целесообразным подбор полиморфных вариантов с помощью ресурса RegulomeDB при планировании ассоциативных исследований. В связи с популяционной специфичностью ассоциаций ген-признак мы решили оценить репрезентативность исследуемой нами российской выборки относительно европеоидов с помощью дискриминантного анализа главных компонент, основываясь на данные по изученным 12 SNPs. Дискриминантный анализ показал совместную кластеризацию российской популяции с другими кавказоидами (с европейской популяцией и жителями Тосканы). Таким образом, ассоциация участка хромосомы 9q21 с развитием ПТО в семьях европеоидов, зарегистрированная Allen-Brady с коллегами, была подтверждена нами на независимой российской выборке со спорадической формой ПТО.

В рамках диссертационной работы были изучены полиморфные варианты генов *COL3A1* (rs1800255), *MMP9* (rs17576), *ESR1* (rs2228480), *PGR* (rs484389), ассоциированные по литературным данным с пролапсом. В нашей выборке достоверно значимых эффектов ни по одному из вариантов не получено. С целью повышения статистической мощности исследования был выполнен мета-анализ с учетом наших результатов, в ходе которого выявлен рисковый генотип rs1800255-A/A гена *COL3A1* (OR = 2.90, 95% ДИ: 1.05 – 7.99,  $P = 0.04$ ). *COL3A1* кодирует альфа цепь коллагена III типа, одного из самых распространенных фибриллярных

коллагенов, широко представленного среди соединительнотканых структур влагалища и окружающих органов. Мутации в данном гене вызывают синдром Элерса-Данлоса, пролапс митрального клапана, а также аневризмы аорты и артерий (<http://www.genecards.org/>; Chou et al., 2004). Кроме ассоциации с ПТО, для rs1800255-A была выявлена связь с развитием интракраниальной (внутричерепной) аневризмы в китайской популяции (Varinder et al., 2013), повышенной вероятностью разрывов передней крестообразной связки у лыжников (Stepień-Słodkowska et al., 2015) и с развитием первичной открытоугольной глаукомы (Киселева и др., 2013). Нуклеотидная замена 2092G>A (rs1800255) приводит к замене аланина, характеризующегося гидрофобностью, на треонин в позиции 698 (Ala698Thr). Вполне возможно, что снижение прочности поддерживающих тазовые органы структур обусловлено гидрофильными свойствами треонина (Ward et al., 2014).

Дополнительный поиск полиморфных вариантов, ассоциированных с пролапсом тазовых органов, был выполнен с помощью ресурса PheWAS Catalog, который содержит результаты полногеномных исследований пациентов с доступными электронными историями болезней; в каталоге имеются также данные о наличии/отсутствии ПТО. Из 159 коррелирующих с пролапсом SNPs, только два были с уровнем значимости  $p < 0.001$ : rs710446 гена *KN1* ( $p = 2.1 \times 10^{-4}$ ) и rs314253, расположенный между генами *ASGR1* и *DLG4* ( $p = 6.1 \times 10^{-4}$ ). В каталоге GWAS rs710446 ассоциирован с активированным частичным тромбопластиновым временем, а сам ген *KN1* (Kininogen 1) за счет альтернативного сплайсинга кодирует два белка - высокомолекулярный и низкомолекулярный, последний из которых играет важную роль в агрегации тромбоцитов (Tang et al., 2012). На основе данных полногеномных исследований была зарегистрирована связь полиморфного варианта rs314253 с количеством в крови общего холестерина, а также с уровнем печеночных ферментов, одной из функций которых является регуляция синтеза холестерина (Chambers et al., 2011; Willer et al., 2013). Возможно, корреляция вышеперечисленных SNPs с развитием генитального

пролапса обусловлена влиянием степени агрегации тромбоцитов и уровня холестерина на эффективность кровоснабжения, что является критичным для функциональной состоятельности органов малого таза.

С помощью ресурса KOBAS 2.0 из набора генов, ассоциированных с ПТО по PheWAS, была выявлена группа из шести генов (*WLS*, *SP7*, *MEPE*, *C6ORF10*, *CCDC170*, *SPTBN1*), связанная по NHGRI каталогу с минеральной плотностью костной ткани; четыре из них (*WLS*, *MEPE*, *SP7*, *SPTBN1*) играют важную роль в дифференцировке костной ткани (Hsu, Kiel, 2012). *WLS* (wntless Wnt ligand secretion mediator) как фактор сигнального пути Wnt участвует в дифференцировке остеобластов и формировании костной ткани. Нокаутные по данному гену мыши характеризуются низкой массой трабекулярной и кортикальной костных тканей, а также подвержены спонтанным переломам (Zhong et al., 2012). Ген *MEPE* (matrix extracellular phosphoglycoprotein) является ингибитором минерализации костного матрикса; дефектные по данному гену мыши имеют увеличенную костную массу и являются резистентными к возрастной потере массы губчатых костей (Gowen et al., 2003). *SPTBN1* (spectrin beta, non-erythrocytic 1) играет важную роль в поддержании целостности клеточной мембраны и структуры цитоскелета, вовлечен в TGF-beta (transforming growth factor beta) сигнализацию (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Наиболее выраженная ассоциация с генитальным пролапсом и минеральной плотностью костной ткани из вышеперечисленных генов была показана для *SP7* (Sp7 transcription factor), ответственного за дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток и остификацию костной ткани. Взаимосвязь низкой МПКТ и ПТО среди женщин постменопаузального возраста была неоднократно отмечена в работах зарубежных коллег, объясняющих сопряженность данных патологий нарушением метаболизма коллагена (Pal et al., 2008; Lee et al., 2015).

Функциональный анализ генов, выполненный с помощью ресурсов GSA-SNP и VLAD, выявил группы генов, влияющие на развитие генитального пролапса и в обоих ресурсах отвечающие за поведенческий/неврологический и

нервный фенотипы, а также клеточный гомеостаз/метаболизм. Известно, что денервация мышц тазового дна, обуславливающая их слабость и последующее развитие ПТО, может возникнуть именно в результате нарушений в нервных структурах, в частности во время родов (Tinelli et al., 2010; Kaplan et al., 2011). В недавнем полногеномном исследовании афроамериканок и испанских женщин в корреляции с ПТО был выявлен ген *CPE* (carboxypeptidase E), участвующий в синтезе нейротрансмиттеров и выступающий, как нейротрофический фактор, а также *DPP6* (dipeptidyl-peptidase 6), который кодирует трансмембранный белок, участвующий в работе нейрональных калиевых каналов, изменения в гене *DPP6* ассоциированы с нейродегенеративным заболеванием - боковым амиотрофическим склерозом (Van et al., 2008; Cheng et al., 2013; Giri et al., 2015). Данные результаты подтверждают нашу гипотезу о важной роли генов, участвующих в формировании и функционировании нервной системы, в развитии пролапса тазовых органов. Для развития ПТО возможно критичны и другие категории, выявленные в ходе функционального анализа генов: клеточный гомеостаз/метаболизм, пищеварительная система, ненормальная морфология/развитие клеток костного мозга, патологическая физиология иммунной системы. Таким образом, нами определены группы генов, которые в дальнейшем целесообразно изучить в качестве «причинных» генов развития пролапса тазовых органов.

## Заключение

Пролапс тазовых органов представляет собой распространенное гинекологическое заболевание, ключевыми факторами развития которого являются вагинальные роды и старение, немаловажную роль играют также генетические факторы. В диссертационной работе была показана роль генетической вариабельности генов, контролирующих процессы эластогенеза (*FBLN5* и *LOXLI*), а также были подтверждены ранее выявленные ассоциации участка хромосомы 9q21 и гена *COL3A1* с развитием ПТО. Примечательно, что носительство рискованных аллелей генов *FBLN5* и *LOXLI* в сочетании с основными клиническими факторами (неоднократными родами, макросомией плода и наличием травм мягких родовых путей) значительно увеличивает риск развития пролапса тазовых органов. Нами была установлена роль *FBLN5* как гена, вовлеченного в процессы поддержания баланса и синтеза *de novo* в уже поврежденных или активно обновляющихся тканях мягких родовых путей.

Интересным явился подход, основанный на поиске SNPs по каталогу PheWAS и последующем биоинформатическом анализе соответствующих генов, который выявил связь риска развития пролапса с группой генов, отвечающих за минеральную плотность костной ткани (*WLS*, *SP7*, *MEPE*, *C6ORF10*, *CCDC170*, *SPTBN1*). Данную группу генов в дальнейшем целесообразно изучить в качестве «причинных» генов развития пролапса тазовых органов.

Таким образом, генетический статус, определяемый носительством выявленных рискованных аллелей и гаплотипов, в том числе и в комбинации с клиническими факторами, может быть применен при прогнозировании повышенного риска развития ПТО у женщин любого возраста. Это будет способствовать последующей разработке комплексных превентивных мер (от коррекции образа жизни, характера родоразрешения, до возможной рекомбинантной терапии) с целью уменьшения риска возникновения ПТО, профилактики прогрессирования заболевания и развития тяжелых форм дисфункции тазового дна.

## ВЫВОДЫ

1. При исследовании 37 полиморфных вариантов в группе женщин, состоящей из 292 здоровых и 210 пациенток с пролапсом тазовых органов, был выявлен повышенный риск развития ПТО у носительниц аллелей rs2284337-A, rs2018736-C, rs2474028-T, rs12589592-G гена *FBLN5* и rs2304719-T гена *LOXLI*. Для гена *FBLN5* зарегистрирован рисковый гаплотип, состоящий из 12 аллелей, с частотой встречаемости 5.43% ( $P=0.039$ ,  $OR=2.28$ , 95% ДИ: 1.04-4.97). На примере гена *FBLN5* впервые показана роль комбинации клинических (неоднократные роды, макросомия плода, травмы мягких родовых путей) и генетических факторов риска развития ПТО.

2. Установлена связь гена *FBLN5* с процессами поддержания баланса и синтеза *de novo* в уже поврежденных или активно обновляющихся тканях мягких родовых путей. Не получено данных, свидетельствующих о роли данного гена в исходной эластичности тканей мягких родовых путей в дородовом периоде.

3. На независимой российской выборке со спорадической формой ПТО верифицирована ассоциация участка хромосомы 9q21 с развитием ПТО, зарегистрированная в семьях европеоидов в рамках полногеномного анализа сцепления.

4. Впервые показана целесообразность подбора полиморфных вариантов с помощью ресурса RegulomeDB при планировании ассоциативных исследований.

5. С помощью мета-анализа собственных экспериментальных и литературных данных (суммарный объем выборки 1031) подтверждена корреляция генотипа rs1800255-A/A гена *COL3A1* с развитием ПТО ( $OR = 2.90$ , 95% ДИ: 1.05 – 7.99,  $P = 0.04$ ).

6. Биоинформатический анализ генов, полиморфные варианты которых ассоциированы с ПТО по каталогу PheWAS, выявил связь риска развития пролапса с группой генов, отвечающих за минеральную плотность костной ткани.

### Список литературы

1. Адамян Л.В., Смольнова Т.Ю., Сидоров В.В. Лазерная доплеровская флоуметрия в изучении состояния микроциркуляторного русла у больных с опухолевыми заболеваниями гениталий// Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2006. – №5. – С. 34-39.
2. Аполихина И.А., Дикке Г.Б., Кочев Д.М. Современная лечебно-профилактическая тактика при опущении и выпадении половых органов у женщин. Знания и практические навыки врачей// Акушерство и гинекология. – 2014. – №10. – С. 104-110.
3. Батожаргалова Б.Ц. Клинико-эпидемиологические, генетические и этнические особенности бронхиальной астмы у подростков Забайкалья: дис. д-ра. мед.наук. – М. – 2013. – С. 145.
4. Безручко Н.В., Рубцов Г.К., Ганяева Н.Б., Козлова Г.А., Садовникова Д.Г. Каталаза биологических сред организма человека и ее клинико-биохимическое значение в оценке эндотоксикоза// Вестник ТГПУ. – 2012. – №7(122). – С. 94-98.
5. Буянова С.Н., Савельев С.В., Федоров А.А. Роль ДСТ в патогенезе пролапса гениталий// Рос. Вестн. Акуш.- гин. Спецвыпуск. – 2008. – С. 8-11.
6. Буянова С.Н., Щукина Н.А., Журавлева А.С. Эффективность использования сетчатых протезов при осложненных формах пролапса гениталий// Российский вестник акушера-гинеколога. – 2009. – 1. – С. 76-81.
7. Вавилова Т.П. Биохимия тканей и жидкостей полостей рта: учебное пособие / – 2-е изд., испр. и доп. – 2008. – 208 с. : ил.
8. Гутикова Л.В. Пролапс гениталий: современное состояние проблемы// Журнал ГГМУ. – 2012. – №1. – С. 86-89.
9. Довгалев Р.В., Бенюк В.А., Никонюк Т.Р. Факторы риска в прогнозировании и диагностике пролапса гениталий// Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – том 15. – №2,ч.2(58). – С.88-92.

10. Забродец Г.В., Куликов А.А., Пересада О.А., Барсуков А.Н. Дисфункция тазовых органов у женщин – нейрофизиологические аспекты// Вестник ВГМУ. – 2012. – том 11. – №3. – С.80-88.

11. Захарьян Е.А. Оценка выраженности синдрома дисплазии соединительной ткани у лиц с варикозной болезнью вен нижних конечностей// Экспериментальная и клиническая медицина. – 2013. – №1(58). – С. 122-126.

12. Камоева С.В. Патогенетические аспекты прогнозирования, диагностики и лечения пролапса тазовых органов// – дис. док. мед. наук. –Москва. – 2015. – 257 с.

13. Камоева С.В., Савченко Т.Н., Иванова А.В., Абаева Х.А. Современные генетические аспекты пролапса тазовых органов у женщин// Акушерство, гинекология и репродукция. – 2013. – Том7. – №1. – С.17-21.

14. Капустин А.Н. Роль матриксного белка фибулина-5 в регуляции функциональных свойств урокиназы. – Канд. Дис.– 2005. – 142 с.

15. Киселева О.А., Журавлева А.Н., Халилов Ш.А. Изучение роли полиморфизмов в генах *COL1A1* rs1800012, *COL3A1* rs1800255, *COL3A1* rs1801184 в развитии первичной открытоугольной глаукомы// VI Российский общенациональный офтальмологический форум. – 2013. – Том 2. – С. 495-501.

16. Коновалов А.Н. Изучение термодинамических свойств коллагена I// Известия пензенского государственного педагогического университета им. В.Г. Белинского. – 2007. – №7. – С. 289-292.

17. Краснопольская И.В. Хирургическое лечение и профилактика пролапса гениталий после гистерэктомии: автореф. дис. канд. мед.наук. – М. – 2004. – 22 с.

18. Краснопольский В.И., Буянова С.Н., Щукина Н.А. и др. Хирургическое лечение больных с опущением и выпадением внутренних половых органов, и профилактика опущения купола влагалища после гистерэктомии// Российский вестник акушера-гинеколога. – 2006. – №6(4). – С. 66-71.

19. Кулакова В.И., Савельева В.И., Манухина И.Б. Гинекология: национальное руководство// Гэотар-медиа. –596 с.
20. Львов Д., Фаворова О.О., Фаворов А.В. Полигенный подход к исследованиям полигенных заболеваний// Acta naturae. – 2012. – ТОМ 4. – №3(14). – С. 62-75.
21. Макаров О.В., Камоева С.В., Голубева Д.В. Трансвагинальная система «Элевейт» (Elevate) в реконструктивной хирургии тазового дна после гистерэктомии// Медицинский альманах. – 2011. – №6(19). – С. 142-144.
22. Малхасян В.А., Абрамян К.Н. Эпидемиология, патогенез и факторы риска пролапса гениталий у женщин: обзор зарубежной литературы// Тихоокеанский медицинский журнал. – 2011. – №1. – С. 9-13.
23. Михальчук Н.С., Прудко А.Ю., Нечипоренко Н.А. Анатомическое и функциональное состояние мочевыводящих путей и почек у женщин с генитальным пролапсом// Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2012. – №4. – С. 46-49.
24. Нафтулович Р.А., Ящук А.Г., Масленников А.В., Алакаева Д.Р. Особенности семейного анамнеза у пациенток с опущением и выпадением органов малого таза// Рос. вестн. акуш.-гин. – 2013. – №1. – С. 30-36.
25. Оккельман И.А. Новые пути регуляции функциональной активности лизилоксидазы человека// Автореф. – Москва. – 2013. – 26 с.
26. Парахонский А.П. Роль меди в организме и значение ее дисбаланса// Естественно-гуманитарные исследования. – 2015. – №10(4). – С. 72-78.
27. Пересада О.А., Барсуков А.Н., Куликов А.А., Одинцова Н.А., Шереметьева Л.З. Проблема опущения тазовых органов у женщин: современные возможности профилактики в родах// Медицинские новости. – 2010. – №10 – С. 35-40.
28. Попов А.А. Хирургическое лечение осложненных и неосложненных форм пролапса гениталий // Материалы II Рос.форума «Мать и дитя». – М., 2000. – С. 271.

29. Радзинский В.Е., Ханзадян М.Л., Демура Т.А. Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы в патогенезе пролапса тазовых органов// Доктор.ру. – 2014. – №S1 (5). – С. 5-10.

30. Сухих Г.Т., Данилов А.Ю., Боташева Д.А. Роль иммуногистохимических и генетических факторов в уточнении этиологии и патогенеза пролапса гениталий у женщин// Российский Вестник Акушера-Гинеколога. – №2. – 2012. – С. 47-50.

31. Смольнова Т.Ю., Савельев С.В., Яковлева Н.И., Гришин В.Л., Барабанов В.М. Феномен генерализованной цитопатии у пациенток с опущением и выпадением внутренних половых органов – как фенотипическое проявление синдрома дисплазии соединительной ткани на тканевом уровне// Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2008. – № 2. – С. 44- 49.

32. Трифонова Е.А., Еремина Е.Р., Урнов Ф.Д., Степанов В.А. Генетическое разнообразие и структура неравновесия по сцеплению гена *MTHFR* в популяциях Северной Евразии// Acta naturae. – 2012. – Т.4. – №1(12). – С.55-71.

33. Фадеев А.С., Левачев С.М., Измайлова В.Н. Мономолекулярные слои коллагена// Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. – 1999. – Т.40. – №4. – С. 270-275.

34. Шелыгин Ю.А., Титов А.Ю., Шехтер А.Б., Мудров А.А., Бирюков О.М., Джанаев Ю.А., Войнов М.А. Характер морфологических и нейрофизиологических изменений у женщин с синдромом опущения промежности// РЖГГК. – 2014. – Т.24. – №1. – С.71-82.

35. Adjoussou SA, Bohoussou E, Bastide S, Letouzey V, Fatton B, de Taurac R Functional symptoms and associations of women with genital prolapse// Prog Urol. – 2014. – Vol.24. – №8. – P. 511-517.

36. Aigmueller T, Dungal A, Hinterholzer S, Geiss I, Riss P. An estimation of the frequency of surgery for posthysterectomy vault prolapse// Int Urogynecol J. – 2010. – Vol.21. – №3. – P. 299-302.

37. Alarab M, Kufaishi H, Lye S, Drutz H, Shynlova O. Expression of extracellular matrix-remodeling proteins is altered in vaginal tissue of premenopausal

women with severe pelvic organ prolapse// *Reprod Sci.* – 2014. – Vol.21. – №6. – P. 704-15.

38. Albig AR, Neil JR, Schiemann WP. Fibulins 3 and 5 antagonize tumor angiogenesis *in vivo*// *Cancer Res.* – 2006. – Vol.66(5). – P. 2621-9.

39. Allen-Brady K., Norton P.A., Farnham J.M., Teerlink C., Cannon-Albright L.A. Significant linkage evidence for a predisposition gene for pelvic floor disorders on chromosome 9q21// *Am J Hum Genet.* – 2009. – Vol.84. – №5. – P. 678-682.

40. Allen-Brady K, Cannon-Albright L, Farnham JM, Teerlink C, Vierhout ME, van Kempen LC, Kluivers KB, Norton PA. Identification of six loci associated with pelvic organ prolapse using genome-wide association analysis// *Obstet Gynecol.* – 2011. – Vol.118. – №6 – P. 1345-53.

41. Altman D, Forsman M, Falconer C, Lichtenstein P. Genetic influence on stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse// *Eur Urol.* – 2008. – Vol.54. – №4. – P. 918-22.

42. Auer-Grumbach M, Weger M, Fink-Puches R, Papić L et al. Fibulin-5 mutations link inherited neuropathies, age-related macular degeneration and hyperelastic skin// *Brain.* – 2011. – Vol.134(Pt 6). – P. 1839–1852.

43. Bai SW, Chung DJ, Yoon JM, Shin JS, Kim SK, Park KH. Roles of estrogen receptor, progesterone receptor, p53 and p21 in pathogenesis of pelvic organ prolapse// *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* – 2005. – Vol.16 – №6. – P. 492-6.

44. Barber M.D., Paraiso M.F., Ellerkmann R.M., et al. A multicenter randomized trial comparing the transobuturator tape with tension-free vaginal tape for the surgical treatment of stress urinary incontinence// *J. PelvicMed Surg.* – 2007. – Vol.13. – P. 228.

45. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps// *Bioinformatics.* – 2005. – № 21. – P. 263–265.

46. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing// *J Roy Stat Soc B Met.* – 1995. – Vol.57 (1). – P. 289–300.

47. Berger M.B., Morgan D.M., DeLancey J.O. Levator ani defect scores and pelvic organ prolapse: is there a threshold effect?// *Int Urogynecol J.* – 2014. – Vol.25. – №10. – P. 1375–1379.
48. Bernier F, Jenkins P. The role of vaginal estrogen in the treatment of urogenital dysfunction in postmenopausal women// *Urol Nurs.* – 1997. – Vol.17. – №3. – P. 92-5.
49. Braekken IH, Majida M, Ellström Engh M, Holme IM, Bø K. Pelvic floor function is independently associated with pelvic organ prolapse// *BJOG.* –2009. – Vol.116(13). – P. 1706–1714.
50. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB// *Genome Research.* –2012. – Vol.22. – №9. – P. 1790-1797.
51. Budatha M, Roshanravan S, Zheng Q, Weislander C, Chapman SL, Davis EC, Starcher B, Word RA, Yanagisawa H. Extracellular matrix proteases contribute to progression of pelvic organ prolapse in mice and humans// *J Clin Invest.* – 2011. – Vol.121. – P. 2048–2059.
52. Bump RC, Mattiasson A, Bø K., Brubaker LP, DeLancey JO, Klarskov P, Shull BL, Smith AR. The standardisation of terminology of female pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction// *Am J Obstet Gynecol.* – 1996. – Vol.175. –№1. – P. 10–17.
53. Carley M.E., Schaffer J. Urinary incontinence and pelvic organ prolapse in women with Marfan or Ehlers Danlos syndrome// *Am J Obstet Gynec.* – 2000. – Vol.182. – №5. – P. 1021—1023.
54. Cartwright R, Kirby AC, Tikkinen KA, Mangera A, Thiagamoorthy G, Rajan P, Pesonen JS, Ambrose C, Gonzalez-Maffe J, Bennett P, Palmer T, Walley A, Järvelin MR, Chapple C, Khullar V. Systematic review and meta-analysis of genetic association studies of urinary symptoms and prolapse in women// *Am J Obstet Gynecol.* – 2015. – Vol.212. – №2. – P. 199.e1–199.e24.

55. Celik O, Akhan SE, Hatipoglu E, Kadioglu P. Increased incidence of pelvic organ prolapse in women with acromegaly// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2014. – Vol.183. – P. 44-7.
56. Chambers JC, Zhang W, Sehmi J et al. Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma// *Nat Genet.* – 2011. – Vol.43 – №11. – P. 1131–1138.
57. Chen C, Hill LD, Schubert CM, Strauss JF 3rd, Matthews CA. Is laminin gamma-1 a candidate gene for advanced pelvic organ prolapse?// *Am J Obstet Gynecol.* – 2010. – Vol.202. – №5. – P. 505.e1-5.
58. Chen HY, Chung YW, Lin WY, Chen WC, Tsai FJ, Tsai CH. Estrogen receptor alpha polymorphism is associated with pelvic organ prolapse risk// *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* – 2008. – Vol.19. – №8. – P. 1159-63.
59. Chen HY, Wan L, Chung YW, Chen WC, Tsai FJ, Tsai CH. Estrogen receptor beta gene haplotype is associated with pelvic organ prolapse// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2008. – Vol.138. – P. 105-9.
60. Chen HY, Chung YW, Lin WY, Wang JC, Tsai FJ, Tsai CH. Collagen type 3 alpha 1 polymorphism and risk of pelvic organ prolapse// *Int J Gynaecol Obstet.* – 2008. – Vol.103. – №1. – P. 55-8.
61. Chen HY, Chung YW, Lin WY, Chen WC, Tsai FJ, Tsai CH. Progesterone receptor polymorphism is associated with pelvic organ prolapse risk// *Acta Obstet Gynecol Scand.* – 2009. – Vol.88. – №7. – P. 835-8.
62. Chen HY, Lin WY, Chen YH, Chen WC, Tsai FJ, Tsai CH. Matrix metalloproteinase-9 polymorphism and risk of pelvic organ prolapse in Taiwanese women// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2010. – Vol.149. – №2. – P. 222-4.
63. Chen HY, Lu Y, Qi Y, Bai WP, Liao QP. Relationship between the expressions of mitofusin-2 and procollagen in uterosacral ligament fibroblasts of postmenopausal patients with pelvic organ prolapse// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2014. – Vol.174. – P. 141-5.

64. Cheng Y, Cawley NX, Loh YP. Carboxypeptidase E/NF $\alpha$ 1: a new neurotrophic factor against oxidative stress-induced apoptotic cell death mediated by ERK and PI3-K/AKT pathways// *PLoS One*. – 2013. – Vol.8(8). – e71578.
65. Chiaffarino F, Chatenoud L, Dindelli M, et al. Reproductive factors, family history, occupation and risk of urogenital prolapse// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. –1999. – Vol.82(1). – P. 63–67.
66. Chou HT, Hung JS, Chen YT, Wu JY, Tsai FJ. Association between *COL3A1* collagen gene exon 31 polymorphism and risk of floppy mitral valve/mitral valve prolapse// *Int J Cardiol*. – 2004. – Vol.95. – P. 299–305.
67. Connell KA, Guess MK, Chen H, Andikyan V, Bercik R, Taylor HS. HOXA11 is critical for development and maintenance of uterosacral ligaments and deficient in pelvic prolapse// *J Clin Invest*. –2008. – Vol.118. – №3. – P. 1050-5.
68. Consonni SR, Werneck CC, Sobreira DR, Kühne F, Moraes SG, Alvares LE, Joazeiro PP. Elastic fiber assembly in the adult mouse pubic symphysis during pregnancy and postpartum// *Biol Reprod*. –2012. – Vol.86(5):151. – P. 1-10.
69. Da Silva Lara LA, da Silva AR, Rosa-E-Silva JC, Chaud F, Silva-de-Sá MF, Meireles E Silva AR, de Sá Rosa-E-Silva AC. Menopause leading to increased vaginal wall thickness in women with genital prolapse: impact on sexual response// *J Sex Med*. – 2009. – Vol.6. – №11. – P. 3097-110.
70. DeLancey JOL, Kane Low L, Miller JM, et al. Graphic integration of causal factors of pelvic floor disorders: an integrated life span model// *Am J Obstet Gynecol*. – 2008. – Vol.199. – P. 610.e1-610.e5.
71. Denny JC, Bastarache L, Ritchie MD, et al. Systematic comparison of phenome-wide association study of electronic medical record data and genome-wide association study data// *Nat Biotechnol*. – 2013. – Vol.31. – №12 – P. 1102-10.
72. Dietz HP, Simpson JM. Levator trauma is associated with pelvic organ prolapse// *BJOG*. – 2008. – Vol.115. – № 8. – P. 979–984.

73. Drewes PG, Yanagisawa H, Starcher B. et al. Pelvic organ prolapse in Fibulin-5 knockout mice: pregnancy changes in elastic fiber homeostasis in mouse vagina// *Am J Pathol.* –2007. – Vol.170. – №2. – P.578-589.
74. Dubowitch E, Cahn D, Ross C, Husain A, Harkaway R, Metro M, Ginsberg P. Procidencia as a cause of obstructive uropathy and acute kidney injury// *Curr Urol.* – 2014. – Vol.7. – №4. – P. 207-9.
75. Durnea CM, Khashan AS, Kenny LC, Durnea UA, Smyth MM, O'Reilly BA. Prevalence, etiology and risk factors of pelvic organ prolapse in premenopausal primiparous women// *Int Urogynecol J.* – 2014. –Vol.25 (11). – P. 1463-70.
76. Dviri M, Leron E, Dreihier J et al. Increased matrix metalloproteinases-1,-9 in the uterosacral ligaments and vaginal tissue from women with pelvic organ prolapse// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2011. –Vol.156. – P. 113–117.
77. Ellerkmann RM, Cundiff GW, Melick CF, Nihira MA, Leffler K, Bent AE. Correlation of symptoms with location and severity of pelvic organ prolapse// *Am J Obstet Gynecol.* – 2001. – Vol.185. – № 6. – P. 1332–37.
78. Eppig JT, Blake JA, Bult CJ, Kadin JA, Richardson JE. Mouse Genome Database Group. The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease// *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol.43 (Database issue). – D726–736.
79. Ferrell G., Lu M., Stoddard P. A single nucleotide polymorphism in the promoter of the LOXL1 gene and its relationship to pelvic organ prolapse and preterm premature rupture of membranes// *REPROD SCI.* – 2009. – Vol.16. –№5. – P. 438-446.
80. Fritel X, Varnoux N, Zins M, Breart G, Ringa V. Symptomatic pelvic organ prolapse at midlife, quality of life, and risk factors// *Obstet Gynecol.* – 2009. – Vol.113. – №3. – P. 609-16.
81. Giri A, Wu JM, Ward RM, Hartmann KE, Park AJ, North KE, Graff M, Wallace RB, Bareh G, Qi L, O'Sullivan MJ, Reiner AP, Edwards TL, Velez Edwards DR. Genetic Determinants of Pelvic Organ Prolapse among African American and

Hispanic Women in the Women's Health Initiative// PLoS One. –2015. – Vol.10. – №11. – e0141647.

82. Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, Qi H, Stock JL, Tkalcevic GT, Simmons HA, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke HZ, McNeish JD, Brown TA. Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass// J Biol Chem. – 2003. – Vol.278. – P.1998–2007.

83. Grigoriadis C, Hassiakos D, Bakas P, Tympa A, Panoulis C, Creatsas G, Kondi-Pafiti A, Liapis A. Effect of gonadal steroid receptors alterations on the pathophysiology of pelvic organ prolapse and urinary incontinence// Minerva Ginecol. – 2016. – Vol. 68(1). –P. 37-42.

84. Gurung G, Rana A, Magar DB. Utero-vaginal prolapse due to portio vaginal fibroma// J Obstet Gynaecol Res. – 2003. – Vol.29. – №3. – P. 157-9.

85. Gyhagen M1, Åkervall S, Milsom I. Clustering of pelvic floor disorders 20 years after one vaginal or one cesarean birth// Int Urogynecol J. – 2015. – Vol.26. – №8. – P. 1115-21.

86. Hamajima N. PCR–CTPP: a new genotyping technique in the era of genetic epidemiology// Expert Rev Mol Diagn. – 2001. – №1. – P.119–23.

87. Handa VL, Blomquist JL, Knoepp LR, Hoskey KA, McDermott KC, Muñoz A. Pelvic floor disorders 5–10 years after vaginal or cesarean childbirth// Obstet. Gynecol. –2011. – Vol.118. – P. 777–784.

88. Handa VL, Blomquist JL, McDermott KC, Friedman S, Muñoz A. Pelvic floor disorders after vaginal birth: effect of episiotomy, perineal laceration, and operative birth// Obstet. Gynecol. – 2012. – №119. – P. 233-239.

89. Hao Zhou, Xiang Qu, Zhan Gao, Gaoshu Zheng, Jie Lin, Lan Su, Zhouqing Huang, Haiying Li, Weijian Huang. Relaxin level in patients with atrial fibrillation and association with heart failure occurrence// Medicine (Baltimore). – 2016. – Vol. 95(21). – e3664.

90. Harris RL, Cundiff GW, Coates KW, Bump RC. Urinary incontinence and pelvic organ prolapse in nulliparous women// *Obstet Gynecol.* – 1998. – Vol.92. – P. 951–954.
91. He K, Niu G, Gao J, Liu JX, Qu H. MicroRNA-92 expression may be associated with reduced estrogen receptor  $\beta$ 1 mRNA levels in cervical portion of uterosacral ligaments in women with pelvic organ prolapse// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* –2016. – Vol. 198. – P. 94-99.
92. Hendrix SL, Clark A, Nygaard I, Aragaki A, Barnabei V, McTiernan A. Pelvic organ prolapse in the Women's Health Initiative: gravity and gravidity// *Am J Obstet Gynecol.* – 2002. – Vol.186. – P. 1160–66.
93. Hsu YH, Kiel DP. Clinical review: Genome-wide association studies of skeletal phenotypes: what we have learned and where we are headed// *J Clin Endocrinol Metab.* – 2012 – Vol.97. – E.1958–1977.
94. Isik H, Aynioğlu O, Sahbaz A, Selimoğlu R, Timur H, Harma M. Are hypertension and diabetes mellitus risk factors for pelvic organ prolapse?// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2016. – Vol.197. – P. 59-62.
95. Jack GS, Nikolova G, Vilain E, Raz S, Rodríguez LV. Familial transmission of genitovaginal prolapse// *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* – 2006. – Vol.17. – №5. – P. 498-501.
96. Jackson SR, Avery NC, Tarlton JF, Eckford SD, Abrams P, Bailey AJ. Changes in metabolism of collagen in genitourinary prolapse// *Lancet.* – 1996. – 347(9016). – P. 1658-61.
97. Ji QS, Qi B, Wen YC et al. The association of *LOXLI* polymorphisms with exfoliation syndrome/glaucoma: Meta-analysis// *Int J Ophthalmol.* – 2015. – Vol.8. – №1. – P. 148–156.
98. Jones RP, Ridley C, Jowitt TA, Wang MC, Howard M, Bobola N, Wang T, Bishop PN, Kielty CM, Baldock C, Lotery AJ, Trump D. Structural effects of fibulin 5 missense mutations associated with age-related macular degeneration and cutis laxa// *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2010. – Vol.51. – №5. – P. 2356-62.

99. Jørgensen S, Hein HO, Gyntelberg F. Heavy lifting at work and risk of genital prolapse and herniated lumbar disc in assistant nurses// *Occup Med (Lond)*. – 1994. – Vol.44(1). – P. 47-9.
100. Kaplan PB, Usta U, Inal HA, Tastekin E, Tokuc B. Neuromuscular morphometry of the uterine ligaments and vaginal wall in women with pelvic organ prolapse// *Neurourol Urodyn*. – 2011. – Vol.30. – №1. – P. 126-32.
101. Karam JA, Vazquez DV, Lin VK, Zimmern PE. Elastin expression and elastic fibre width in the anterior vaginal wall of postmenopausal women with and without prolapse// *BJU Int*. – 2007. – Vol.100. – №2. – P. 346-50.
102. Kerkhof M.H., Hendriks L., Brölmann H.A.M. Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse — a review of the current literature// *Int Urogynecol J*. – 2009. – Vol.20. – P. 461–474.
103. Kerns JM, Damaser MS, Kane JM, Sakamoto K, Benson JT, Shott S, Brubaker L. Effects of pudendal nerve injury in the female rat// *Neurourol Urodyn*. – 2000. – Vol.19. – №1. – P. 53-69.
104. Kim E.J., Chung N., Park S.H. et al. Involvement of oxidative stress and mitochondrial apoptosis in the pathogenesis of pelvic organ prolapse// *J Urol*. – 2013. – Vol.189. – №2. – P. 588–594.
105. Kim JY, Kim EJ, Jeon MJ, Kim R, Lee MW, Kim SW. Association between susceptibility to advanced pelvic organ prolapse and glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. – 2014. – Vol.175. – P. 205-8.
106. Kim JY, Kim EJ, Jeon MJ, Kim H, Moon YJ, Bai SW. Association between the poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene polymorphism and advanced pelvic organ prolapse// *Menopause*. – 2014. – Vol.21. – №2. – P. 177-81.
107. Kluivers KB, Dijkstra JR, Hendriks JC, Lince SL, Vierhout ME, van Kempen LC. *COL3A1* 2209G>A is a predictor of pelvic organ prolapse// *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. – 2009. – Vol.20. – №9. – P. 1113-8.

108. Klutke J, Ji Q, Campeau J, Starcher B, Carlos Felix J, Stanczyk FZ, Klutke C. Decreased endopelvic fascia elastin content in uterine prolapse// *Acta Obstetricia et Gynecologica*. – 2008. – Vol.87. – P. 111-115.
109. Kudish BI, Iglesia CB, Gutman RE, Sokol AI, Rodgers AK, Gass M. Risk factors for prolapse development in white, black, and Hispanic women// *Female Pelvic Med. Reconstr. Surg.* – 2011. – Vol.17. – №2. – P. 80–90.
110. Kurt S, Toz E, Canda MT, Sahin C, Tasyurt A. Can striae be used as a marker for the prediction of pelvic organ prolapse?// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2014. – Vol.180. – P. 116-9.
111. Lammers K, Lince SL, Spath MA, van Kempen LC, Hendriks JC, Vierhout ME, Kluivers KB Pelvic organ prolapse and collagen-associated disorders// *Int Urogynecol J.* – 2012. – Vol.23. – P. 313–319.
112. Lee SW, Cho HH, Kim MR, You YO, Kim SY, Hwang YB, Kim JH. Association between pelvic organ prolapse and bone mineral density in postmenopausal women// *J Obstet Gynaecol.* – 2015. – Vol.35. – №5. – P. 476-80.
113. Leijonhufvud Å, Lundholm C, Cnattingius S, Granath F, Andolf E, Altman D. Risk of surgically managed pelvic floor dysfunction in relation to age at first delivery// *Am J Obstet Gynecol.* – 2012. – Vol.207. – №4 – P. 303.e1-7.
114. Liang CC, Huang HY, Tseng LH et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3) in women with uterine prolapse but without urinary incontinence// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2010. – Vol.153. – P. 94–98.
115. Lim VF, Khoo JK, Wong V, Moore KH. Recent studies of genetic dysfunction in pelvic organ prolapse: the role of collagen defects// *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* – 2014. – Vol.54. – №3. – P. 198-205.
116. Lince SL, van Kempen LC, Vierhout ME, Kluivers KB. A systematic review of clinical studies on hereditary factors in pelvic organ prolapse// *Int Urogynecol J.* – 2012. – Vol.23. – №10. – P.1327-36.

117. Lince SL, van Kempen LC, Dijkstra JR, IntHout J, Vierhout ME, Kluijvers KB. Collagen type III alpha 1 polymorphism (rs1800255, *COL3A1* 2209 G>A) assessed with high-resolution melting analysis is not associated with pelvic organ prolapse in the Dutch population// *Int Urogynecol J.* – 2014. – Vol.25. – №9. – P.1237-42.
118. Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, Yanagisawa H, Zuo J, Li T. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein// *Nat Genet.* –2004. – Vol.36 (2). – P. 178-82.
119. Liu X, Zhao Y, Pawlyk B, Damaser M, Li T. Failure of elastic fiber homeostasis leads to pelvic floor disorders// *Am J Pathol.* – 2006. – Vol.168. – №2. – P.519–28.
120. Lonnée-Hoffmann RA1, Salvesen Ø, Mørkved S, Schei B. Self-reported pelvic organ prolapse surgery, prevalence, and nonobstetric risk factors: findings from the Nord Trøndelag Health Study// *Int Urogynecol J.* – 2015. – Vol.26. – №3. – P. 407-14.
121. Lowder JL, Frankman EA, Ghetti C, Burrows LJ, Krohn MA, Moalli P, Zyczynski H. Lower urinary tract symptoms in women with pelvic organ prolapse// *Int Urogynecol J.* –2010. – Vol.21. – № 6. – P. 665-72.
122. Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart TL, Grant SF, Robins SP, Aspden RM, Ralston SH. A *COL1A1* Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality// *J Clin Invest.* – 2001. – Vol.107. – №7. – P. 899-907.
123. Mant J, Painter R, Vessey M. Epidemiology of genital prolapse: observations from the Oxford Family Planning Association Study// *Br. J. Obstet. Gynaecol.* – 1997. – №104. – P. 579–585.
124. McLaughlin PJ, Bakall B, Choi J et al. Lack of fibulin-3 causes early aging and herniation, but not macular degeneration in mice// *Hum Mol Genet.* – 2007. – Vol.16. – №24. – P.3059–3070.

125. McLennan MT, Harris JK, Kariuki B, Meyer S. Family history as a risk factor for pelvic organ prolapse// *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* – 2008. – Vol.19(8). – P. 1063–1069.
126. Memon HU, Handa VL. Vaginal childbirth and pelvic floor disorders// *Womens Health (Lond Engl).* – 2013. – Vol.9. – №3. – P. 265-277.
127. Miedel A, Tegerstedt G, Maehle-Schmidt M, Nyrén O, Hammarström M. Nonobstetric risk factors for symptomatic pelvic organ prolapse// *Obstet Gynecol.* – 2009. – Vol.113(5). – P. 1089–1097.
128. Miranne JM, Marek T, Mete M, Iglesia CB. The Association of Vaginal Wind and Abdominal Striae with Pelvic Organ Prolapse// *J Minim Invasive Gynecol* 21. – 2014. – S19.
129. Mothes AR, Radosa MP, Altendorf-Hofmann A, Runnebaum IB. Risk index for pelvic organ prolapse based on established individual risk factors// *Arch Gynecol Obstet.* – 2016. – Vol.293. – № 3. – P. 617-24.
130. Nakamura T., Ruiz-Lozano P., Lindner V. et al.. DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries// *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 22476–22483.
131. Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y et al. Fibulin-5/ DANCE is essential for elastogenesis in vivo// *Nature.* – 2002. – Vol.10; 415(6868). – P. 171-5.
132. Mäki J.M. Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions// *Histol Histopathol.* – 2009. – Vol.24. – P. 651-660.
133. Nam D, Kim J, Kim SY, Kim S. GSA-SNP: a general approach for gene set analysis of polymorphisms// *Nucleic Acids Res.* – 2010. – Vol.38 (Web Server issue). – W749–754.
134. Nikolova G, Lee H, Berkovitz S, Nelson S, Sinsheimer J, Vilain E, Rodríguez LV. Sequence variant in the laminin gamma1 (*LAMC1*) gene associated with familial pelvic organ prolapse// *Hum Genet.* –2007. – Vol. 120(6). – P. 847-56.
135. Northington GM. Fibulin-5: two for the price of one maintaining pelvic support// *J Clin Invest.* – 2011. – Vol.121. – №5. – P.2048-59.

136. Norton PA, Allen-Brady K, Cannon-Albright LA. The familiarity of pelvic organ prolapse in the Utah population database// *Int Urogynecol J.* – 2013. – Vol.24. – P. 413–418.

137. Nygaard I, Barber M.D., Burgio K.L. et al. Prevalence of symptomatic pelvic floor disorders in US women // *JAMA.* – 2008. – Vol.300. – №11. – P. 1311–1316.

138. Ozbek E, Polat EC, Ozcan L, Otunctemur A, Emrence Z, Ustek D. TT polymorphism in rs2165241 and rs1048661 region in lysyl oxidase like-1 gene may have a role in stress urinary incontinence physiopathology// *J Obstet Gynaecol Res.* – 2013. – Vol.39. – P. 237–42.

139. Pal L, Hailpern SM, Santoro NF, Freeman R, Barad D, Kipersztok S, Barnabei VM, Wassertheil-Smoller S. Association of pelvic organ prolapse and fractures in postmenopausal women: analysis of baseline data from the Women's Health Initiative Estrogen Plus Progestin trial// *Menopause.* – 2008 – Vol.15. – P.59–66.

140. Paladini D, Di Spiezio Sardo A, Mandato VD, Guerra G, Bifulco G, Mauriello S, Nappi C. Association of cutis laxa and genital prolapse: a case report// *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* – 2007. – Vol.18. – №11. – P. 1367-70.

141. Pass HI, Levin SM, Harbut MR et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma// *N Engl J Med.* – 2012. –Vol.367. – №15. – P.1417–1427.

142. Press MF, Nousek-Goebel NA, Bur M, Greene GL. Estrogen receptor localization in the female genital tract// *Am J Pathol.* – 1986. – Vol.123. – №2. – P. 280-92.

143. Progetto Menopausa Italia Study Group. Risk factors for genital prolapse in non-hysterectomized women around menopause: Results from a large cross-sectional study in menopausal clinics in Italy// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2000. – Vol.93. –P. 135–140.

144. Quiroz LH, Muñoz A, Shippey SH, Gutman RE, Handa VL. Vaginal parity and pelvic organ prolapse// *J. Reprod. Med.* – 2010. – Vol.55. – P. 93–98.

145. R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL <http://www.R-project.org/>.
146. Rahn DD, Acevedo JF, Roshanravan S, Keller PW, Davis EC, Marmorstein LY, Word RA. Failure of pelvic organ support in mice deficient in fibulin-3// *Am J Pathol.* – 2009. – Vol.174. – №1. – P. 206–215.
147. Rahn DD, Ward RM, Sanses TV, Carberry C, Mamik MM, Meriwether KV, Olivera CK, Abed H, Balk EM, Murphy M; Society of Gynecologic Surgeons Systematic Review Group. Vaginal estrogen use in postmenopausal women with pelvic floor disorders: systematic review and practice guidelines// *Int Urogynecol J.* – 2015. – Vol.26. – №1. – P. 3-13.
148. Rao S, Lang J, Zhu L, Chen J. Exome Sequencing Identifies a Novel Gene, WNK1, for Susceptibility to Pelvic Organ Prolapse (POP)// *PLoS One.* – 2015. – Vol.10(3). – e0119482.
149. Richardson JE, Bult CJ. Visual annotation display (VLAD): a tool for finding functional themes in lists of genes// *Mamm Genome.* – 2015. – Vol.26. – P. 567–573.
150. Rinne KM, Kirkinen PP. What predisposes young women to genital prolapse?// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 1999. – Vol. 84(1). – P. 23-25.
151. Rodrigues AM, Oliveira LM, Martins Kde F, et al. Risk factors for genital prolapse in a Brazilian population// *Rev Bras Ginecol Obstet.* – 2009. – Vol. 31(1). – P. 17–21.
152. Rortveit G., Brown J.S., Thom D.H. et al. Symptomatic pelvic organ prolapse: prevalence and risk factors in a population-based, racially diverse cohort// *Obstet. Gynecol.* – 2007. – Vol.109. – №6. – P. 1396–1403.
153. Sajan F, Fikree FF. Does early age at marriage influence gynaecological morbidities among Pakistani women?// *J Biosoc Sci.* – 2002. – Vol.34. – P. 407–417.

154. Salter SA, Batra RS, Rohrer TE, Kohli N, Kimball AB. Striae and pelvic relaxation: two disorders of connective tissue with a strong association// *J Invest Dermatol.* – 2006. – Vol.126. – P. 1745–1748.

155. Scherf C, Morison L, Fiander A, Ekpo G, Walraven G. Epidemiology of pelvic organ prolapse in rural Gambia, West Africa// *BJOG.* – 2002. – Vol.109. – №4. – P. 431-436.

156. Schott I, Reisenauer C, Busch C. Presence of relaxin-2, oxytocin and their receptors in uterosacral ligaments of pre-menopausal patients with and without pelvic organ prolapse// *Acta Obstet Gynecol Scand.* –2014. –Vol. 93(10). – P. 991-6.

157. Shi Z, Zhang T, Zhang L, Zhao J, Gong J, Zhao C. Increased microRNA-221/222 and decreased estrogen receptor  $\alpha$  in the cervical portion of the uterosacral ligaments from women with pelvic organ prolapse// *Int Urogynecol J.* – 2012. – Vol. 23(7). – P. 929-34.

158. Segev Y, Auslender R, Feiner B, Lissak A, Lavie O, Abramov Y. Are women with pelvic organ prolapse at a higher risk of developing hernias?// *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* –2009. – Vol.20 (12). – P. 1451-3.

159. Sewell CA, Chang E, Sultana CJ. Prevalence of genital prolapse in 3 ethnic groups// *J Reprod Med.* – 2007. – Vol.52. – №9. – P. 769-73.

160. Shahryarinejad A, Gardner TR, Cline JM, Levine WN, Bunting HA, Brodman MD, Ascher-Walsh CJ, Scotti RJ, Vardy MD. Effect of hormone replacement and selective estrogen receptor modulators (SERMs) on the biomechanics and biochemistry of pelvic support ligaments in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)// *Am J Obstet Gynecol.* – 2010. – Vol.202. – №5. – P. 485.e1-9.

161. Shapiro S. Looking to the 21st century: have we learned from our mistakes, or are we doomed to compound them?// *Pharmacoepidemiology and Drug Safety.* – 2004. – Vol.13. – №4. – P. 257–265.

162. Sharma S, Walia I, Singh A. A case control study on uterine prolapse in a Chandigarh slum// *Bull Postgrad Inst Med Educ Res Chandigarh.* –2003. – Vol.37. – P. 143–148.

163. Skorupski P, Jankiewicz K, Miotła P, Marczak M, Kulik-Rechberger B, Rechberger T. The polymorphisms of the MMP-1 and the MMP-3 genes and the risk of pelvic organ prolapse// *Int Urogynecol J.* –2013. – Vol.24. – №6. – P. 1033-8.
164. Slieker-ten Hove MC, Pool-Goudzwaard AL, Eijkemans MJ, Steegers-Theunissen RP, Burger CW, Vierhout ME. Symptomatic pelvic organ prolapse and possible risk factors in a general population// *Am J Obstet Gynecol.* –2009. – Vol.200(2). – P. 184 e1–7.
165. Stępień-Słodkowska M, Ficek K, Maciejewska-Karłowska A, Sawczuk M, Ziętek P, Król P, Zmijewski P, Pokrywka A, Ciężczyk P. Overrepresentation of the COL3A1 AA genotype in Polish skiers with anterior cruciate ligament injury// *Biol Sport.* – 2015. – Vol.32. – № 2. – P. 143–147.
166. Subramanian D., Szwarzensztejn K., Mauskopf J.A., Slack M.C. Rate, type, and cost of pelvic organ prolapse surgery in Germany, France, and England// *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2009. – Vol.144. – P.177–181.
167. Swift S, Woodman P, O'Boyle A, Kahn M, Valley M, Bland D, Wang W, Schaffer J. Pelvic Organ Support Study (POSST): the distribution, clinical definition, and epidemiologic condition of pelvic organ support defects// *Am J Obstet Gynecol.* – 2005. – Vol.192. – № 3. – P. 795–806.
168. Takacs P, Nassiri M, Candiotti K, Yang J, Yavagal S, Medina CA. Differential expression of fibulins in the uterosacral ligaments of women with uterine prolapse// *Arch Gynecol Obstet.* – 2010. – Vol.282. – №4. – P.389–394.
169. Tang W, Schwienbacher C, Lopez LM, et al. Genetic associations for activated partial thromboplastin time and prothrombin time, their gene expression profiles, and risk of coronary artery disease// *Am J Hum Genet.* – 2012. – Vol.91. – №1. – P. 152-162.
170. Tang J.C., Xie A.Y., Cai X.J. Разнообразие функций фибулина-5 в опухолях// *Молекулярная Биология.* – 2014. – Т.48. – № 6. – С. 875–880.

171. Tegerstedt G, Maehle-Schmidt M, Nyrén O, Hammarström M. Prevalence of symptomatic pelvic organ prolapse in a Swedish population// *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* – 2005. – Vol.16 – №6. – P. 497-503.
172. Teramoto S, Narushima M, Kojima I, Takagi Y, Shimoji T. Study on the treatment of pelvic organ prolapse complicated with uterine myoma// *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi.* – 2014. – Vol.105. – №4. – P. 183-9.
173. Thomas D.C., Casey G., Conti D.V., Haile R.W., Lewinger J.P., Stram D.O. Methodological issues in multistage genomewide association studies// *Statistical Science.* – 2009. – Vol.24. – №4. – P. 414–429.
174. Tinelli A, Malvasi A, Rahimi S, Negro R, Vergara D, Martignago R, Pellegrino M, Cavallotti C. Age-related pelvic floor modifications and prolapse risk factors in postmenopausal women// *Menopause.* – 2010. – Vol.17. – №1. – P.204-12.
175. Trutnovsky G, Guzman-Rojas R, Martin A, Dietz HP. Pelvic floor dysfunction-does menopause duration matter?// *Maturitas.* – 2013. – Vol.76. – №2. – P. 134-8.
176. Töz E, Kurt S, Canda MT, Şahin Ç, Uyar I. Comparison of frequency of asymptomatic microhematuria in patients with stage 2-4 versus stage 0-1 pelvic organ prolapse// *Pak J Med Sci.* – 2015. – Vol.31. – №3. – P. 654-7.
177. Van Es MA, Van Vught PW, Blauw HM, et al. Genetic variation in DPP6 is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis// *Nat Genet.* – 2008. – Vol.40. – №1. – P. 29-31.
178. Varinder S, Alg, Reecha Sofat, Henry Houlden, and David J. Werring. Genetic risk factors for intracranial aneurysms. A meta-analysis in more than 116,000 individuals// *Neurology.* – 2013. – Vol.80. – №23. – P. 2154–2165.
179. Veit-Rubin N, Cartwright R, Singh AU, Digesu GA, Fernando R, Khullar V. Association between joint hypermobility and pelvic organ prolapse in women: a systematic review and meta-analysis// *Int Urogynecol J.* – 2015. – [Epub ahead of print].

180. Venkataraman L, Lenis AT, Couri BM. Induced Regenerative Elastic Matrix Repair in *LOXLI* Knockout Mouse Cell Cultures: Towards Potential Therapy for Pelvic Organ Prolapse// *J Tissue Sci Eng.* – 2012. – Vol.3. – Issue3.
181. Vergeldt TF, Weemhoff M, IntHout J, Kluivers KB. Risk factors for pelvic organ prolapse and its recurrence: a systematic review// *Int Urogynecol J.* – 2015. – Vol.26. – №11. – P. 1559-73.
182. von Theobald P, Zimmerman CW, Davila GW. New Techniques in Genital Prolapse Surgery// Springer . – 2011. – ISBN: 1848821352. – 325 p.
183. Wagenseil JE, Mecham RP. New insights into elastic fiber assembly// *Birth Defects Res C Embryo Today.* – 2007. – Vol.81. – №4. – P. 229-40.
184. Walker G.J., Gunasekera P. Pelvic organ prolapse and incontinence in developing countries: review of prevalence and risk factors// *Int Urogynecol J.* – 2011. – Vol.22. – №2. – P. 127–135.
185. Wang M., Brekken R.A.. FBLN5 (fibulin 5)// *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* – 2013. – Vol. 17(12). – P. 811-815.
186. Wang X, Li Y, Chen J, Guo X, Guan H, Li C. Differential expression profiling of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in females with or without pelvic organ prolapse// *Mol Med Rep.* – 2014. – Vol.10. – №4. – P. 2004-8.
187. Wang Z, Shi HH, Chen G, Zhu L. Role of canonical Wnt signaling transduction pathway in the pathogenesis of pelvic organ prolapse// *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2012. – Vol.92 (24). – P. 1669-73.
188. Ward RM, Velez Edwards DR, Edwards T, Giri A, Jerome RN, Wu JM. Genetic epidemiology of pelvic organ prolapse: a systematic review// *Am J Obstet Gynecol.* – 2014. – Vol.211. – №4. – P. 326-35.
189. Weber AM, Richter HE. Pelvic organ prolapse// *Obstet Gynecol.* –2005. – Vol.106. – №3. – P. 615-34.

190. Whitcomb EL, Rortveit G, Brown JS, Creasman JM, Thom DH, Van Den Eeden SK, Subak LL. Racial differences in pelvic organ prolapse// *Obstet Gynecol.* – 2009. – Vol.114. – №6. – P. 1271-7.

191. Wieslander CK, Rahn DD, McIntire DD, Acevedo JF, Drewes PG, Yanagisawa H, Word RA. Quantification of Pelvic Organ Prolapse in Mice: Vaginal Protease Activity Precedes Increased MOPQ Scores in Fibulin 5 Knockout Mice// *Biol Reprod.* – 2009. – Vol.80 (3). – P. 407–414.

192. Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S. et al. Discovery and Refinement of Loci Associated with Lipid Levels// *Nat Genet.* – 2013. – Vol.45. – №11. – P. 1274-83.

193. Woodman PJ, Swift SE, O'Boyle AL, et al. Prevalence of severe pelvic organ prolapse in relation to job description and socioeconomic status: a multicenter cross-sectional study// *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* – 2006. – Vol.17. – №4. – P. 340–345.

194. Word RA, Pathi S, Schaffer JJ. Pathophysiology of pelvic organ prolapse// *Obstet Gynecol Clin North Am.* –2009. – Vol.36. – №3. – P. 521-39.

195. Wu JM, Visco AG, Grass EA, Craig DM, Fulton RG, Haynes C, Weidner AC, Shah SH. Matrix metalloproteinase-9 genetic polymorphisms and the risk for advanced pelvic organ prolapse// *Obstet Gynecol.* – 2012. – Vol.120. – №3. – P. 587-93.

196. Wu JM, Visco AG, Grass EA, Craig DM, Fulton RG, Haynes C, Amundsen CL, Shah SH. Comprehensive analysis of LAMC1 genetic variants in advanced pelvic organ prolapse// *Am J Obstet Gynecol.* – 2012. – Vol. 206(5). –P. 447.e1-6.

197. Xie C, Mao X, Huang J, Ding Y, Wu J, Dong S, Kong L, Gao G, Li CY, Wei L. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases// *Nucleic Acids Res.* – 2011. – Vol.39 (Web Server issue). – W316–322.

198. Xu S, Yang Y, Sun YB et al. Role of fibulin-3 in lung cancer: In vivo and in vitro analyses// *Oncol Rep.* –2014. – Vol.31– №1. – P.79-86.

199. Yamamoto K, Yamamoto M, Akazawa K, Tajima S, Wakimoto H, Aoyagi M. Decrease in elastin gene expression and protein synthesis in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapsus uteri// *Cell Biol Int.* – 1997. – Vol.21. – P. 605–11.
200. Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC et al. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo// *Nature.* – 2002. –Vol. 415(6868). – P. 168-71
201. Zhang Y., Marmorstein LY. Focus on molecules: fibulin-3 (EFEMP1)// *Exp Eye Res.* – 2010. – Vol.90. – P.374–375.
202. Zhang T, Xie X, Cao G et al. Malattia leventinese/Doyne honeycomb retinal dystrophy in a Chinese family with mutation of the *EFEMP1* gene// *Retina.* – 2014. – Vol.34 – №12. – P. 2462-71.
203. Zhao BH, Zhou JH. Decreased expression of elastin, fibulin-5 and lysyl oxidase-like 1 in the uterosacral ligaments of postmenopausal women with pelvic organ prolapse// *J Obstet Gynaecol Res.* – 2012. – Vol.38. – P. 925-31.
204. Zhong Z, Zylstra-Diegel CR, Schumacher CA, Baker JJ, Carpenter AC, Rao S, Yao W, Guan M, Helms JA, Lane NE, Lang RA, Williams BO. Wntless functions in mature osteoblasts to regulate bone mass// *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2012. – Vol.109. – E.2197–2204.
205. Zhou Y, Ling O, Bo L. Expression and significance of lysyl oxidase-like 1 and fibulin-5 in the cardinal ligament tissue of patients with pelvic floor dysfunction// *J Biomed Res.* – 2013. – Vol.27. – P. 23-8.
206. Zhou Y-H. EFEMP1 (EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1)// *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* – 2013. – Vol.17(2). – P. 115-120.

### Интернет-ресурсы

1. <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>
2. <http://www.genecards.org/>
3. <http://www.mousemine.org/>

4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
5. <http://www.regulomedb.org/>
6. <http://www.scandb.org/newinterface/about.html>
7. <http://oftalmic.ru>
8. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
9. <http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/hugenavigator.htm>
10. <https://phewas.mc.vanderbilt.edu>
11. <http://primer3.ut.ee/>
12. <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
13. <http://tinyurl.com/snpexp>
14. <http://www.biochemmach.ru>
15. <http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>

## Приложение 1

### Опросник PFIQ-7 (Pelvic Floor Impact Questionnaire)

Некоторые женщины считают, что симптомы, связанные с мочевым пузырем, кишечником или вагинальные симптомы нарушают их повседневную жизнь, взаимоотношения и чувства. В каждом вопросе поставьте «X» напротив наиболее подходящего ответа, описывающего указанные симптомы в течение последних 3 месяцев. Пожалуйста, убедитесь, что вы поставили отметки во всех 3 колонках напротив каждого вопроса.

#### Перечень вопросов для вопросника PFIQ-7 (Pelvic Floor Impact Questionnaire).

Как часто симптомы связанные с указанными органами, > влияют на Вашу (Ваше): ↓	Мочевой пузырь или моча	Кишечник или прямая кишка	Выпадение матки или провисание дна таза
1. Способность выполнять домашнюю работу (готовить пищу, убирать дом, стирать)?	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто
2. Способность ходить, плавать или выполнять физические упражнения?	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто
3. Способность посещать кинотеатры, концерты?	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто
4. Способность ездить на машине, автобусе более 30 мин	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто
5. Участие в общественных мероприятиях	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто
6. Эмоциональное благополучие (нервозность, депрессия и т.д.)?	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто
7. Ощущение неудовлетворенности?	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто	<input type="checkbox"/> Никогда <input type="checkbox"/> Редко <input type="checkbox"/> Часто <input type="checkbox"/> Очень часто

Подсчет PFIQ-7.

Все вопросы соответствуют следующей бальной шкале: Никогда-0; Редко-1; Часто-2; Очень часто-3

Шкалы вопросов:

**Urinary Impact Questionnaire (UIQ-7):** сумма баллов по 7 вопросам в колонке «Мочевой пузырь или моча».

**Colorectal-Anal Impact Questionnaire (CRADI-7):** сумма баллов по 7 вопросам в колонке «Кишечник или прямая кишка».

**Pelvic Organ Prolapse Impact Questionnaire (POPIQ-7):** сумма баллов по 7 вопросам в колонке «выпадение матки или провисание дна таза».

Подсчет баллов: Необходимо подсчитать среднее арифметическое по вопросам соответствующих шкал (разброс значений от 0 до 3), затем умножить это число на 100 и разделить на 3, чтобы получить значение от 0 до 100.

Отсутствующие ответы расцениваются как среднее арифметическое для данного вопросника.

Суммарное значение PFIQ-7: - сложите значения 3х вопросников (разброс показателей составляет 0-300 баллов).

### **Вопросник PFDI-20 (Pelvic Floor Distress Inventory).**

Инструкции:

Пожалуйста, ответьте на все вопросы следующего исследования. Вам следует ответить на вопросы имеете ли вы определенные симптомы, связанные с прямой кишкой, мочевым пузырем или тазом, и если да, то насколько это вас беспокоит. Поставьте «X» в подходящую клетку. Если Вы не уверены относительно того, как отвечать на вопрос, дайте наиболее подходящий, по Вашему мнению, ответ. Отвечая на вопросы, опишите Ваши симптомы в течение последних 3 месяцев.

Вопросник PFDI-20 состоит из 3-х разделов и 20 вопросов:

Все вопросы составлены в формате с вариантами ответов от 0 до 4.

**Перечень вопросов для вопросника PFDI-20 (Pelvic Floor Distress Inventory).**

Вопрос: \_\_\_\_\_?

нет  да

Если да, то на сколько это вас беспокоит?

1. Никогда  2. Редко  3. Часто  4. Очень часто

Перечень вопросов:

Pelvic Organ Prolapse Distress Inventory 6 (POPDI-6) с 1 по 6 вопросы.

1. Вы обычно испытываете чувство давления в нижних отделах живота?
2. Вы обычно испытываете тяжесть в области таза?
3. У Вас выпадает что-то из влагалища, что Вы можете почувствовать или увидеть?
4. Необходимо ли Вам вправить влагалище или часть прямой кишки для полного опорожнения кишечника?
5. Вы обычно испытываете чувство неполного опорожнения мочевого пузыря?
6. Вам когда-нибудь требовалось вправлять влагалище для начала мочеиспускания или полного опорожнения мочевого пузыря?

**Colorectal-Anal Distress Inventory 8 (CARDI-8) с 7 по 14 вопросы.**

7. Вы чувствуете необходимость сильного натуживания для опорожнения кишечника?
8. У Вас бывает чувство неполного опорожнения кишечника после дефекации?
9. У Вас бывают эпизоды недержания кала при хорошо оформленном стуле?
10. У Вас бывают эпизоды недержания кала при жидком стуле?
11. У Вас бывают эпизоды недержания газов?
12. Испытываете ли Вы боль при дефекации?

13. Испытываете ли Вы нестерпимо сильные позывы к дефекации?  
 14. Выпадала ли когда-нибудь у Вас часть прямой кишки через анальное отверстие?

**Urinary Distress Inventory (UDI-6)** с 15 по 20 вопросы.

15. Бывают ли у Вас учащенное мочеиспускание?  
 16. Бывает ли у Вас недержание мочи вследствие сильного позыва к мочеиспусканию? 17. Бывает ли у Вас недержание мочи при кашле, чихании, или смехе?  
 18. Теряете ли вы мочу в незначительных количествах (по каплям)?  
 19. Испытываете ли Вы затруднение опорожнения мочевого пузыря?  
 20. Испытываете ли Вы боль или дискомфорт в нижних отделах живота или области половых органов?

На каждый вопрос предлагалось ответить следующим образом: Нет (0 баллов), если да, то как часто это Вас беспокоит? Никогда (1 балл), редко (2 балла), часто (3 балла), всегда (4 балла). Таким образом, за каждый вопрос начислялось от 0 до 4 баллов.

Подсчет: вычисляется среднее арифметическое в каждой группе вопросов (разброс от 0 до 4), значение умножается на 25, при этом разброс показателей составляет 0-100 баллов. Отсутствующие ответы расцениваются как среднее арифметическое для данного вопросника.

Суммарный показатель PFDI-20: Для подсчета вопросника PFDI-20 необходимо сложить 3 шкалы вместе (разброс показателей составляет 0-300 баллов).

При развитии мочевого дисфункции (включая и обструктивное мочеиспускание) пациентки заполняли дневник мочеиспускания (Приложение 1) в течение 3 - 5 дней.

**Приложение 2**  
**Праймеры и условия амплификации**

Ген или участок хромосомы	SNP	Праймеры 5'-3' F (внешний прямой), R (внешний обратный), F (внутренний, в скобках указан аллельный вариант), R (внутренний, в скобках указан аллельный вариант)	Режим	Длины фрагментов (п.н.)
<i>FBLN5</i>	rs2430339	F catcccaacctgtctcctg R taaaccagtggccttcaacc F(a) cattctcaactctggctaca R(g) ggattttgaaaacttgactac	94 °C (30s) 61 °C (25s) 72 °C (25s) 32 ×	370  170 241
	rs929608	F ggtactgcgacacatatatccgcagtc R catggtcataaatgctttccatcctgt F(c) aggcctgcatggc R(t) gctgcagggcca	94 °C (30s) 66.2 °C (30s) 72 °C (30 s) 14 × 94 °C (30s) 52.5 °C (30s) 72 °C (30 s) 16 ×	460  273 211
	rs12586948	F atactccacctggacaacg R tggttctgcccagactagc F(a) tactgagccagaatctgta R(g)cctgtggattgtgtaagcc	94 °C (30s) 63.8 °C (25s) 72 °C (25s) 32 ×	395  235 198
	rs2284337	F gggtagcattccaagctct R actccacacacagcatcagc F(g) ctatttctggaatactttctattg R(a) cacagaaaaagtctaaccagttat	94 °C (30s) 65 °C (30s) 72 °C (30 s) 16 × 94 °C (30s) 63.2 °C (30s) 72 °C (30s) 16 ×	482  377 155
	rs2430347	F catgacgtaggtagtaggccaggt R ttccagacatcaacgaatgtgagc F(a) gcggatgggggtca R(g) gggctcaaatgcatc	94 °C (30s) 63 °C (30s) 72 °C (30s) 15 × 94 °C (30s) 52.9 °C (30s) 72 °C (30s) 19 ×	261  101 188
	rs2498841	F ccccaaacactctggactt R ctccatcacctgttatcctg F(t) ggccaactgtcctccatgt R(g) aggtgtgcatcatggagac	94 °C (30s) 64.8 °C (30s) 72 °C (30s) 16 × 94 °C (30s) 62.2 °C (30s) 72 °C (30s) 16 ×	295  114 220

	rs2018736	F acgaccccagagtagcagaa R gactcctgagcagaggcatt F(c) tgccctttctcagccac R(a) gctgggtgctcatagagggt	94 °C (30s) 61 °C (30s) 72 °C (30s) 32 ×	542 193 384
	rs12589592	F gcctggccagctttgtaat R tggaagggtccggactagaa F(a) gcacagaattggctctcaa R(g)atgaagctattgctagtcttgac	94 °C (30s) 61.3 °C (30s) 72 °C (30s) 31×	323 160 204
	rs2430369	F caaggcagcctgagtaggac R aatggggttttgccatgtt F(t) acatgctggtcagt R(c) ttgcttgtagtttagg	94 °C (30s) 60 °C (30s) 72 °C (30s) 14 × 94 °C (30s) 50.3 °C (20s) 72 °C (23s) 16 ×	435 190 274
	rs2245701	F atgggcacagctacttttgg R ggggtcgcctcagatgtcttt F(a) tccaaatttctctgtggca R(g) gtaaacagggataacagtatcaacc	94 °C (30s) 61.3 °C (25s) 72 °C (25s) 30 ×	541 195 388
	rs2474028	F tgggtacggacctgagtagg R ctcttaaaggccccaccact F(t) gcactctcaaacacctagggt R(c) gcgatgagtaggaccg	94 °C (30s) 62 °C (18s) 72 °C (18s) 30 ×	479 230 280
	rs2284338	F cagtcccctgggtagcatt R cagtcccctgggtagcatt F(a) aagcatacctctcattcta R(g) tctgtgctgttatactttcttc	94 °C (30s) 56.5 °C (25s) 72 °C (25s) 32×	374 168 248
	rs2267989	F aggccacaaactactgcat R tgtgcattcttccgttacca F(a) catttactcaccatctcatga R(g) tctcaagtcaagtcaagacc	94 °C (30s) 57.8 °C (28s) 72 °C (20s) 32×	304 211 133
<i>LOXLI</i>	rs2165241	F agatggcaggtccttctgtg R agtggccagaggtctgctaa F(c) agctctcaaatgccacaatac R(t) aggcatgcatctgceaa	95 °C (15s) 62.3 °C (20s) 72 °C (20s) 31 ×	435 193 279
	rs2304719	F ccagctaggctgtctgcaa R tcttgggtccctgtatgac F(c) aggggaggtgagcaage R(t) aaatgctgggtcccca	95 °C (15s) 61.8 °C (15s) 72 °C (18s) 31 ×	336 233 135
	rs893821	F tctgagtgtcttctcagcag R ctgtctgatcccctgctctg F(t) gcactctgcatctgttctt R(c) cagctttattgcagaacctctg	95 °C (15s) 62.6 °C (27s) 72 °C (27s) 32 ×	380 180 242
	rs2415231	F ccctgggatgtcagtagcat R tggtttaagaagatgcatgtgg F(c) ttccacctagtccactgaac R(t) cagaggagattagtgtgtgaa	95 °C (15s) 60 °C (20s) 72 °C (20s) 31 ×	469 183 332

<i>FBLN3</i>	rs3791679	F ggctggcagtatggagtc R aactctggagctatatgggaaa F(c) ctgttcatgctaataatgatgttac R(t) gagaaaattgtaactggatgaa	95 °C (15s) 59.3 °C (29s) 72 °C (30s) 30 ×	550 216 378
	rs1367228	F tctgagaaacacagcaaaatca R ctcttatgttggtcaatccaga F(c) gaatggcagacagatggc R(a) cggcagctgtgctgact	95 °C (15s) 58 °C (15s) 72 °C (22s) 31 ×	398 161 271
	rs3791660	F agttccatttgggtcttcc R aaatgaagtctggggctgtg F(a) aggtgcattctgtgattataataga R(c) gtttttgcttctgagtcattaatg	95 °C (15s) 59 °C (15s) 72 °C (30s) 31 ×	569 232 386
	rs2033316	F gacagagatgggtggaacccta R gcattgattgcctaattgaa F(g) tttacaatcaactttattggg R(a) gaaatgaactcagtagcaatgt	95 °C (15s) 60.8 °C (30s) 72 °C (30s) 32 ×	292 201 134
4q21	rs1455311	F aagtcctacccatgcaggt R ccgtaataatgggatgtgg F(t) ccatttctgaattacagagggt R(c) caggaacctaatgaaaaatcaatag	95 °C (15s) 62 °C (15s) 72 °C (20s) 32 ×	303 150 200
8q24	rs1036819	F aaagccatgctctgaccta R ttttagtctctgggagagaatgtc F(c) cacttttgctgtctgtagcataaac R(a) ggttctgttttaattgaatgcctt	95 °C (15s) 60 °C (15s) 72 °C (20s) 31 ×	404 288 165
9q22	rs430794	F ggtagtaagcctgcactctgc R caactgagtggggagcattt F(c) catcagcttctcagtgccacc R(a) gcagaacatcaagcaagttacagt	95 °C (15s) 65.3 °C (14s) 72 °C (14s) 29 ×	332 216 159
15q11	rs8027714	F ccagcatcttctctctttctagc R acacatatgggcaaatgcag F(g) tcaaggaatcctaattcttttatttag R(a) ccagaactttgtccctataactattaat	95 °C (15s) 61.2 °C (15s) 72 °C (25s) 32 ×	277 191 140
20p13	rs1810636	F ggtgacagatcagcaaccac R ctcaaccaggaggaagag F(g) cctctaaacaattttttaaagcg R(t) gacacactcaccagcacata	95 °C (15s) 59 °C (15s) 72 °C (25s) 30 ×	557 236 365
21q22	rs2236479	F gggctctagaggggaacagtg R cctctgacctccctgtcg F(a) cgtgtccttcagaacgaa R(g) ctgtcctgcatgtcatcc	95 °C (15s) 59.6 °C (20s) 72 °C (30s) 31 ×	379 168 246
9q21	rs4077632	F ggctagctcctgggaacaac R tgcaagctgcatcagcata F(a) gagcaaggtaccttctgttga R(g) cgataagaattagagaatcgc	95 °C (15s) 60.6 °C (14s) 72 °C (15s) 31 ×	560 369 232
	rs2807303	F cgtcccactccaaactttt R gtggtgttcgagagtttga F(c) cttttaccacatctcatttctatttc R(t) gacaagaaaacaggaaggaagaa	95 °C (15s) 60 °C (20s) 72 °C (20s) 31 ×	344 153 241

	rs2777781	F tgacctaagttgataaatgaggaa R tcctcttcacctgtcagaa F(a) ggcataaacaaggctccta R(t) ctccattgtatctttgcctgtta	94 °C (15s) 62.3 °C (20s) 72 °C (22s) 32 ×	343 227 159
	rs11139451	F aaggaccattctaaagtttggac R actgatgcaataggacatgagata F(t) agggaagaaagctgtct R(c) caagagttctgttttctg	95 °C (15s) 61 °C (20s) 72 °C (20s) 15 × 95 °C (15s) 50.8 °C (20s) 72 °C (15s) 16 ×	341 151 226
	rs12237222	F ggatttaaccaggggcccgttt R gcatccaagctccgcttct F(g) cttctgtgggttcccactgg R(t) aaggacgaggtgctcca	95 °C (15s) 66 °C (15s) 72 °C (15s) 30 ×	370 149 260
	rs12551710	F aggactccagcccctagact R cttggagtttactgtggggaaa F(t) tccagtcctccactcacctat R(c) cacagaacctgctgtggaagg	95 °C (15s) 63 °C (15s) 72 °C (30s) 31 ×	334 150 225
<i>COL3A1</i>	rs1800255	F aacctagtggcctgattcaaaatg R agcagcacctgaaaataagtgag F(g) caggacttagaggtggag R(a) ccagggggaccagt	95 °C (15s) 63 °C (30s) 72 °C (30s) 15 × 95 °C (15s) 51 °C (30s) 72 °C (30s) 16 ×	288 142 177
<i>MMP9</i>	rs17576	F accggtttggttctgc R gagcttgtcccggctgt F(a) ccaggactctacacca R(g) agcattgcagtccc	95 °C (15s) 60 °C (30s) 72 °C (30s) 15 × 95 °C (15s) 55.6 °C (18s) 72 °C (18s) 16 ×	436 156 310
<i>PGR</i>	rs484389	F aaattgccatgtttgaatagca R tcaagaaaatatgggtaacaaaaca F(c) taaagaattaaattttgtggc R(t) tgaccaaaacaaaagacata	95 °C (15s) 58 °C (35s) 72 °C (30s) 18 × 95 °C (15s) 53.2 °C (15s) 72 °C (18s) 15 ×	450 202 289
<i>ESR1</i>	rs2228480	F ccccttctagggatttcagc R ggctgttccaacagaagac F(a) agagggttccctgccaca R(g) agccagggagctctcagacc	95 °C (15s) 62.2 °C (20s) 72 °C (30s) 32 ×	506 219 325

Дизайн праймеров производился в программе Primer3. <sup>b</sup>PCR conditions are provided as temperature (duration) of denaturation, annealing and extension phase, respectively, followed by the number of cycles for a given SNP. Each PCR reaction was finished by a final extension phase lasting 5 min.

## Приложение 3

Таблица 1

SNPs, рассмотренные в репликативном исследовании

SNP	Регион	Позиция в референсном геноме GRCh37.p13	Ген	Функция	Категория в Regulome DB
rs1455311	4q21	79964587	<i>LINC01088</i>	intron	5
rs1036819	8q24	135611945	<i>ZFAT-AS1, ZFAT</i>	nearGene-3	4
rs4077632	9q21	81163473	-	-	Нет данных
rs2807303	9q21	82187095	<i>TLE4</i>	nearGene-5	2a
rs2777781	9q21	84215034	<i>TLE1</i>	intron	3a
rs11139451	9q21	84495608	-	-	5
rs12237222	9q21	85834743	<i>LOC102723989</i>	intron	1a
rs12551710	9q21	86088295	<i>FRMD3</i>	intron	1d
rs430794	9q22	93852815	-	-	5
rs8027714	15q11	24964597	-	-	6
rs1810636	20p13	2654925	-	-	4
rs2236479	21q22	46919132	<i>COL18A1</i>	intron	1f

MAF – частота минорного аллеля для популяции CEU по базе данных HarMap

Таблица 2

Анализ неравновесного сцепления шести SNPs участка хромосомы 9q21

D'	rs11139451	rs12237222	rs12551710	rs2777781	rs2807303
<i>P</i> - value					
rs4077632	0.149 0.073	0.034 0.367	0.323 $4.17 \times 10^{-6}$	0.009 0.895	0.022 0.515
rs11139451		<b>0.257</b> <b><math>1.45 \times 10^{-6}</math></b>	0.129 0.009	0.236 0.019	0.0007 0.988
rs12237222			0.266 0.001	0.052 0.252	0.098 0.035
rs12551710				0.043 0.456	0.373 0.002
rs2777781					0.177 0.008

D' и P указаны для каждой пары SNPs.

Анализ неравновесного сцепления тринадцати SNPs гена *FBLN5*

	rs2430339	rs929608	rs12586948	rs2284337	rs2430347	rs2498841	rs2018736	rs12589592	rs2430369	rs2245701	rs2474028	rs2284338	rs2267989
rs2430339	-	0	0	0	0	0	0.1026	0.6396	0	0.0742	0.135	0	6E-04
rs929608	-	-	0.3979	0.6254	0.2385	0.1026	4e-04	0.6436	0.0505	0	0	0.8121	0
rs12586948	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0.0036	0	0	0
rs2284337	.	.	.	.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rs2430347	.	.	.	.	.	0	0	0	0	0	0	0	0
rs2498841	.	.	.	.	.	.	0	0	0	0	0	0	0
rs2018736	.	.	.	.	.	.	.	0	0	0	0	0	0
rs12589592	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	0	0	0
rs2430369	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	0	0
rs2245701	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0.0931	0	0
rs2474028	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0
rs2284338	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
rs2267989	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

В ячейках указаны значения  $P$  для каждой пары SNPs.

Таблица 4

Анализ неравновесного сцепления тринадцати SNPs гена *LOXL1*

	rs893821	rs2165241	rs2304719	rs2415231
rs893821	.	0	0	0.2245
rs2165241	.	.	0	0
rs2304719	.	.	.	0
rs2415231	.	.	.	.

В ячейках указаны значения  $P$  для каждой пары SNPs.

Таблица 5

Анализ неравновесного сцепления тринадцати SNPs гена *FBLN3*

	rs3791660	rs1367228	rs3791679	rs2033316
rs3791660	.	0	0	0
rs1367228	.	.	0	2E-04
rs3791679	.	.	.	0
rs2033316	.	.	.	.

В ячейках указаны значения  $P$  для каждой пары SNPs.