

Полимеразная цепная реакция в реальном времени как метод быстрого генотипирования пациенток с миомой матки на примере трех генетических полиморфизмов

М.В. Кузнецова¹, К.А. Свирепова¹, Н.С. Согоян¹, А.И. Никифорова², Д.Ю. Трофимов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, г. Москва

² ООО «Научно-производственная фирма ДНК-Технология»; Россия, г. Москва

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: оценить эффективность методов генотипирования образцов ДНК (прямого секвенирования по Сэнгеру и двух вариантов ПЦР в реальном времени) для рутинного анализа больших групп; провести сравнительный анализ частот генотипов трех однонуклеотидных полиморфизмов в группах женщин с миомой матки (при отдельном анализе группы с отягощенным семейным анамнезом) и в контрольной выборке.

Дизайн: сравнительное исследование.

Материалы и методы. Участниц исследования распределяли в группы по принципу «случай-контроль». Проводили анализ результатов генотипирования образцов ДНК двух выборок пациенток. Анализировали частоты генотипов в исследуемой группе (пациентки с миомой) и в группе контроля (пациентки без миомы в анамнезе и без семейной отягощенности по данной патологии). Основным методом генотипирования являлось секвенирование по Сэнгеру с визуализацией генотипов. На втором этапе исследования были протестированы два различных метода генотипирования, основанных на ПЦР в реальном времени.

Результаты. Проведено генотипирование пациенток с миомой матки по трем однонуклеотидным полиморфизмам (rs3020434, rs124577644, rs12637801), расположенным в интронах генов *ESR1*, *FBN2* и *KCMB2*. Обнаружены значимые отличия в частотах генотипов между исследуемой группой и группой контроля. Частоты полиморфизмов статистически значимо различаются между пациентками с миомами, женщинами из группы сравнения и пациентками с наследственно отягощенным анамнезом по данному заболеванию. Показано, что использование разработанных нами двух вариантов систем генотипирования для ПЦР в реальном времени вместо прямого секвенирования по Сэнгеру значительно ускоряет получение результатов, являясь более дешевым и менее трудозатратным методом определения генотипов однонуклеотидных полиморфизмов в больших выборках.

Заключение. Метод ПЦР в реальном времени может быть использован для быстрого и эффективного анализа однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с развитием миомы матки. При этом оба метода (ПЦР-типирование с применением олигонуклеотидных зондов и анализ кривых плавления с высоким разрешением), протестированные в данной работе, позволяют получать однозначные результаты для 97–99% образцов.

Ключевые слова: миома матки, однонуклеотидные полиморфизмы, семейная предрасположенность.

Вклад авторов: Кузнецова М.В. — разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи к печати; Свирепова К.А. — сбор клинического материала, выделение ДНК, лабораторная работа, статистическая обработка данных; Согоян Н.С. — обследование и лечение пациентов, сбор клинического материала; Никифорова А.И. — разработка праймеров для ПЦР, отладка программного обеспечения для ПЦР в реальном времени; Трофимов Д.Ю. — проверка критически важного содержания, утверждение рукописи для публикации.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Для цитирования: Кузнецова М.В., Свирепова К.А., Согоян Н.С., Никифорова А.И., Трофимов Д.Ю. Полимеразная цепная реакция в реальном времени как метод быстрого генотипирования пациенток с миомой матки на примере трех генетических полиморфизмов. Доктор.Ру. 2021; 20(8): 7–11. DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-8-7-11

Real-Time Polymerase Chain Reaction as a Method of Express Genetic Typing of Patients with Uterine Leiomyoma: An Example of Three Genetic Polymorphisms

M.V. Kuznetsova¹, K.A. Svirepova¹, N.S. Sogoyan¹, A.I. Nikiforova², D.Yu. Trofimov¹

¹ V.I. Kulakov National Medical Scientific Centre of Obstetrics, Gynecology and Perinatal Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation; 4 Academician Oparin Str., Moscow, Russian Federation 117997

² DNA-Technology LLC; 83/1 Guryanov Str., Moscow, Russian Federation 109388

ABSTRACT

Study Objective: To assess the efficacy of methods for DNA gene typing (direct sequencing and two variants of real-time PCR) for routine analysis of large groups; to compare the prevalence of genotypes of three single nucleotide polymorphisms in groups of women with uterine leiomyoma (with a separate analysis of a group with a family history of the disease) and in controls.

Кузнецова Мария Владимировна (автор для переписки) — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 8749-1153. <https://orcid.org/0000-0003-3790-0427>. E-mail: mkarja@mail.ru (Окончание на с. 8.)



Study Design: comparative study.

Materials and Methods. Subjects were divided into groups using the case-control principle. DNA gene typing results for two groups of patients were analysed. Also, we analysed prevalence of genotypes in study group (patients with uterine leiomyoma) and in controls (patients without a history of uterine leiomyoma and a family history of the disease). The primary method used for genotyping was direct sequencing with genotype imaging. On the second stage, we tested two different PCR-based genotyping methods.

Study Results. Patients with uterine leiomyoma were subject to genotyping using three single nucleotide polymorphisms (rs3020434, rs124577644, rs12637801) in *ESR1*, *FBN2*, and *KCWB2* introns. We have identified significant differences in prevalence of genotypes between the study group and controls. Polymorphism prevalence is statistically different between patients with leiomyomas, controls and women with a family history of the disease. It is demonstrated that the use of the two variants of real-time PCR testing instead of direct sequencing speeds up results; these methods are a less expensive and less labour-intensive tool for genotyping of single nucleotide polymorphisms in large groups.

Conclusion. Real-time PCR testing can be used for express and efficient analysis of single nucleotide polymorphisms associated with uterine leiomyoma. Both methods (PCR genotyping with the use of oligonucleotide probes and analysis of high-resolution melting profiles) tested in this paper make it possible to get unambiguous results in 97–99% of samples.

Keywords: uterine leiomyoma, single nucleotide polymorphisms, family proneness.

Contributions: Kuznetsova, M.V. — study design, data analysis and interpretation, editing of the manuscript for publication; Svirepova, K.A. — clinical material collection, DNA purification, laboratory procedures, statistical data processing; Sogoyan, N.S. — patient examination and management, clinical material collection; Nikiforova, A.I. — PCR primer preparation, real-time PCR software debugging; Trofimov, D.Yu. — review of critically important material, approval of the manuscript for publication.

Conflict of interest: The authors declare that they do not have any conflict of interests.

For citation: Kuznetsova M.V., Svirepova K.A., Sogoyan N.S., Nikiforova A.I., Trofimov D.Yu. Real-Time Polymerase Chain Reaction as a Method of Express Genetic Typing of Patients with Uterine Leiomyoma: An Example of Three Genetic Polymorphisms. Doctor.Ru. 2021; 20(8): 7–11. (in Russian). DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-8-7-11

ВВЕДЕНИЕ

Миома матки является наиболее часто встречающимся доброкачественным новообразованием женской репродуктивной системы. Примерно 50% женщин репродуктивного возраста сталкиваются с данным заболеванием, а в перименопаузальный период этот показатель увеличивается до 70–80%. Кроме того, в последнее время случаи диагностики миомы матки у молодых пациенток до 30 лет значительно участились. Данное заболевание может серьезно осложнить наступление и течение беременности, поэтому ранняя диагностика и лечение миомы матки является крайне актуальной проблемой, особенно для пациенток репродуктивного возраста¹ [1].

Молекулярные механизмы, запускающие рост и развитие лейомиом, в последние годы изучают крайне интенсивно [2–4]. Уже определен ряд ключевых генов, мутации в которых отвечают за превращение клеток миоцитов (или их предшественников) в бесконтрольно делящиеся клетки, формирующие миоматозный узел. Известно, что каждый такой узел имеет моноклональное происхождение, а на скорость его роста влияют соматические мутации, произошедшие в клетке-предшественнице опухоли [5]. Поиск генетических маркеров, связанных с наследственными факторами развития миомы матки для преclinical диагностики и прогнозирования рисков развития и рецидивирования данного заболевания, является одной из самых актуальных задач как в научном, так и в прикладном аспекте, и находится на стыке гинекологии и молекулярной генетики.

В настоящее время опубликовано довольно много работ, посвященных выявлению наследственных факторов, участвующих в патогенезе миомы матки. Большая часть работ про-

ведена методом GWAS (genome-wide association studies — поиск ассоциаций путем полногеномного секвенирования), и полученные результаты позволили выявить целый ряд локусов, определенные генотипы которых коррелируют с наличием миомы матки у женщин [6, 7]. Основной проблемой таких исследований является тот факт, что при формировании новой выборки и при проверке ранее полученной корреляции конкретного генотипа с наличием заболевания результаты очень часто не подтверждаются, или статистическая значимость полученных корреляций сильно падает.

Целью нашего исследования было создание и тестирование методики генотипирования на основе ПЦР в реальном времени (real-time PCR). Данный метод может позволить быстро и недорого анализировать большие выборки образцов и проверять корреляцию между вариантами однонуклеотидных полиморфизмов и миомой матки у пациенток. В дальнейшем планируется создание панели генетических маркеров с высокой корреляцией для раннего тестирования и оценки вероятности развития заболевания еще до появления миом в репродуктивном возрасте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Пациенток набирали в гинекологическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Молекулярно-генетические исследования выполняли в лаборатории молекулярно-генетических методов Института репродуктивной генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Все пациентки,

Свирепова Ксения Александровна — врач клинической лабораторной диагностики лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. <https://orcid.org/0000-0001-8538-2375>. E-mail: kseswi@yandex.ru

Согоян Нелли Сергеевна — аспирант отделения оперативной гинекологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. <https://orcid.org/0000-0003-0001-1765>. E-mail: sogoyan.n@mail.ru

Никифорова Алена Игоревна — к. б. н., научный сотрудник ООО «НПФ ДНК-Технология». 109388, Россия, г. Москва, ул. Гурьянова, д. 83, стр. 1. E-mail: nikiforova@dna-technology.ru

Трофимов Дмитрий Юрьевич — д. б. н., профессор РАН, руководитель Института репродуктивной генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 3067-2804. <https://orcid.org/0000-0002-7179-5985>. E-mail: d.trofimov@dna-technology.ru

(Окончание. Начало см. на с. 7.)

¹ Адамьян Л.В., Андреева Е.Н., Артымук Н.В. и др.; Адамьян Л., ред. Миома матки: диагностика, лечение, реабилитация. Клинические рекомендации по ведению больных. М.; 2015. URL: <https://docs.cntd.ru/document/456019539>

включенные в исследование, подписали информированное согласие в 2-х экземплярах. Исследование одобрено комиссией по этике ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Участниц распределяли в подгруппы, данные по которым собирали отдельно, с учетом семейного анамнеза по миоме матки. Кроме того, в каждой подгруппе были выделены подгруппы пациенток с рецидивом миомы матки. В контрольную группу вошли пациентки ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России в постменопаузальном возрасте, чей анамнез не включал миому матки в настоящем или прошлом, и, согласно специально составленному опроснику, у близких родственниц также никогда не диагностировалась миома.

В качестве материала для исследований использовали венозную кровь, собранную по стандартной методике в вакутейнеры. ДНК из крови пациенток выделяли с помощью набора ExtractDNA Blood (Евроген, Россия). Все образцы были амплифицированы со специфичными для rs3020434, rs11742635, и rs12637801 парами праймеров (стандартный протокол ПЦР). Нуклеотидную последовательность ампликонов определяли с помощью секвенирования по методу Сэнгера на приборе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Последовательности ампликонов сопоставляли с соответствующими референсными последовательностями по каждому rs.

ПЦР в реальном времени проводили двумя методами:

1. ПЦР-типирование полиморфизмов с применением олигонуклеотидных зондов.
2. анализ кривых плавления с высоким разрешением (HRM-анализ, High Resolution Melting curve analysis).

Первая технология ПЦР-типирования полиморфизмов с применением олигонуклеотидных зондов предполагает наличие в смеси для амплификации зондов, строго соответствующих последовательности аллельных вариантов гена и меченых разными флуорофорами, а также зонда с гасителем флуоресценции. После амплификации целевого фрагмента гена температура реакционной смеси понижается, зонды с источником и гасителем флуоресценции гибридизуются в непосредственной близости на ДНК-матрице. Генотипирование осуществляется при температурной денатурации дуплексов зондов и фрагментов ДНК путем измерения флуоресценции в режиме «реального времени» [7]. С помощью программного обеспечения (ПО) эти данные преобразуются в график фор-

мата dF/dT (дифференциальная оценка скорости изменения флуоресценции), известный как кривая плавления.

Второй метод, HRM, основан на использовании интеркалирующих флуоресцентных красителей ДНК и анализе данных плавления с применением специальных алгоритмов. Как в предыдущем методе, генотипирование осуществляется по профилю кривой плавления, регистрируемой путем измерения флуоресценции ДНК-интеркалятора в ходе температурной денатурации двуцепочечных ПЦР-продуктов [8]. В отличие от ПЦР с олигонуклеотидными зондами метод позволяет регистрировать накопление продуктов амплификации (важно при учете влияния качества анализируемого препарата ДНК на результат генотипирования), предполагает сравнительно простой дизайн олигонуклеотидов (для ПЦР требуется только пара специфичных праймеров), характеризуется более высокой чувствительностью.

Учет и анализ результатов ПЦР проводили с помощью ПО RealTime PCR для детектирующих амплификаторов серии ДТ (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, Протвино). Анализ кривых плавления с высоким разрешением выполнен с помощью специального модуля HRM-анализа, интегрированного в RealTime PCR. В качестве флуоресцентного интеркалирующего красителя использовали EvaGreen (Biotium). Праймеры, фланкирующие rs3020434, для проведения HRM-анализа были подобраны с учетом отсутствия в их составе вторичных структур и повторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего по трем полиморфизмам, rs3020434, rs11742635 и rs12637801 (локализованным в генах *ESR1*, *FBN2* и *KCNMB2* соответственно), было проанализировано 344 образца:

- исследуемая группа — 294 пациентки с миомой матки, из них 98 женщин были с отягощенным анамнезом по миоме матки (лейомиома у родственниц первой линии родства);
- группа контроля — 50 пациенток в менопаузе без миомы матки и без данной патологии в семейном анамнезе.

Для каждого полиморфизма прямым секвенированием с двух праймеров были определены аллели, присутствовавшие в каждом образце ДНК, а также был проведен анализ частот генотипов среди общей выборки женщин (общая популяция), в группе контроля, в группе пациенток с миомой матки и отдельно в подгруппе пациенток с отягощенным анамнезом (табл.).

Таблица / Table

Частоты генотипов в исследованных группах и статистическая значимость различий между ними
Prevalence of genotypes in study groups and statistical significance of intergroup differences

Название полиморфизма / Polymorphism (SNP)	Варианты аллелей / Allele variant	Общая частота по выборке / Overall prevalence, n = 294	Группа контроля / Control group, n = 50	Общая группа с миомой матки / Uterine leiomyoma group, n = 244	I группа (ОА*) / Group I (HD*) n = 98	Уровень значимости различий между группой контроля и общей группой с миомой матки / Significance of differences between controls and subjects with uterine leiomyoma
rs3020434	CC	170 (58%)	23 (46%)	147 (60%)	59 (60%)	p = 0,037 p < 0,001 p = 0,250
	CT	59 (20%)	24 (48%)	85 (35%)	33 (34%)	
	TT	65 (22%)	3 (6%)	12 (5%)	6 (6%)	
rs11742635	GG	206 (70%)	35 (70%)	174 (71%)	71 (72%)	p = 0,274 p = 0,358 p < 0,001
	GT	67 (23%)	11 (22%)	58 (24%)	23 (23%)	
	TT	21 (7%)	4 (8%)	12 (5%)	4 (4%)	
rs12637801	CC	211 (72%)	24 (48%)	185 (76%)	77 (79%)	p < 0,001 p = 0,158 p < 0,001
	AC	65 (22%)	14 (28%)	49 (20%)	19 (19%)	
	AA	18 (6%)	10 (20%)	10 (4%)	2 (2%)	

* — Пациентки с отягощенным анамнезом (группа ОА).

* — Patients with a history of the disease (HD group).

Как видно из *таблицы*, в группе контроля мы обнаружили значимые отличия в частотах генотипов по всем трем исследованным полиморфизмам. Генотипы, содержащие минорные аллели, у женщин без миомы матки (то есть в группе контроля) встречаются чаще — как в виде гомозигот, так и в составе гетерозигот.

Выявленные соотношения генотипов можно рассматривать как вероятное следствие «протективности» этих вариантов в отношении миомы матки. То есть наличие такого минорного аллеля у женщин без миомы матки (и без случаев миомы матки в семье) позволяет нам высказать гипотезу, что этот генотип коррелирует с более низкой вероятностью развития данного заболевания.

Для проверки данной гипотезы требуется анализ более обширных выборок, однако секвенирование по Сэнгеру является довольно дорогим и трудозатратным методом. Чтобы найти альтернативный метод генотипирования образцов по полиморфизмам rs3020434, rs11742635, rs12637801, было решено использовать метод ПЦР в режиме реального времени.

Для первого этапа были синтезированы зонды для ПЦР в реальном времени, специфичные для аллелей «С» и «Т» rs3020434, при этом один зонд был помечен флуорофором FAM, а другой — флуорофором HEX. При ПЦР в реальном времени со стандартными праймерами и с добавлением зондов генотип

«ТТ» давал более низкий пик плавления, генотип «СС» — более высокий пик плавления, а гетерозиготный генотип «СТ» — два пика, соответствовавших каждому аллелю (*рис. 1*).

На втором этапе был отработан метод генотипирования по трем полиморфизмам на основе анализа кривых плавления с высоким разрешением (HRM). Генотипирование осуществлялось по профилю кривой плавления за счет измерения интенсивности флуоресценции ДНК-интеркалятора в ходе температурной денатурации двуцепочечных ПЦР-продуктов, полученных с уникальных пар праймеров, специфичных для каждого полиморфизма.

На *рисунке 2* представлен анализ одной и той же выборки образцов обоими методами. Практически по всем исследованным образцам были получены идентичные результаты генотипирования, соответствовавшие генотипам, ранее определенным с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру. В единичных случаях образцы были отбракованы алгоритмом вследствие недостаточного уровня амплификации ДНК. Оба метода продемонстрировали высокую специфичность в определении принадлежности образцов к одному из трех возможных генотипов (на *рисунке 2* они выделены разными цветами).

На *рисунке 3* показан результат постановки 96 образцов за один прогон прибора, как это реализовано в программном обеспечении: каждый генотип обозначен своим

Рис. 1. Результаты генотипирования образцов по rs3020434. Гомозиготные генотипы имеют один пик плавления, гетерозиготные — два

Fig. 1. Rs3020434 genotyping results. Homozygous genotypes have one melting peak, while heterozygous genotypes have two

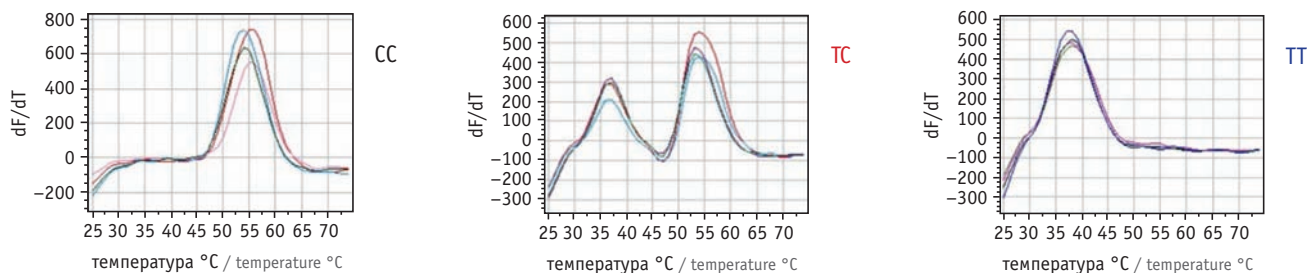


Рис. 2. Сопоставление методов ПЦР-типирования полиморфизмов с применением олигонуклеотидных зондов (А) и высокоразрешающего плавления (HRM) (В).

А. Кривые плавления. Гомозиготные генотипы «ТТ» обозначены красным цветом, гетерозиготные «СТ» — зеленым, гомозиготные «СС» — синим.

В. Кривые плавления HRM. Гомозиготные генотипы «ТТ» обозначены красным цветом, гетерозиготные «СТ» — зеленым, гомозиготные «СС» — синим

Fig. 2. Comparison of PCR methods for polymorphism typing using oligonucleotide probes (A) and high-resolution melting (HRM) (B)

A. Melting profiles. Homozygous TT genotypes are marked with red, heterozygous CT genotypes — with green, while homozygous CC genotypes are marked with blue

B. HRM melting profiles. Homozygous TT genotypes are marked with red, heterozygous CT genotypes — with green, while homozygous CC genotypes are marked with blue

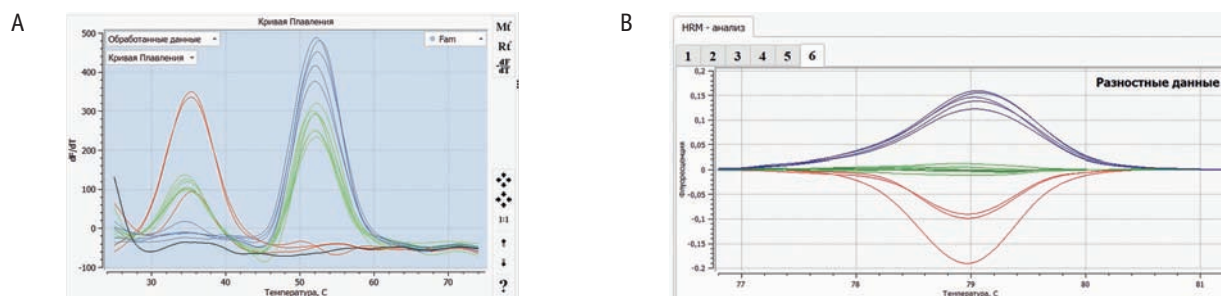
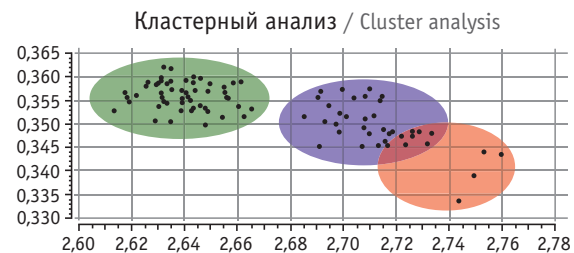
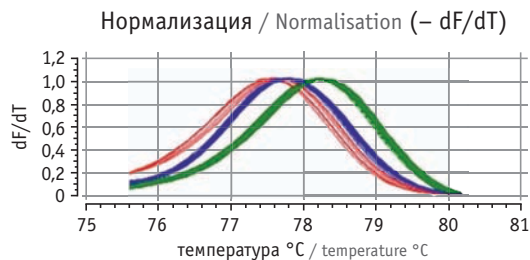


Рис. 3. Генотипирование 96 образцов. Гомозигота редкого аллеля обозначена красным цветом, гетерозигота — синим, гомозигота частого аллеля — зеленым

Fig. 3. Genotyping of 96 samples. Rare allele homozygote is marked with red, heterozygote — with blue, while frequent allele homozygote is marked with green



цветом как в таблице с образцами, так и на графике плавления. Таким образом, на выходе за одну постановку мы можем получить результаты по 96 генотипированным образцам за 3 часа рабочего времени, включающего в себя этап поставки реакции ПЦР и работы прибора, тогда как секвенирование по Сэнгеру состоит из нескольких этапов (постановки сиквенс-ПЦР, очистки полученных ампликонов, внесения образцов в плашку для сиквенсного анализа, работы секвенатора и последующего анализа полученных нуклеотидных последовательностей отдельно по каждому образцу).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод ПЦР в реальном времени может быть использован для быстрого и эффективного анализа однонуклеотидных поли-

морфизмов, связанных с развитием миомы матки. При этом оба метода (ПЦР-типирование с применением олигонуклеотидных зондов и анализ кривых плавления с высоким разрешением), протестированные в данной работе, позволяют получать однозначные результаты для 97–99% образцов.

Полученные данные о частотах генотипов однонуклеотидных полиморфизмов позволяют оценить риск развития и рецидивирования миомы матки у женщин репродуктивного возраста. При анализе достаточно больших выборок возможно определить ряд «маркерных полиморфизмов» для данного заболевания и создать панель таких генетических признаков, что в будущем позволит оценивать вероятность предрасположенности к миоме матки у женщин до появления заболевания.

Благодарность: авторы выражают огромную благодарность всем сотрудникам гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России за помощь в сборе материала, а также сотрудникам Биобанка этого учреждения за создание коллекции образцов тканей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Stewart E.A. *Clinical practice. Uterine fibroids*. N. Engl. J. Med. 2015; 372(17): 1646–55. DOI: 10.1056/NEJMcsp1411029
2. George J.W., Fan H., Johnson B. et al. *Integrated Epigenome, Exome, and Transcriptome Analyses Reveal Molecular Subtypes and Homeotic Transformation in Uterine Fibroids*. Cell Rep. 2019; 29(12): 4069–85.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.11.077
3. Baranov V.S., Osinovskaya N.S., Yarmolinskaya M.I. *Pathogenomics of Uterine Fibroids Development*. Int. J. Mol. Sci. 2019; 20(24): 6151. DOI: 10.3390/ijms20246151
4. Mehine M., Kaasinen E., Heinonen H.-R. et al. *Integrated data analysis reveals uterine leiomyoma subtypes with distinct driver pathways and biomarkers*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2016; 113(5): 1315–20. DOI: 10.1073/pnas.1518752113
5. Согоян Н.С., Кузнецова М.В., Асатурова А.В. и др. *Соматические мутации в экзоне 2 гена MED12 у женщин с одиночной и множественной миомой матки*. Акушерство и гинекология. 2018; 12: 63–70. [Sogoyan N.S., Kuznetsova M.V., Asaturova A.V. et al. *Somatic mutations in MED12 gene exon 2 in women with a single uterine fibroid or multiple ones*. Obstetrics and Gynecology. 2018; 12: 63–70. (In Russian)]. DOI: 10.18565/aig.2018.12.63-70
6. Rafnar T., Gunnarsson B., Stefansson O.A. et al. *Variants associating with uterine leiomyoma highlight genetic background shared by various cancers and hormone-related traits*. Nat. Commun. 2018; 9(1): 3636. DOI: 10.1038/s41467-018-05428-6
7. Кофиади И.А., Ребриков Д.В. *Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой*. Генетика. 2006; 42(1): 22–32. [Kofiyadi I.A., Rebrikov D.V. *Methods for detection of single nucleotide polymorphisms: allele-specific PCR and hybridization with an oligonucleotide probe*. Russian Journal of Genetics. 2006; 42(1): 22–32. (in Russian)]
8. Słomka M., Sobalska-Kwapis M., Wachulec M. et al. *High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping-Limitations and Caveats in Practical Case Studies*. Int. J. Mol. Sci. 2017; 18(11): 2316. DOI: 10.3390/ijms18112316

Поступила / Received: 17.08.2021

Принята к публикации / Accepted: 30.08.2021