

На правах рукописи

ХАДЖИЕВА МАРЬЯМ БОРИСОВНА

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

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2016

Работа выполнена в лаборатории экологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель: **Абилев Серикбай Каримович**, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по науке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва (ИОГен РАН)

Официальные оппоненты: **Климов Евгений Александрович**, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник кафедры генетики биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (МГУ)

Машкина Елена Владимировна, доктор биологических наук, доцент кафедры генетики Академии биологии и биотехнологии Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону (ЮФУ)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Медико-генетический научный центр, г. Москва

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Проплапс 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). 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, ПТО 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).

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, оперативными вмешательствами и неоднократными родами. Однако близнецовые исследования показали, что в постменопаузальном периоде 43% variability, 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 влагалища (*COL3A1* – 8 публикаций, *COL1A1* – 4, *MMP1* – 4, *MMP3* – 4, *MMP9* – 4, *LAMC1* – 3). В двух полногеномных исследованиях были выявлены ассоциации участка хромосомы 9q21 и шести отдельных SNPs с предрасположенностью к развитию тяжелых форм пролапса в семьях европеоидов (Allen-Brady et al., 2009, 2011). Роль генов, контролирующих процессы эластогенеза (*FBLN5*, *LOXLI*, *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 этих 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 Haploview (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 HapMap, 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 *LOXLI*, 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*, *LOXLI* 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* (т.е. апостериорного) анализа результатов полногеномных исследований.

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

Теоретическая и практическая значимость работы. Генетический статус, определяемый носительством выявленных рисковых аллелей и гаплотипов гена *FBLN5* и *LOXLI*, в том числе и в комбинации с клиническими факторами (с неоднократными родами, макросомией 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 формирования ПТО, замедления 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: «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 Пущинская 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 Пущинская 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методы исследования

Клинические методы. Общее состояние пациенток и локальный статус заболевания оценивались 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). Выполнен ряд исследований для выявления генитальной патологии (миомы матки, опухоли яичников, эндометриоза и др.), нарушения мочеиспускания (выявления скрытых форм стрессового недержания мочи, гиперактивного мочевого пузыря, смешанных форм мочевого инконтиненции), определения степени дисплазии соединительной ткани, выявления нарушений сердечно-сосудистой системы и т.д.

Молекулярно-генетические методы

Подбор полиморфных вариантов. Для генов *FBLN3*, *FBLN5* и *LOXLI* был применен подход, заключающийся в подборе таргетных (tagger) SNPs. 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 (Трифонова и др., 2012). Подбор полиморфных вариантов выполнен в программе HaploView (version 4.2). Таким образом, нами были подобраны 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 SNPs с уровнем экспрессии генов в лимфобластоидных клеточных линиях 269 человек (представителей четырех популяций) из проекта HapMap (haplotype map) (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). В настоящее исследование были включены полиморфные варианты, коррелирующие в группе родителей-европеоидов ($n=60$) с уровнем экспрессии генов *FBLN5* и *LOXLI*.

В двух полногеномных исследованиях (Genome-Wide Association Studies, GWAS и Genome Wide Linkage Study) в ассоциации с повышенным риском развития ПТО в семьях европеоидов, включающих 2-3-х родственников первого порядка (матери, дочери, сестры), было выявлено шесть отдельных генетических вариантов участков хромосом 4q21, 8q24, 9q22, 15q11, 20p13, 21q22 и участок хромосомы 9q21 (Allen-Brady et al., 2009, 2011). С целью верификации результатов на независимой выборке подбор полиморфных вариантов участка хромосомы 9q21 выполнялся с помощью ресурса RegulomeDB (<http://www.regulomedb.org/>), кумулирующей 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 SNPs 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. Из участка хромосомы 9q21 было выбрано 6 SNPs с различным регуляторным потенциалом: rs12237222 (1a), rs11139451 (5), rs12551710 (1d), rs4077632 (нет данных), rs2807303 (2a), rs2777781 (3a).

Для последующего мета-анализа с учетом наших результатов мы изучили одиночные варианты генов *COL3A1*, *MMP9*, *ESR1*, *PGR*, ассоциированные с ПТО по литературным данным. Все полиморфные варианты, рассмотренные в рамках диссертационной работы, представлены в таблице 1.

Таблица 1

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>LOXLI</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>LOXLI</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 HapMap

Пробоподготовка. Образцы венозной крови пациенток собирали в содержащие ЭДТА вакутейнеры и хранили при температуре $-20-80^{\circ}\text{C}$ до выделения ДНК. 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 $-20-80^{\circ}\text{C}$.

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 позволяет амплифицировать в одной пробирке фрагменты ДНК с различной длиной, соответствующие альтернативным аллелям. Данная реакция обладает высокой специфичностью за счет конкурентного связывания праймеров с субстратом, и 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. 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.

Статистическая обработка результатов. Оценка различий между двумя независимыми выборками выполнялась с помощью U-критерия Манна-Уитни (пакет программ «WinSTAT 2003.1», интегрированный в Excel) и точного двустороннего критерия Фишера (пакет программ WinPePi) (<http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>), соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга оценивали методом χ^2 . Оценка 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>). Вклады различных генотипов в заболеваемость определяли с помощью показателя «odd ratio» (OR – мера коррелятивной связи). Мощность теста и поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хокберга (FDR, False Discovery Rate) выполнялась в программе WinPePi. 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. Анализ межгенных взаимодействий был выполнен с помощью теста отношения правдоподобия (log-likelihood ratio tests, LRTs) пакетом SNPAssoc для R. Для оценки генетического разнообразия выборки выполнен дискриминантный анализ главных компонент для участка хромосомы 9q21 с помощью программного обеспечения R. Мета-анализ проводился программе Review Manager 5 (RevMan 5). Дополнительный поиск полиморфных вариантов и генов, ассоциированных с ПТО, проводился 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/>).

Клиническая характеристика пациенток

В исследовании 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. 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 варьировал от 25 до 86 лет; средний возраст женщин составил 57.65 ± 10.80 в основной и 57.25 ± 12.70 лет в контрольной группе.

Сравнительный анализ выявил, что 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 (роды через естественные родовые пути/кесарево сечение, макросомия плода, родовые травмы).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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 2. 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 рискованные аллели rs2284337-A, rs2018736-C, rs2474028-T, достоверно чаще встречающиеся в основной группе по сравнению с контролем, а также протективный аллель rs12589592-A. Ассоциированными с ПТО также оказались rs2304719-T гена *LOXLI* и rs3791660-C гена *FBLN3*. При анализе без учета клинических факторов риска пограничную значимость в ассоциации с ПТО показали аллели, выбранные с помощью SNPexp, rs2284338-A и rs2267989-G гена *FBLN5* (таблица 2).

Таблица 2

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

SNPs, аллели	Контроль		ПТО		P (модель), OR (95% ДИ)	P ^a (модель), OR (95% ДИ)
	Число (%)	HWP	Число (%)	HWP		
<i>FBLN5</i>						
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.)	0.043 (рец.)
A	151 (26.0)		125 (30.0)		1.64 (0.80– 3.35)	2.36 (1.01-5.49)
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	0.0059(адд.)	0.032 (дом.)
C	218 (37.0)		193 (46.0)		1.42 (1.11– 1.83)	1.58 (1.04-2.40)
rs12589592	n=291		n=209			
G	339 (58.0)	0.15	271 (65.0)	0.29	0.0052(рец.)	0.0022 (рец.)
A	243 (42.0)		147 (35.0)		0.48 (0.28– 0.82)	0.41 (0.23-0.74)
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	0.013 (дом.)	0.037 (дом.)
T	176 (30.0)		159 (38.0)		1.58 (1.10– 2.27)	1.54 (1.03-2.30)
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	n=288		n=208			
A	325 (56.0)	0.34	212 (51.0)	0.89	0.058 (дом.)	0.086 (дом.)
G	251 (44.0)		204 (49.0)		1.46 (0.98– 2.17)	1.47 (0.95-2.28)
LOXLI						
rs2165241	n=290		n=209			
T	303 (52.0)	0.29	209 (50.0)	0.33	0.50 (адд.)	0.50 (дом.)
C	277 (48.0)		209 (50.0)		1.09 (0.85– 1.39)	1.17 (0.75-1.83)
rs2304719	n=290		n=203			
C	453 (78.0)	0.3	289 (71.0)	1.0	0.012 (дом.)	0.0051 (дом.)
T	127 (22.0)		117 (29.0)		1.59 (1.10– 2.28)	1.79 (1.19-2.70)
rs893821	n=286		n=204			
T	475 (83.0)	1.0	342 (84.0)	0.79	0.69 (дом.)	0.31 (дом.)
C	97 (17.0)		66 (16.0)		0.92 (0.62– 1.36)	0.80 (0.51-1.23)
rs2415231	n=291		n=208			
T	294 (51.0)	0.48	209 (50.0)	0.78	0.86 (рец.)	0.74 (рец.)
C	288 (49.0)		207 (50.0)		1.04 (0.68-1.58)	0.92 (0.58-1.47)
FBLN3						
rs3791660	n=291		n=209			
A	323 (55.0)	0.29	214 (51.0)	0.27	0.041 (рец.)	0.16 (рец.)
C	259 (45.0)		204 (49.0)		1.56 (1.02-2.40)	1.41 (0.87-2.29)
rs1367228	n=290		n=209			
C	324 (56.0)	0.63	230 (55.0)	1.0	0.68 (рец.)	0.56 (рец.)
A	256 (44.0)		188 (45.0)		1.10 (0.70-1.72)	1.16 (0.70-1.94)
rs3791679	n=284		n=209			
T	409 (72.0)	0.24	312 (75.0)	0.58	0.18 (дом.)	0.12 (дом.)
C	159 (28.0)		106 (25.0)		0.78 (0.55-1.12)	0.73 (0.49-1.09)
rs2033316	n=290		n=207			
A	484 (83.0)	0.67	332 (80.0)	0.51	0.12 (дом.)	0.27 (дом.)
G	96 (17.0)		82 (20.0)		1.35 (0.93-1.98)	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. Значимые результаты выделены полужирным шрифтом

^a Анализ с поправкой на возраст, индекс массы тела, наличие родовых травм и количество родов.

Гаплотипический анализ тринадцати полиморфных вариантов гена *FBLN5* выявил группы аллелей, ассоциированных с развитием пролапса тазовых органов. Эффект зарегистрирован для гаплотипа, состоящего из 12 аллелей (rs929608(T) - rs12586948(A) - rs2284337(A) - rs2430347(A) - rs2498841(T) - rs2018736(C) - rs12589592(G) - rs2430369(C) - rs2245701(G) - rs2474028(T) - rs2284338(A) - rs2267989(G)), который достоверно чаще встречался среди женщин, страдающих ПТО, по сравнению с контролем ($P=0.039$, OR=2.28, 95% ДИ: 1.04-4.97; частота встречаемости 5.43%). Различные комбинации исследуемых SNPs выявили и другие группы аллелей, связанные с развитием пролапса. Шесть рискованных аллелей гена *FBLN5*, для которых была показана корреляция с ПТО, 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%).

В группах с неоднократными родами (≥ 2 родов), макросомией плода (≥ 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 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).

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).

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%).

Таблица 3

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

Неоднократные роды (≥ 2 родов), n=227				
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.)
Травмы мягких родовых путей, n=200				
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 (≥ 4000г), 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

При стратификации выборки по количеству родов (0-1 роды и ≥ 2 родов) в группе с неоднократными родами, как и в общей выборке, статистически значимый результат получен для рискованного аллеля rs2304719-T гена *LOXLI* (множественный регрессионный анализ: доминантная модель, $P^a=0.036$, OR=1.79, 95% ДИ: 1.04-3.10). Анализ гаплотипов 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 рискованный 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 сайтов именно rs2304719-T ассоциирован с повышенным риском развития ПТО.

Таким образом, полученные результаты позволяют убедиться в значимости родов как основного фактора, провоцирующего ПТО, а также сделать вывод, что вариабельность генов *LOXLI* и *FBLN5* влияет на риск развития данной патологии, в то время как влияние вариабельности гена *FBLN3* незначительно.

2. Верификация результатов полногеномных исследований

Для верификации результатов полногеномных исследований, выполненных Allen-Brady К. с коллегами в ассоциации с семейным пролапсом тазовых органов у европеоидов, нами было изучено 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 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.

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. 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.

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. Примечательно, что rs12237222 имеет

невысокое, но при этом достоверное неравновесное сцепление с rs11139451 ($D'=0.257$, $P=1.45 \times 10^{-6}$), 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).

Несмотря на отсутствие или незначительный вклад полиморфных генов по отдельности, носительство определенных аллельных сочетаний может влиять на развитие многофакторного заболевания (Львов и др., 2012). В связи с этим мы выполнили анализ межгенных взаимодействий 12 SNPs (рисунок 1).

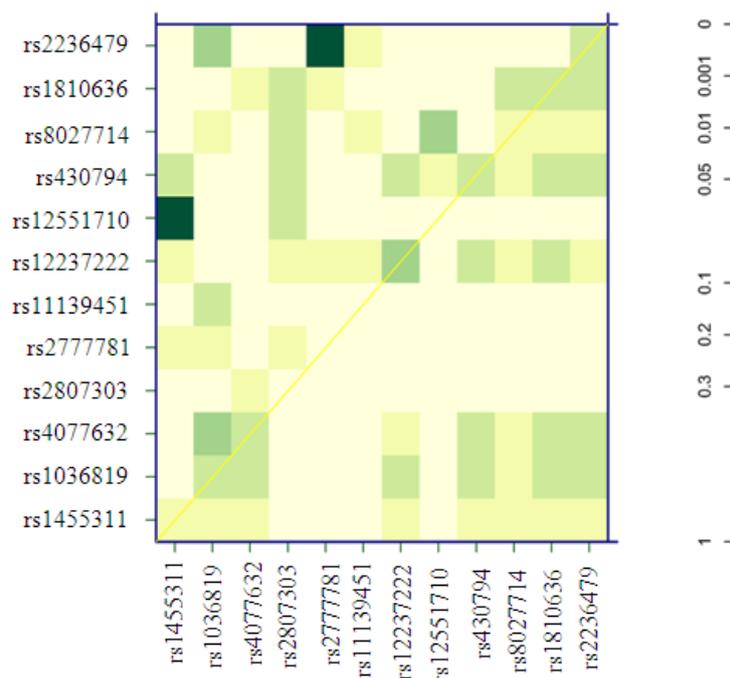


Рисунок 1. Анализ межгенных взаимодействий двенадцати полиморфных вариантов участков хромосом 4q21, 8q24, 9q21, 9q22, 15q11, 20p13, 21q22; доминантная модель.

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 вышперечисленных не были ассоциированы с риском развития ПТО. Результаты оставались значимыми после коррекции Бонферрони на множественность сравнений (12×12

= 144 сравнения; $P = 0.011$ и $P = 0.024$ соответственно). 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), 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 12 изученным SNPs для популяций из базы данных HarMap (рисунок 2).

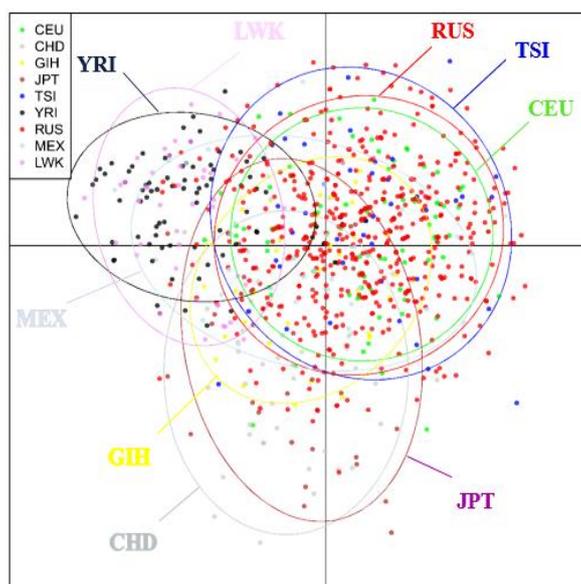


Рисунок 2. Оценка репрезентативности российской выборки; анализ главных компонент по 12 изученным SNPs для российской (RUS) и популяций из HarMap: индийской (GIH - Gujarati Indians in Houston, Texas), мексиканской (MEX - Mexican ancestry in Los Angeles, California), азиатских (CHD - Chinese in Metropolitan 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). Частоты генотипов были отобраны 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).

По результатам анализа генетического разнообразия 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.

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

Мы изучили четыре сайта (*COL3A1* rs1800255, *MMP9* rs17576, *ESR1* rs2228480 и *PGR* rs484389), которые ранее были рассмотрены в ассоциации с ПТО зарубежными коллегами. При обработке как общей выборки, так и при выполнении множественного регрессионного анализа достоверно значимых эффектов зарегистрировано не было (таблица 4).

Таблица 4

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

SNP и генотипы		Контроль		ПТО		P, OR, (95% ДИ)	P ^a , 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. ^a Анализ с поправкой на возраст, индекс массы тела, наличие родовых травм и количество родов.

На основе полученных результатов и имеющихся литературных данных мы провели мета-анализ связи выше перечисленных SNPs и риска развития ПТО. 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% ДИ.

Мета-анализ трех SNPs (rs17576, rs2228480, rs484389), выполненный с учетом наших результатов и результатов ассоциативных исследований Chen HY с коллегами с 2008 по 2010гг., значимых различий между здоровыми женщинами и женщинами с ПТО не выявил (результаты не представлены). Ассоциация rs1800255 гена *COL3A1* с пролапсом тазовых органов была рассмотрена 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 с коллегами. В данных работах был выявлен рисковый аллель rs1800255-A, 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 (A/A против G/G+G/A). 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 A/A оказался ассоциированным с ПТО (OR = 2.90, 95% ДИ: 1.05 – 7.99, $P = 0.04$) (рисунок 3).

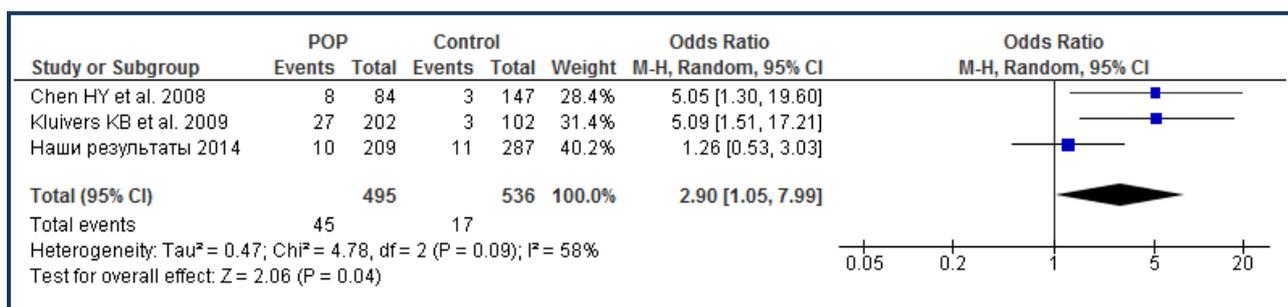


Рисунок 3. Мета-анализ ассоциации rs1800255 гена *COL3A1* с ПТО

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). Возможно, снижение прочности поддерживающих тазовые органы структур обусловлено гидрофильными свойствами треонина (Ward et al., 2014).

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), четыре сцепленных SNPs гена *FBLN3* и четыре одиночных полиморфных варианта генов *COL3A1*, *MMP9*, *ESR1* и *PGR*. Шесть сайтов 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 *LOXLI* ($p = 0.028$).

4. Анализ полиморфных вариантов и групп генов, ассоциированных с ПТО 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 Catalog, содержащий результаты полногеномных исследований пациентов-европеоидов с доступными электронными историями болезней; в частности, в каталоге имеются данные о наличии/отсутствии ПТО (718 женщин). Таким образом, дополнительный поиск полиморфных вариантов, ассоциированных с пролапсом тазовых органов, был выполнен с помощью данного ресурса. Из 159 коррелирующих с пролапсом SNPs, только два были с уровнем значимости $p < 0.001$: rs710446 гена *KNG1* ($p = 2.1 \times 10^{-4}$) и rs314253, расположенный между генами *ASGR1* и *DLG4* ($p = 6.1 \times 10^{-4}$) (рисунок 4).

Для выявления групп генов, связанных с развитием ПТО, вторичный анализ данных проводился 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.

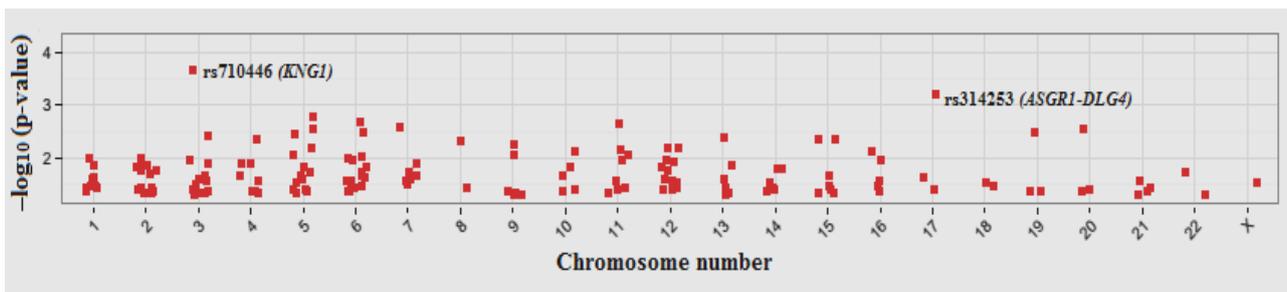


Рисунок 4. Manhattan plot, отражающий значения $-\log_{10}(P\text{-values})$ ассоциаций полиморфных вариантов с генитальным пролапсом по каталогу PheWAS; SNPs с уровнем значимости $p < 0.001$ подписаны.

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). Критериями отбора выступили размер группы (минимум 5 генов) и значение скорректированного поправкой Бенжамини-Хокберга FDR (False Discovery Rate) $P < 0.10$. Таким образом, была выявлена группа из шести генов (*WLS*, *SP7*, *MEPE*, *C6ORF10*, *CCDC170*, *SPTBN1*), связанная по NHGRI GWAS каталогу с минеральной плотностью костной ткани (позвоночник) (МПКТ) ($P_{\text{корр.}} = 0.0936$); четыре из них (*WLS*, *MEPE*, *SP7*, *SPTBN1*) играют важную роль в дифференцировке костной ткани (Hsu, Kiel, 2012). Наиболее

выраженный эффект был зарегистрирован для гена *SP7* (*Sp7* transcription factor), ответственного за дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток и остификацию костной ткани; аллель rs10876432-A 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). 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).

Для подтверждения выявленных закономерностей был выполнен 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 была сформирована на основе данных из базы MGI MouseMine (<http://www.mousemine.org/>), поиск осуществлялся по ключевому термину «генитальный пролапс» и близким ему по значению; 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), осуществляющий 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 выполнялся 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. Фенотипические подкатегории были объединены по верхним категориям иерархической структуры Mammalian Phenotype Ontology. Общие для обеих групп фенотипы были визуализированы в программной среде R в виде тепловой карты (рисунок 5).

Несмотря на сильные различия групп генов MGI и PheWAS по составу, в программе VLAD было выявлено значительное количество общих промежуточных фенотипов ($n=82$). Данный анализ, как и анализ в GSA-SNP выявил группы генов, отвечающих 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, и *DPP6* (dipeptidyl-

peptidase 6), который кодирует трансмембранный белок, вовлечённый в работу нейрональных калиевых каналов; изменения в данном гене связаны с нейродегенеративным заболеванием - боковым амиотрофическим склерозом (Giri et al., 2015). Данные результаты подтверждают значимость в развитии ПТО генов, участвующих в формировании и функционировании нервной системы. Наибольшее число совпадающих фенотипических подкатегорий было зафиксировано для категории «ненормальная морфология/развитие клеток костного мозга» (n=19). Таким образом, нами определены группы генов, которые в дальнейшем целесообразно изучить в качестве «причинных» генов развития пролапса тазовых органов.

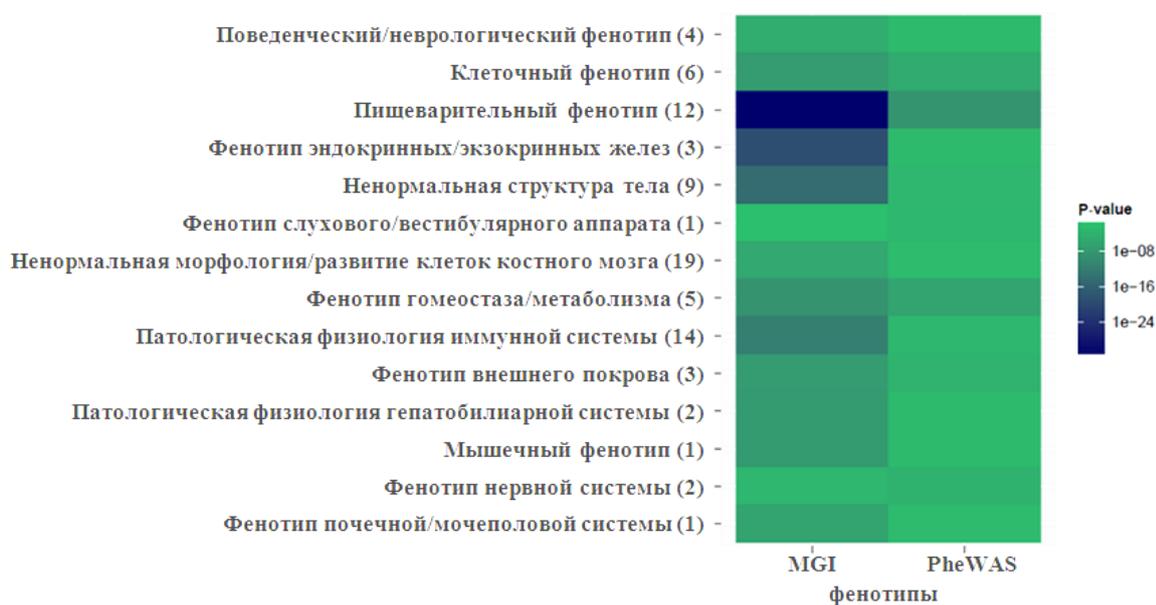


Рисунок 5. Сравнительный функциональный анализ генов, ассоциированных с генитальным пролапсом по PheWAS каталогу и Mouse Genome Informatics (MGI) Database. В скобках указано количество совпадающих фенотипов-подкатегорий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пролапс тазовых органов представляет собой распространенное урогинекологическое 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

связь гена *FBLN5* с процессами 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 в частности выявил связь риска развития ПТО 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 рисков 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 формирования ПТО, замедления 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.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из перечня рецензируемых научных журналов:

1. Khadzhieva MB, Kamoeva SV, Chumachenko AG, Ivanova AV, Volodin IV, Vladimirov IS, Abilev SK, Salnikova LE. Fibulin-5 (*FBLN5*) gene polymorphism is associated with pelvic organ prolapse// *Maturitas*. – 2014. – Vol. 78(4). – P.287-292.
2. Макаров О.В., Камоева С.В., Хаджиева М.Б., Иванова А.В., Чумаченко А.Г., Абилев С.К., Сальникова Л.Е. Связь полиморфизма гена *FBLN5* с риском развития пролапса тазовых органов у женщин с травмами мягких родовых путей// *Акушерство и гинекология*. – 2015. – №1. – С.42-50.
3. Khadzhieva MB, Kolobkov DS, Kamoeva SV, Ivanova AV, Abilev SK, Salnikova LE. Verification of the Chromosome Region 9q21 Association with Pelvic Organ Prolapse Using RegulomeDB Annotations// *Biomed Res Int*. – 2015; Article ID:837904.
4. Хаджиева М.Б., Камоева С. В., Иванова А. В., Абилев С. К., Сальникова Л. Е.. Полиморфизм генов, контролирующих процессы эластогенеза, и риск развития пролапса тазовых органов у женщин// *Генетика*. – 2015. – том51. – №10. – С. 1191–1198.
5. Lyubov E. Salnikova, Maryam B. Khadzhieva, Dmitry S. Kolobkov. Biological findings from the PheWAS Catalog: focus on connective tissue related disorders (pelvic floor dysfunction, abdominal hernia, varicose veins and hemorrhoids)// *Hum Genet*. – 2016. – Vol.135(7). – P.779-95. DOI: 10.1007/s00439-016-1672-8.

Тезисы докладов:

1. Хаджиева М.Б., Камоева С.В., Чумаченко А.Г., Иванова А.В., Абилев С.К., Сальникова Л.Е. Генетические факторы риска развития пролапса органов тазового дна.// Сборник тезисов «Популяционная генетика и геногеография: наука и практика». – Москва. – 2013. – С.32.
2. Khadzhieva M.B., Volodin I.V., Chumachenko A.G. Association *FBLN5* gene polymorphism with pelvic organ prolapse// *European Human Genetics Conference*. – Milan. – 2014. – Vol.22. – suppl.1. – P. 378.
3. Хаджиева М.Б., Камоева С.В., Иванова А.В., Абилев С.К., Сальникова Л.Е. Взаимодействие клинично-демографических факторов и полиморфных вариантов гена *FBLN5* в детерминации повышенного риска развития пролапса тазовых органов// Материалы пленума 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. – 2014. – С. 422-423.
4. Хаджиева М.Б. Связь полиморфных вариантов генов *FBLN5* и *LOXL1* с риском развития пролапса тазовых органов// Сборник тезисов 19-й Международной Пущинской

школы-конференции молодых ученых «Биология - Наука XXI века».– Пушино. – 2015. – С. 284.

5. Khadzhieva M.B., Kamoeva S. V., Abilev S. K., Salnikova L. E.. Study of *FBLN5* and *LOXLI* genetic variations in association with pelvic organ prolapse taking into account levator trauma and parity// European Human Genetics Conference. – Glasgow. – 2015. – Vol.23. – suppl.1. – P. 389.

6. Хаджиева М.Б., Камоева С.В., Иванова А.В., Абилев С.К., Сальникова Л.Е. Связь полиморфных вариантов генов экстрацеллюлярного матрикса с риском развития пролапса тазовых органов. Тезисы VII съезда Российского общества медицинских генетиков, Санкт-Петербург// Медицинская генетика. – 2015. – том14. – №4 (154). – С.32.

7. Колобков Д.С., Хаджиева М.Б. Применение PheWAS каталога в изучении пролапса тазовых органов// Сборник тезисов 20-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология - Наука XXI века», 2016, с. 315.

8. Khadzhieva M.B., Kolobkov D.S., Kamoeva S.V., Salnikova L.E. A PheWAS approach in studying genital prolapse// European Human Genetics Conference 2016, May 21 - 24, Barcelona, Spain. European Journal of Human Genetics. – 2016. – Vol.24. – P.143. – <https://www.eshg.org/abstracts2016.0.html>.

Патенты на изобретение:

1. Камоева С.В., Макаров О.В., Хаджиева М.Б., Иванова А.В., Чумаченко А.Г., Абилев С.К., Сальникова Л.Е. Способ прогнозирования риска развития пролапса гениталий, 2014, RU 2542441.

2. Камоева С.В., Макаров О.В., Хаджиева М.Б., Иванова А.В., Чумаченко А.Г., Абилев С.К., Сальникова Л.Е. Способ прогнозирования риска развития пролапса гениталий у женщин с родовыми травмами в анамнезе, 2014, RU 2560842.

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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Львов Д., Фаворова О.О., Фаворов А.В. Полигенный подход к исследованиям полигенных заболеваний// Acta naturae. – 2012. – ТОМ 4. – №3(14). – С. 62-75.
7. 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.
8. Adjoussou SA, Bohoussou E, Bastide S, Letouzey V, Fatton B, de Tairac R. Functional symptoms and associations of women with genital prolapse// Prog Urol. – 2014. – Vol.24. – №8. – P. 511-517.
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Giri A, Wu JM, Ward RM, Hartmann KE, Park AJ, North KE, Graff M, Wallace RB, Barih 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.

23. Hamajima N. PCR–CTPP: a new genotyping technique in the era of genetic epidemiology// *Expert Rev Mol Diagn.* – 2001. – №1. – P.119–23.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Lince SL, van Kempen LC, Dijkstra JR, IntHout J, Vierhout ME, Kluivers 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.

35. 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.

36. 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.

37. 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.

38. 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.

39. 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.

40. 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.

41. 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.

Интернет-ресурсы

1. <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>
2. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>
3. <http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/hugenavigator.htm>
4. <http://primer3.ut.ee/>
5. <http://tinyurl.com/snpexp>
6. <http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>
7. <http://www.genecards.org/>
8. <http://www.mousemine.org/>
9. <http://www.regulomedb.org/>

10. <http://www.R-project.org/>

11. <http://www.scandb.org/newinterface/about.html>

12. <https://phewas.mc.vanderbilt.edu>