

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT, MIKROBIOLOOGIA OSAKOND
TALLINNA ÜLIKOOL
LOODUS- JA TERVISETEADUSTE INSTITUUT

Korduva vaginiidi geneetilised riskifaktorid Eesti populatsioonis

Magistritöö

Biomeditsiin

30 EAP

Evelin Mutli

Juhendajad
Vanemteadur Triin Laisk
Lektor Kairi Koort
Professor Reet Mändar

Tartu 2020

Korduva vaginiidi geneetilised riskifaktorid Eesti populatsioonis

Vaginiit ehk tupepõletik on üks peamiseid põhjuseid, miks naised külastavad günekoloogi. Kõige sagedasemateks diagnoosideks on bakteriaalne vaginoos või vulvovaginaalne kandidaas, mis paljudel juhtudel alluvad halvasti ravile ja kipuvad korduma. Seisund on harva eluohtlik, kuid tegemist on väga ebamugava haigusega, põhjustades tupes, valu, ärritust, probleeme sugueluga, ebameeldivat lõhna, sügelust ning vooluse värvi, konsistentsi ja koguse muutust. Viimastel kümnenditel on püütud leida vaginiidi seost geneetikaga, mis aitaks paremini mõista korduva vaginiidi tekkepõhjuseid, kuid kahjuks pärinevad senised tulemused väiksemahulistest kandidaatgeenide uuringutest, mistõttu on inimese geenide roll vaginiitide tekkes endiselt ebaselge. Üheks usaldusväärseks uurimise võimaluseks on ülegenoomne assotsiatsioonianalüüs, mille käigus analüüsitakse suure valimi miljoneid geenivariante üle kogu genoomi, et identifitseerida genotüübi ja fenotüübi vaheline assotsiatsioon.

Märksõnad: bakteriaalne vaginoos, vulvovaginaalne kandidaas, vaginiit, GWAS

CERCS kood: B110 Bioinformaatika, meditsiiniinformaatika, biomatemaatika, biomeetrika; B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The genetic risk factors for recurrent vaginitis in Estonia

Vaginitis is the leading reason for visiting a gynaecologist, with bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis being the most common diagnoses. Unfortunately, the treatment efficiency is low and recurrent episodes are frequent. Vaginitis is rarely life-threatening, but has a serious impact on women's quality of life causing irritation, soreness, problems with sexual relationships, itching, unpleasant odour and abnormal vaginal discharge.

In recent decades, many studies have tried to associate vaginitis with genetics to better understand the causes of recurrent vaginitis, but the etiology of the disease remains unknown. One of the best approaches for genetic studies is genome-wide association study, analysing millions of variants in the whole genome to find associations between genotype and phenotype.

Keywords: bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis, vaginitis, GWAS

CERCS code: B110 Informatics, medical informatics, biomathematics, biometrics; B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Naissuguteede mikroobikooslused	7
1.1.1. Naissuguteede mikrobiota koostis	7
1.1.2. Naissuguteede mikrobiota tähtsus	9
1.2. Vaginiitide olemus ja esinemise vormid	9
1.2.1. Bakteriaalne vaginoos	12
1.2.2. Vulvovaginaalne kandidaas	14
1.3. Inimese genoomi ja mikrobioomi vaheline koosmõju	15
1.3.1. Näiteid genoomi-mikrobioomi interaktsioonidest.....	15
1.3.2. Vaginiitide geneetiline eelsoodumus.....	16
1.4. Inimese geneetiline varieeruvus ja GWAS analüüs	17
1.4.1. Ülegenoomsetes assotsiatsiooniuuringutes kasutatavad markerid	18
1.4.2. GWAS ja kandidaatgeenide uuringu võrdlus	19
2. EKSPERIMENTAALOSA	20
2.1. Töö eesmärk	20
2.2. Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1. Valim	20
2.2.2. Elustiili ja tervise andmete analüüs	21
2.2.3. Genotüpiseerimine, kvaliteedikontroll ja imputeerimine	21
2.2.4. GWAS analüüs SAIGE tarkvaraga	22
2.2.5. GWAS tulemuste annoteerimine FUMA platvormil.....	23
2.2.6. Tulemuste visualiseerimine LocusZoom tarkvaraga.....	25
2.2.7. Teaduskirjandusest kandidaatgeenide leidmine	26
2.3. Tulemused	26
2.3.1. Elustiili ja tervise küsimustiku andmete tulemused	26
2.3.2. Üksikmarkeri assotsiatsioonianalüüs korduva vaginiidi esinemisel	29
2.3.3. Geenipõhine assotsiatsioonianalüüs	29

2.3.4. Kandidaatvariandid.....	31
2.4. Arutelu.....	39
Kokkuvõte	42
Resümees/Summary.....	44
Tänuõnad.....	46
Kasutatud kirjandus	47
Kasutatud veebiaadressid	64
LISAD	65
Lisa 1.	65
Lisa 2.	67
Lisa 3.	70
Lisa 4.	71
Lisa 5.	72
Lisa 6.	73
Lisa 7.	74
Lisa 8.	75
Lisa 9.	76
Lisa 10.	77
Lihtlitsents	79

Kasutatud lühendid

A63.8	Peamiselt suguliselt levivad muud täpsustatud haigused (siin ja edaspidi RHK-10 klassifikatsiooni alusel) (<i>Other specified predominantly sexually transmitted diseases</i>)
AMP	Antimikroobne peptiid (<i>Antimicrobial peptides</i>)
B37.3	Häbeme- ja tupekandidaas (<i>Candidiasis of vulva and vagina</i>)
BV	Bakteriaalne vaginosis (<i>Bacterial vaginosis</i>)
CADD	skoor SNP-le olenevalt tema mõjust valgu struktuurile või funktsioonile (<i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>)
CARD15	Kaspaasi värbamisdomeeni sisaldav geen 15 (<i>Caspase recruitment domain-containing protein 15</i>)
CD	CD-rakkude pinnatunnuste klassifitseerimissüsteem (<i>Cluster of differentiation</i>)
CpG	Tsütosiini-guaaniinjärjestuste klastrid (<i>Cytosine-phosphate-guanine</i>)
CR	Indiviidi edukalt genotüpiseeritud markerite protsentuaalne osakaal (<i>Call Rate</i>)
D25.1	Emaka intramuraalne leiomyoom (<i>Intramural leiomyoma of uterus</i>)
DEFB1	Beeta-defensiin 1 geen (<i>Defensin Beta 1</i>)
DIV	Deskvamatiivne põletikuline vaginiit (<i>Desquamative inflammatory vaginitis</i>)
eQTL	Ekspressiooni kvantitatiivse tunnuse lookused (<i>Expression quantitative trait loci</i>)
GWAS	Ülegenoomne assotsiatsiooniuuring (<i>Genome-wide association study</i>)
HI-C	kromatiininteraktsiooni analüüsi meetod (<i>Method for analyzing chromatin interactions</i>)
HLA	Inimese leukotsüüdi antigeen (<i>Human leukocyte antigen</i>)
HWE	Hardy – Weinbergi tasakaalustamatus (<i>Hardy – Weinberg Equilibrium</i>)
KRT6A	Keratiin 6A valku kodeeriv geen (<i>Keratin 6A proteiin coding gene</i>)
LBP	Lipopolüsahhariide siduva valgu geen (<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>)
LD	Aheldatuse tasakaalustamatus (<i>Linkage disequilibrium</i>)
MAF	Harvema alleeli sagedus (<i>Minor Allele Frequency</i>)
MD2	Müeloidi diferentseerumise valk-2 geen (<i>Myeloid Differentiation Protein-2</i>)
MYD88	Müeloidi diferentseerumise primaarse vastusegeen 88 (<i>Myeloid differentiation primary response protein</i>)
N72	Emakakaela põletikuline haigus (<i>Inflammatory disease of cervix uteri</i>)
N76.0	Äge tupepõletik (<i>Acute vaginitis</i>)
N76.1	Alaäge ja krooniline vaginiit (<i>Subacute and chronic vaginitis</i>)

N86	Emakakaela erosioon ehk limaskestamarrastus ja ektoopion ehk väljapööre (<i>Erosion and ectropion of cervix uteri</i>)
NF- κ B	Tuumafaktor-kappa B geen (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
PMN	Polümorfonuklearsed leukotsüüdid (<i>Polymorphonuclear leukocytes</i>)
PMÜ/g	Pesa moodustavat ühikut 1 grammi kohta
PRR	Molekulaarseid mustreid ära tundvad retseptorid (<i>Pattern recognition receptor</i>)
RDB	RegulomeDB skoor 1-7, kus madalam skoor näitab suuremat regulaatorset funktsiooni tõenäosust
RHK-10	Rahvusvaheline haiguste ja nendega seotud terviseprobleemide statistiline klassifikatsioon (<i>The International Statistical Classification of Diseases and Related Health problems, ICD-10</i>), kümnes väljaanne Maailma Terviseorganisatsiooni poolt (<i>World Health Organization, WHO</i>)
SIGIRR	Üksik immunoglobuliini interleukin 1 retseptoriga seotud geen (<i>Single immunoglobulin interleukin-1-related receptor</i>)
SNP	Ühenukleotiidne polümorfism (<i>Single nucleotide polymorphisms</i>)
SNV	Üksiknukleotiidne variant (<i>Single nucleotide variant</i>)
Z30.4	Kontratseptiivsete ravimite järelvalve (<i>Surveillance of contraceptive drugs</i>)
T2DM	2. tüüpi diabeet (<i>Type 2 diabetes</i>)
TLR	Tolli-laadne retseptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	Tuumorinekroosifaktor geen (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TRAF6	Tuumornekroosifaktori retseptoriga seotud faktor 6 geen (<i>Tumor necrosis factor receptor associated factor 6</i>)
TRIF	TIR domääni sisaldav adaptorit indutseeriv interferoon- β geen (<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>)
TÜ EGV	Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu (<i>Estonian Genome Center, University of Tartu, EGCUT</i>)
VVC	Vulvovaginaalne kandidaas (<i>Vulvovaginal candidiasis</i>)

Sissejuhatus

Vaginiit ehk tupepõletik on naiste seas üks levinumaid haiguseid, põhjustades tupes ebamugavustunnet, valu, ärritust, ebameeldivat lõhna, sügelust ning vooluse konsistentsi, värvi ja koguse muutust. Kõige levinumateks diagnoosideks on bakteriaalne vaginosis ning vulvovaginaalne kandidaas, kus korduvinfektsioon ja ravimiresistentsus on väga sagedaseks probleemiks. Haigus on harva eluohtlik, kuid seda seostatakse raseduse katkemise, enneaegse sünnituse, koorioamniotiidi, sünnitusjärgse endometriidi ja sugulisel teel levivate haiguste suurema riskiga.

Haiguse kordumise põhjuste väljaselgitamiseks on viimasel kümnendil teostatud mitmeid bakteriaalse vaginosisi ja vulvovaginaalse kandidaasiga seotud kandidaatgeenide uuringuid, mis kõik toetuvad immuungeenidele, kuid jätkuvalt puudub lõplik selgus korduva vaginiidi geneetilistest riskifaktoritest. Genotüübi ja fenotüübi vahelise seose leidmisel on üheks parimaks meetodiks ülegenoomne assotsiatsiooniuring (GWAS), mille käigus analüüsitakse ja võrreldakse tervete ja uuritava fenotüübiga valimis geneetiliste variantide esinemissagedust. Kuna Eestis ei ole varasemalt vaginiidi geneetilist eelsoodumust uuritud, ning puuduvad ka vastavad GWAS uuringud, siis otsustati antud töös kasutada Eesti Geenivaramu andmeid ning hüpoteesivaba GWAS analüüsi, mis aitaks kaasa haiguse geneetilise tausta paremale mõistmisele ning tulevikus paremate ravivõimaluste leidmisele.

Käesolev magistritöö on valminud koostöös Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu, Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia instituudi, Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemediitsiini instituudi mikrobioloogia osakonna ning Tallinna Ülikooli Loodus- ja terviseteaduste instituudiga.

Töö eesmärgiks on leida GWAS uuringu käigus korduvate vaginiitidega seotud geneetilised riskifaktorid ja võrrelda tervete ja uuritava fenotüübiga valimi elustiili- ja terviseandmeid.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Naissuguteede mikroobikooslused

Inimese keha on koduks mitmetele kommensaalsetele, sümbiootilistele ja oportunistlikele mikroorganismidele, mis üheskoos moodustavad inimese mikroobikoosluse ehk mikrobiota ehk mikrofloora (Marchesi ja Ravel, 2015). Kui kooslus on tehtud kindlaks molekulaar-geneetiliste uuringute abil, mis võimaldavad määrata üksnes mikroobide genoomi, siis nimetatakse tulemust mikrobiomiks. Seega on mikrobiom kõigi inimkehas elavate mikroobide genoomide kogum. Kuna tänapäeval kasutatakse mikrobiota uurimiseks enamasti molekulaar-geneetilisi meetodeid, siis kasutatakse mõisteid 'mikrobiota' ja 'mikrobiom' sageli paralleelselt.

Inimese mikrobiota koostisse kuuluvad erinevad bakterid, arhed, protistid, seened ja viirused, mis varieeruvad erinevates keha piirkondades ja indiviiditi (*The Human Microbiome Project Consortium*, 2012). Oma mikrobiota on näiteks nahal, seemnevedelikus, piimanäärmetes, sülses, suu limaskestal, munasarja folliikulites, emakas, tupes, platsental, kopsudes, seedetraktis ja konjunktiivil (Willey et al., 2013). Mikrobiotal on inimese kehas mitmeid olulisi ülesandeid, kuid teatud tingimustel võivad mõned mikrobiota liikmed põhjustada oportunistlikke infektsioone. Seetõttu on inimese mikrobiota uurimise peamine eesmärk mõista tema tähtsust tervise tagamisel ja haiguste kujunemisel.

1.1.1. Naissuguteede mikrobiota koostis

Naissuguteedes leidub normaalset mikrobiotat eelkõige tupes, emakakaelas ja välisgenitaalidel. Ülemisi suguteid peeti kaua aega mikroobivabaks, kuid uue põlvkonna sekveneerimise meetodid on ka sealt leidnud mikroobide jälgi (Chen et al., 2017). Funktsionaalselt kõige olulisem on naise jaoks tupe mikrobiota.

Naise tupp koosneb koetasemel limaskestast, lihast ja adventiitsiast. Limaskesta kihis on arvukalt voldikesi, mida nimetatakse kurdudeks. Kurdudel on kaks kihti: kihistunud lameepiteel ja lahtine sidekude *lamina propia*, mis ühendab epiteeli lihaskihiga. Lameepiteel ongi see koht, mille peal vaginaalsed mikroorganismid resideeruvad ja mängivad olulist rolli naise günekoloogilise heaolu säilitamisel ja patogeenidega võitlemisel.

Terve naise tupe mikrobiota koosneb aeroobsetest, fakultatiivselt anaeroobsetest ja anaeroobsetest mikroorganismidest, mille kõige domineerivamaks perekonnaks on fakultatiivselt anaeroobsed ja anaeroobsed laktobatsillid (Brotman, 2011; Cherpes et al., 2003; Donders et al., 2000; Gupta et al., 1998; Lai et al., 2009; Martin et al., 1999; Pybus ja Onderdonk, 1999; Ryckman et al., 2009a; Sobel, 1999, 2000; Taha et al., 1998; Watts et al., 2005; Wiesenfeld et al., 2003). Laktobatsillid on Gram-positiivsed pulkbakterid, mis on

võimelised koloniseeruma tupe limaskest. Terves tupe leidub vaginaalsekreedi kohta keskmiselt 10^7 - 10^8 PMÜ/g laktobatsilli (Farage et al., 2010). Fertiilses eas terve naise domineerivateks liikideks on *Lactobacillus crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* ja *L. jensenii*. Kõik need laktobatsillide liigid produtseerivad nii D - kui L -kiraalseid piimhappe isomeere, v.a *L. iners*, millel puudub D -laktaathappe dehüdrogenaasi kodeeriv geen (Mendes-Soares et al., 2014).

Lisaks laktobatsillidele leidub tupe mitmeid muid baktereid (Oakley et al., 2008; Van De Wijgert et al., 2014; Zhou et al., 2007). Fakultatiivselt anaeroobsetest ja obligatoorselt anaeroobsetest domineerivad *Gardnerella*, *Atopobium* ja *Prevotella*, mille suuri hulki seostatakse bakteriaalse vaginosisiga (Jespers et al., 2012; Jacques Ravel et al., 2011). Peale nende leiduvad reproduktiivses eas terve naise tupe mikrobiotas veel järgmised perekonnad: *Megasphaera*, *Sneathia*, *Streptococcus*, *Dialister*, *Lachnospira*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Eggerthella*, *Finegoldia*, *Rhodobaca*, *Anaerotruncus*, *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, *Aerococcus*, *Parvimonas*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ja *Veillonella* (Ravel et al., 2011).

Naise elu jooksul toimuvad tupe olulised mikrobiota koosseisu muutused. Sünnimisel, puberteedieas, menopausil ja üleminekuetappidel on suguhormoonide tasakaal naise organismis erinev ning mängib olulist rolli tupe mikroobide koostise stabiilsuses (Brotman et al., 2014; Hickey et al., 2012; Hyman et al., 2012; Yamamoto et al., 2009). Östrogeeni mõjul deponeeritakse tupe glükogeeni. α -amülaas lagundab glükogeeni maltoosiks, samuti esinevad ka maltotriios ja alfa-dekstriinid. Laktobatsillid utiliseerivad neid glükogeeni laguprodukte, et toota piimhapet, mis teeb tupe keskkonna happeliseks (Nasioudis et al., 2015; Spear et al., 2014). Kui tupe pH tase on 3,0-4,5, siis teiste mikroobide kasv on pärsitud (Alakomi et al., 2000; O'Hanlon et al., 2011a, 2013). Naistel, kellel domineerivaks mikroobiks ei ole laktobatsillid, võivad mõned teised bakterid nagu *Atopobium*, *Megasphaera* ja *Leptotrichia* osaliselt piimhappe tootmise funktsiooni täita (Zhou et al., 2004).

Hormonaalsed, tupe pH või glükogeeni taseme muutused mõjutavad laktobatsillide võimet kinnituda epiteelrakkudele ning nende arvukus võib väheneda (Galask, 1988). On leitud, et tupe keskkonna stabiilsus sõltub sellest, missugune bakter on seal kõige domineerivam. Uuringud on kinnitanud, et naistel, kellel domineerib *L. crispatus* liik, on kõige stabiilsem tupe mikrobiota, samal ajal kui *L. iners* domineerimise korral on tupe mikrobiota oluliselt muutlikum ning need naised on rohkem altid bakteriaalse vaginosisi kujunemisele (Marrazzo et al., 2012; Mitchell et al., 2012; Petricevic et al., 2012; Verstraelen et al., 2009).

1.1.2. Naissuguteede mikrobioota tähtsus

Mikrobiootal on väga suur roll naissuguteede tervise tagamisel. Peamiselt täidavad seda rolli laktobatsillid. Nad aitavad kaitsta näiteks bakteriaalse vaginoozi, seeninfektsioonide, seksuaalsel teel levivate haiguste, kuseteede infektsioonide ja osaliselt ka HIV infektsiooni vastu (Brotman, 2011; Cherpès et al., 2003; Donders et al., 2000; Gupta et al., 1998; Lai et al., 2009; Martin et al., 1999; Pybus ja Onderdonk, 1999; Ryckman et al., 2009a; Sobel, 1999, 2000; Taha et al., 1998; Watts et al., 2005; Wiesenfeld et al., 2003; van de Wijgert, 2017).

Kaitsefunktsiooniga on seotud mitmed laktobatsillide metaboliidid, sh piimhape, vesinikperoksiid ja mitmed antimikroobsed valgud (Duerr, 2003). Piimhapet toodab östrogeeni mõjul tupeepiteel ise ning samuti toodavad seda sealseid laktobatsillid (Dover et al., 2008; O'Hanlon et al., 2011b). Happelises pH keskkonnas on laktobatsillid võimelised ise agregeeruma ja kinnituma tupe epiteelrakkude pinnal olevatele glükoproteiinidele, takistades sellega teiste mikroorganismide kinnitumist (Nagy et al., 1992).

Toodetud hape takistab ka mitmete oportunistlike ja patogeensete mikroobide paljunemist. Samuti on mõnedel laktobatsilli tüvedel (nt. *L. crispatus* ja *L. jensenii*) võime toota patogeensete ja võõrorganismide kasvu piiramiseks märklaua-spetsiifilisi antimikroobseid valke ehk bakteriotsiine ja vesinikperoksiidi (H₂O₂). Bakteriotsiinide aktiivsus on mõjutatud vesinikioonide kontsentratsioonist, mis koostöös permeabiliseerivad märklaudraku membraani (Dembélé et al., 1998; Oscáriz ja Pisabarro, 2001; Skarin ja Sylwan, 2009). Seega on tupe mikrobioota antimikroobne toime bakteriaalsete patogeenide vastu mitmefaktoriline ning hõlmab nii kinnituskohdade blokeerimist kui ka vesinikperoksiidi, piimhappe ja bakteriotsiinide tootmist (Servin, 2004).

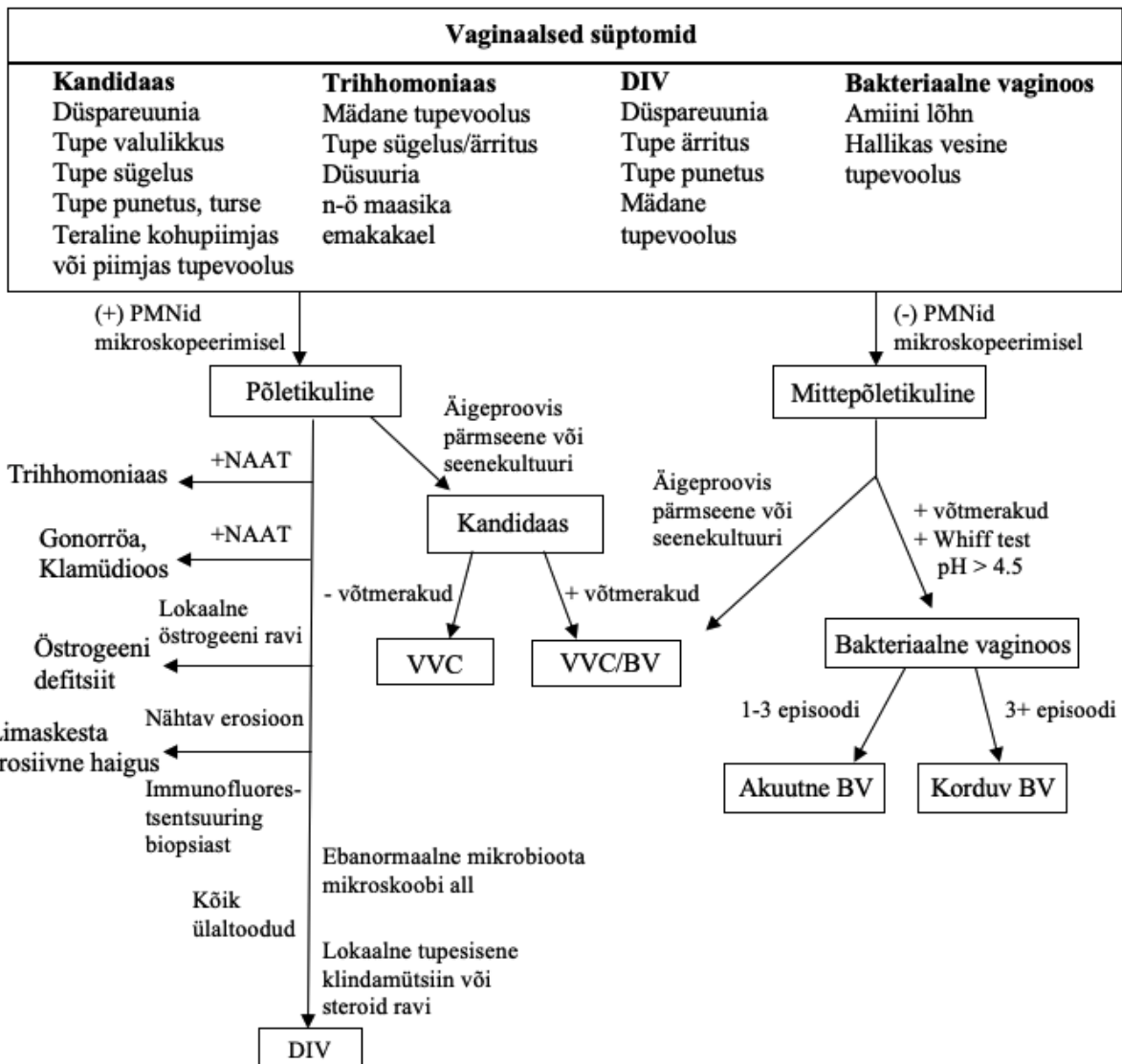
1.2. Vaginiitide olemus ja esinemise vormid

Vaginiit ehk tupepõletik on üks peamiseid põhjuseid, miks naised külastavad günekoloogi (Lipsky et al., 2000). Sellest hoolimata lahkuvad 30% patsientidest ilma selge diagnoosita või kogeivad pärast ravi samu sümptomeid (Anderson, 2004). Vaginiit on harva eluohtlik, kuid siiski väga ebamugav haigus, põhjustades tupes ebamugavustunnet, valu, ärritust, probleeme sugueluga, ebameeldivat lõhna, sügelust ning vooluse värvi, konsistentsi ja koguse muutust. Kliinilise pildi ja sümptomite alusel saab vaginiite jagada kaheks: mittepõletikuliseks ja põletikuliseks (Joonis 1). Kui tupevooluse mikroskoopilisel vaatlusel esinevad polümorfonukleaarsed leukotsüüdid (PMN) ning kliiniliselt on näha punetust ja turset, viitab see põletikulisele vaginiidile. Mittepõletikulisele seisundile on iseloomulik ülalnimetatud sümptomite puudumine ja mikroskoopilisel vaatlusel PMN-de puudumine, kuid samas esineb vaginaalseid kaebusi nagu ebameeldiv lõhn või muutunud tupevoolus (Neal et al., 2019).

Kõige sagedasem mittepõletikuline seisund on bakteriaalne vaginoos (BV), mis võib esineda ka asümptomaatiliselt (Ledger ja Monif, 2004; Sobel, 2007).

Põletikulistel vaginiidivormidel on sarnane kliiniline spekter, kuid erinev etioloogia ja ravivastus. Kõige tavalisemad põletikulise vaginiidi vormid on trihhomoniasis ja vulvovaginaalne kandidaas (VVC). Harvemini esineb atroofiline vaginiit, mis on seotud östrogeenide taseme langusega vanemas eas. Selle tulemusel tupe limaskest õheneb ning laktobatsillide arvukus seetõttu langeb, sümptomiteks on tupe sügelemine, veritsus, kuivus, valu urineerimisel (Ferri, 2016). Harva esinevad veel deskvamatiivne põletikuline vaginiit (DIV) ja multi-mukoosne erosiivne vaginiit (Mills, 2017; Paavonen ja Brunham, 2018; Reichman ja Sobel, 2014). Tegemist on autoimmuunhaigustega, mille tulemusena võivad tekkida limaskestade nagu suu, söögitoru, silmalaugude või tupe pinnale erosioon ja villid. Üldjuhul on laktobatsillide domineerimine naise tupest oluline patogeenidega võitlemisel, kuid nende liigne domineerimine ei ole samuti kasulik. Kui reproduktiivses eas naisel hakkavad laktobatsillid liigselt vohama, siis põhjustab see tupe epiteelrakkude lüüsi (Cibley ja Cibley, 1991; Nasielli et al., 1972). Tekib tsütolüütiline vaginoos ehk Döderleini tsütolüüs, mille sümptomiteks on tupe kihelus, põletustunne ning kandidaasile sarnane kohupiimjas voolus (Cibley ja Cibley, 1991).

Vaginiidi kaebustega günekoloogi poole pöördunud naistest ligi 40%-50% diagnoositakse bakteriaalne vaginoos, 20%-25% juhtudel vulvovaginaalne kandidaas ning 15%-20% trihhomoniasis (Mulley, 2000). Harvemini on vaginiidi sümptomid seotud teiste vaginiidi tüüpidega (Tabel 1).



Joonis 1. Vaginiidi diagnoosimine sümptomite ja testimise alusel (modifitseeritud Neal et al. 2019 ja Reichman ja Sobel 2014 järgi). NAAT - nukleiinhappe amplifikatsiooni test haigustekitaja tuvastamiseks; DIV – deskvamatiivne põletikuline vaginiit; VVC – vulvovaginaalne kandidaas; BV – bakteriaalne vaginoos; PMN – polümorfonuklearsed leukotsüüdid.

Tabel 1. Mikrobioota muutused erinevate vaginiitide korral.

Vaginiidi tüüp	Etioloogia	Viide
Bakteriaalne vaginoos	Laktobatsillid puuduvad või nende hulk on oluliselt vähenenud. Domineerivad <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Atopobium vaginae</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Sneathia</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Eggerthella</i> jpt.	Burton et al., 2004; G. B. Hill, 1993; Martinez et al., 2008; Oakley et al., 2008; Onderdonk et al., 2016; Ravel et al., 2011; Reid ja Devillard, 2004
Vulvovaginaalne kandidiaas	<i>Candida albicans</i> ’i vohamine. Harvem <i>Candida glabrata</i> või teised <i>Candida</i> liigid.	Eckert, 1998; Sobel, 2007
Trihhomonias	Tekitajaks on seksuaalselt ülekantav algloom <i>Trichomonas vaginalis</i> . Kaasneda võib mikrobioota düsbioos.	Heine ja McGregor, 1993
Tsütolüütiline vaginoos	Laktobatsillide liigne vohamine.	Cerikcioglu ja Beksac, 2004
Laktobatsilloos	Pikkade kõverate anaeroobsete laktobatsillide esinemine.	Bibbo ja Harris, 1972
Aeroobne vaginiit	Aeroobsete B-grupi streptokokkide <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> ja enterokokkide domineerimine.	Tempera et al., 2006
Allergiline vaginiit	IgE vahendatud allergiline reaktsioon, mille põhjustajaks võivad olla sperma, <i>Candida albicans</i> , seep, rasestumisvastased vahendid, inhalaatorid, lokaalsed ravimid, toit, pesumaterjal, lateks vms.	Chiu et al., 1999; Fry et al., 1999; Haddad, 1978; Levy et al., 1998; Moraes ja Taketomi, 2000; Witkin et al., 1988
Atroofiline vaginiit	Östrogenide taseme langusest tupelimaskest õheneb.	Ferri, 2016

1.2.1. Bakteriaalne vaginoos

Naise reproduktiivtrakti mikrobioota tasakaal kõigub suurtes piirides, kuna seda mõjutavad väga paljud endo- ja eksogeensed tegurid, sh östrogeni ja pH tase, antimikroobsete ainete manustamine, rasedus, rasedusvastaste vahendite kasutamine, seksuaalaktiivsus, liibuv

kunstmaterjalist aluspesu ja menstruatsioon (Hillier, 2005). Mõnel naisel on tupe mikrobioota sellistele mõjudele vastupidavam, teistel aga võib laktobatsillide ülekaaluga mikrobioota muutuda lühikese ajaga laktobatsillide vaeseks (Spear et al., 2007). Tekkinud düsbioos võib viia vaginiidi tekkeni, millest reproduktiivses eas on kõige levinum bakteriaalne vaginoos (BV).

Bakteriaalse vaginoosi korral on tupe laktobatsillide hulk oluliselt vähenenud ning Gram-negatiivsete anaeroobsete mikroorganismide osakaal tõusnud. BV peamisteks tekitajateks on *Gardnerella vaginalis* (Gardner ja Dukes, 1955) ja *Mobiluncus mulieris* (Amsel et al., 1983), mille hulk on BV korral oluliselt suurenenud, kuid mida võib vähesel hulgal leida ka tervetel naistel ja seetõttu ei saa ainuüksi nende esinemise järgi diagnoosi määrata (Spiegel, 1991). Uue põlvkonna sekveneerimismeetodeid kasutades on BV-ga seotud mikroobide nimekiri oluliselt pikenenud (Tabel 1).

Bakteriaalsele vaginoosile on iseloomulik homogeenne hallikas vesine tupevoolus, tupesekreedi pH kõrgem tase (pH>4,5), positiivne amiintest (lõhnatest) ning võtmerakkude esinemine. Amseli kriteeriumite kohaselt määratakse BV diagnoos, kui esineb vähemalt kolm ülalnimetatud sümptomit (Amsel et al., 1983). Teine diagnoosimise võimalus on Nugent'i skoori alusel, kus diagnoos pannakse tupesekreedi Gram'i meetodil värvimise tulemusel (0-3 normaalne, 4-6 vahepealne ja ≥ 7 BV) (Nugent et al., 1991). Bakteriaalset vaginoosi seostatakse väikevaagna põletiku (Ness et al., 2005), raseduse katkemise, koorioamniiooni, sünnitusjärgse endometriidi ja enneaegse sünnitusega (Hillier et al., 1995). Samuti on BV diagnoosiga patsientidel suurem risk haigestuda inimese immuunpuudulikkuse viirusesse (HIV) ja teistesse sugulisel teel levivatesse haigustesse (Acobsson et al., 2002; Allsworth ja Peipert, 2011; Gray et al., 1997; Hay et al., 1994; Jamieson et al., 2001; Larsson et al., 2000; Llahí-Camp et al., 1996; Spear et al., 2007).

Vaginoosi ravitakse metronidasooli ja klindamütsiiniga, kuid kuna antibiootikumid hävitavad ka patogeenidega võitlevaid kasulikke laktobatsille, siis korduvinfektsioon ja ravimiresistentsus on väga sagedaseks probleemiks (Cribby et al., 2008; Spiegel, 1991). Swidinski ja teised tegid 2008. aastal katse, kus hinnati *Gardnerella vaginalis* olemasolu ja aktiivsust BV patsientidel enne ja pärast oraalset metronidasooli ravi. Teraapia vältel kõigi naiste vaginaalne mikrofloora normaliseerus vähemal või rohkemal määral, kuid ravi lõppedes bakteriaalse vaginoosi biofilm taastus (Swidsinski et al., 2008). Korduvinfektsioonide tekke vältimiseks on potentsiaalseks alternatiiviks probiootiliste laktobatsillide manustamine (Reid et al., 2003).

BV on kõige levinum reproduktiivses eas naistel, kuid võib esineda ka teistes vanuserühmades (Lakshmi et al., 2013). Riskifaktoriteks on seksuaalpartnerite vahetus, suitsetamine,

antibiootikumide kasutamine, madal sotsiaalmajanduslik staatus, liigne või liiga vähene intiimhügieen. Kuid nimetatud tegurid ei pruugi olla BV põhjustajateks, vaid muude soodustavate tegurite surrogaatmarkeriteks (Cherpes et al., 2008). Korduva BV tegelikud tekkepõhjused ei ole siiani lõplikult teada, hoolimata intensiivsetest teadusuuringutest. Ühe põhjusena on oletatud häireid immuunsüsteemi töös, mis omakorda on seotud patsiendi geneetilise taustaga (Genc et al., 2004; Mackelprang et al., 2015; Royse et al., 2012; Verstraelen et al., 2009).

1.2.2. Vulvovaginaalne kandidaas

Vulvovaginaalne kandidaas (VVC) on põletik, mis on põhjustatud *Candida* pärmseene poolt ja millega tavaliselt kaasneb nii tupe kui ka häbeme punetus ja turse. Peamiseks sümptomiks on sügelus, samuti teraline kohupiimjas või piimjas tupevoolus (Anderson, 2004). Häbeme põletustunne, kihelus ja ärritus on samuti väga tavalised sümptomid, millega võivad kaasneda düsuuria või düspareuunia, mis ägenevad menstruatsioonile eelneval nädalal (Neal et al., 2019). Eristamaks kandidaasi teistest vaginiidi vormidest, on tupevooluse mikroskoopilisel uuringul oluline pärmseene olemasolu. Lihtne on seda haigust diagnoosida ka mikrobioloogilise külvi abil.

Vulvovaginaalne kandidaas on bakteriaalse vaginooosi järel sageduselt teine vaginiidi vorm. Pärmseene esinemine tupes võib olla täiesti asümptomaatiline (De Oliveira et al., 1993) ning 72% naistel on elus vähemalt üks vulvovaginaalse kandidaasi episood (Sobel et al., 1998). 85%-90% juhtudest on VVC põhjustajaks *Candida albicans* (Horowitz et al., 1992; Sobel, 1997). Ülejäänud kandidaasi sümptomite tekitajaks on enamasti *Candida glabrata* (Sobel, 2007), mille puhul umbes 50% juhtudest ei allu asooli-tüüpi seenevastastele ravimitele (Sobel, 1997).

Pärmseen kuulub inimese normaalse mikrobiota hulka, kuid organismi vastupanuvõime vähenemisel hakkab seen liigselt vohama ning tekitab põletikku. Laktobatsillide toodetud vesinikperoksiid ja bakteriotsiidid hoiavad ära pärmseene ja teiste patogeenide vohamise (Servin, 2004). Tupe mikrobiota muutust ning seeläbi kandidaasi teket soodustavad rasedus ja rasedusvastaste tablettide kasutamine, mis mõjutavad östrogeenide taset, samuti süsteemsete antibiootikumide kasutamine, suhkurtõbi, immuunpuudulikkus, kemikaalide üleliigne kasutamine intiimhügieenis ning sünteetilise aluspesu kandmine (Duerr, 2003). Kandidaasi esinemine on sagedasem seksuaalselt aktiivsetel inimestel, kuid ei ole tõendeid, et haigus oleks seksuaalselt edasikanduv (Foxman, 1990; Geiger et al., 1995; Geiger et al., 1995). Diagnoos määratakse tavaliselt kliinilise pildi alusel, kuid vajadusel tehakse tupevooluse mikrobioloogiline uuring. 50% kuni 80% juhtudest on mikroskoobis seeneniidistik nähtav. Et vahet teha bakteriaalsel vaginoozil ja vulvovaginaalsel kandidaasil, kasutatakse amiintesti, kus

tupevoolusele lisatakse 10% kaaliumhüdroksiidi. BV-le vastupidiselt ei teki VVC puhul amiintestil reaktsiooni (Wolman, 2014).

Sümptomaatilist vulvovaginaalset kandidaasi ravitakse lühiajalise lokaalse ravi või ühekordse suukaudse tabletiga, mis on 90% juhtudest efektiivsed. Lokaalselt kasutatavad asooli-tüüpi seenevastased ravimid on kättesaadavad kõigile ning pärast 3-päevast ravi kaovad 2-3 päeva jooksul esinenud sümptomid (Wolman, 2014). Hoolimata edukast ravist on probleemiks sage korduvate episoodide esinemine, mille võimalikku põhjust on uuemad uuringud seostanud lokaalse limaskesta immuunsüsteemi ülereageerimisega (Watkins et al., 2018).

1.3. Inimese genoomi ja mikrobioomi vaheline koosmõju

Inimese mikrobioomi moodustavad mikroorganismid on tihedas seoses inimest ümbritseva keskkonnaga, toitumisega, stressiga, ravimite tarvitamisega jpm. Tervise seisukohalt on väga olulised inimese genoomi ja mikrobioomi vastastikmõjud.

1.3.1 Näiteid genoomi-mikrobioomi interaktsioonidest

Mikroobid suudavad epigeneetiliste mehhanismide kaudu reguleerida peremeesorganismi geeniekspressiooni ning on seega võimelised mõjutama organite ja kudede tööd, hoides inimest tervena või viies haiguseni (Budden et al., 2017; Hand et al., 2016; Honda ja Littman, 2016; Yamamoto ja Matsumoto, 2016). Bakterid ja nende metaboliidid suudavad manipuleerida erinevate signaaliradadega nagu *E-kadheriin/β-kateniin* rada (Rubinstein et al., 2013), põhjustada DNA kaksikahela katkeid (Nougayrède et al., 2006), kiirendada apoptoosi ja interakteeruda immuunsüsteemis tolli-laadsete retseptoritega, et vallandada põletiku signaaliradasid ja aidata säilitada keha homeostaasi (Rakoff-Nahoum ja Medzhitov, 2009).

Kõige suurem osa inimese mikroobidest resideerub gastrointestinaaltraktis, kus mikrobiota ja peremeesorganismi vahel valitseb sümbiootiline suhe, mida reguleerib ja stabiliseerib interaktsioonide võrgustik. Suhtlus hõlmab metaboolseid, immunoloogilisi ja neuroendokriinseid signaaliülekandeid, mis on vahendatud mikroobide sünteesitud metaboliitide poolt. Kui soolebarjääri funktsioon on häiritud, suureneb soolestiku läbilaskvus kommensaalsetele mikroorganismidele, bakterite metaboliitidele ja virulentsusfaktoritele, soodustades immuunreaktsioonide nagu põletik, allergia ja autoimmuunhäirete teket (Kho ja Lal, 2018). Näiteks *Escherichia coli* on kommensaalne normaalse soolestiku mikrobiotasse kuuluv bakter (Kaper et al., 2004), kuid tulenevalt tema eri tüvede mitmekesisusest toodavad mõned patogeensed tüved erinevaid virulentsusfaktoreid, mis manipuleerivad peremeesraku funktsioonidega (Finlay, 1997; Hacker, 2003).

Teiste organsüsteemide mikrobiota mõju inimese geeniekspressioonile on vähem uuritud. Näiteks on leitud, et mikrobiota mõjutab rinnavähi riski, mis on naistel üks kõige sagedamini esinev kasvaja. Rinnavähi teadaolevate riskitegurite hulka kuuluvad geneetilised tegurid, hormoonasendusravi, elustiil, söömisharjumused ja vanus (Lacey et al., 2009), kuid siiski ei ole kõik rinnavähi juhtumid seotud nende riskifaktoritega ning arvestada tuleb ka rinnakoe mikrobiotaga.

Teisalt tuleb meeles pidada, et paralleelselt esineb ka vastupidine seos – inimese genoom mõjutab mikrobiomi koostist. See toimub nii erinevatele mikroobidele sobivate rakuretseptorite abil kui ka immuunsüsteemi vahendusel.

1.3.2. Vaginiitide geneetiline eelsoodumus

Geneetika mängib erinevate haiguste tekke eelsoodumuses olulist rolli. Näiteks mõjutavad geenid tupe limaskestal olevate mikroobide kasvutingimusi, mis võib soodustada teatud bakterite vohamist. Transkriptoomi analüüsid on näidanud, et 73% (n=14401) inimese valkudest (n=19670) ekspresseeritakse tupes ning neid valke kodeerivatest 91 omavad kõrgemat ekspressiooni taset võrreldes teiste koetüüpidega just tupes (Uhlen et al., 2015). Nakkushaigustele vastuvõtlikkus võib olla seotud üksiknukleotiidsete polümorfismidega (SNP) geenides, mis kodeerivad näiteks patogeenidega seotud molekulaarseid mustreid ära tundvaid retseptoreid (PRR) nagu näiteks Toll-laadseid retseptoreid (Schröder ja Schumann, 2005).

On leitud, et bakteriaalse vaginooosi diagnoosiga naise tupevedelik indutseerib erinevates rakutüüpides tuuma transkriptsioonifaktor *NF-κB*-d, reguleerides sellega kaasasündinud immuunsuse vallandumisega seotud geene (Al-Harthi et al., 1998), samas kui laktobatsillid indutseerivad *NF-κB*-d väga väiksel määral (Klebanoff et al., 1999). *NF-κB* induksioon toimub peamiselt läbi *TNF* retseptoriga seotud faktor 6 sõltuva raja kaudu (*TRAF6*), mis näitab, et bakteriaalse vaginooosi immuunvastuse algus sõltub Tolli-laadsete retseptorite signaalist (John et al., 2007). Tupe epiteelirakud ekspresseerivad Gram-positiivsete bakterite äratundmiseks Tolli-laadseid retseptoreid *TLR1*, *TLR2* ja *TLR6*, kuid mitte *TLR4*, mis tuvastab Gram-negatiivseid baktereid (Fichorova et al., 2002). Verstraelen jt poolt 2009. aastal avaldatud rasedaid naisi hõlmavas uuringus oli üheksast valitud kandidaatgeenist (*LBP*, *CD14*, *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *MD2*, *CARD15*, *SIGIRR*) ainult *MD2* geeni üksik polümorfism seotud ühe peamise bakteriaalse vaginooosi tekitaja *G. vaginalis* esinemisega. *A. vaginae* kandlust on seostatud kuue polümorfismiga, mis asuvad *CD14*, *TLR1*, *CARD15*, *LBP*, *CD14* ja *TLR1* geenides (Verstraelen et al., 2009). Kahjuks pärinevad kõik need tulemused kandidaatgeenide uuringutest ning kuna suuremaid ja usaldusväärsemaid uuringuid pole tehtud, siis on inimese geenide roll vaginiitide tekkes endiselt ebaselge.

Haiguste kujunemises mängivad olulist rolli ka epigeneetilised muutused nagu DNA metülatsioon, histoonide modifitseerimine ja väikesed RNA-d (Botchkarev et al., 2012; Jaenisch ja Bird, 2003). Näiteks geeni *DEFBI* avaldumine, mis kodeerib vaginaalsete keratinotsüütide rakkudes antimikroobset peptiid β -defensiin 1, sõltub nii promotori CpG alade metüleerimisest kui ka histoonide modifikatsioonidest. Teatud laktobatsillide olemasolul on võimalik *DEFBI* ekspressiooni suurendada (*L. gasseri*) või vähendada (*L. reuteri*) (Lee et al., 2017). Antimikroobsed peptiidid ehk AMPid mängivad aga olulist rolli erinevate seente, viiruste, bakterite ja parasiitide toimel tekkinud immuunvastusel (Lai ja Gallo, 2009; Selsted ja Ouellette, 2005).

1.4. Inimese geneetiline varieeruvus ja GWAS analüüs

Inimese genoom on kujunenud evolutsioonilise surve all, kus iga indiviid omab enda unikaalset genoomi, mistõttu geenide ja meid ümbritseva keskkonna mõju võib viia erinevate haigusteni (Rodríguez et al., 2014). Iga populatsioon erineb ning populatsioonide sees toimub omakorda pidev looduslik valik. Seleksioon võib olla positiivne, kus kasutoova alleeli sagedus suureneb mingi adaptiivse tunnuse kujundamiseks, negatiivne, kus eellastunnus kõrvaldatakse, või neutraalne, mis suurendab kahe või mitme alleeli säilitamist soodustades üleüldist geneetilist mitmekesisust. Neutraalne valik võib säilitada polümorfisme, mis tagavad konkreetse alleeli heterosügootidele parema tervise. Olenemata pidevalt toimuvast seleksioonist on inimese DNA järjestused 99,5% ulatuses identsed (Pettersson et al., 2009), kuid üle 90% geneetilisest varieeruvusest moodustavad DNA järjestuses olevad SNP-d (Brookes, 1999).

Selleks et uurida, kas mõni geneetiline variant on seotud mingi kindla haiguse või tunnusega, on heaks meetodiks ülegenoomne assotsiatsiooniuring (*Genome-wide association study*, GWAS). GWAS käigus analüüsitakse tuhandete indiviidide miljoneid geenivariante üle kogu genoomi, et identifitseerida genotüübi ja fenotüübi vaheline assotsiatsioon. Tegemist on hüpoteesivaba juht-kontrolluuringuga, kus võrreldakse kahes grupi geneetiliste variantide alleelide esinemissagedust. Statistiliselt oluliselt erinevad alleelide esinemissagedused juhtude ja kontrollide seas viitavad fenotüübi ja geneetiliste variantide seosele (Kruglyak, 1999).

Alates 2005. aastast, mil toimus esimene GWAS analüüs vanusest tuleneva maakuli degeneratsiooni (*age-related macular degeneration*, AMD) uurimiseks, on tuvastatud rohkem kui 50 000 ülegenoomset olulist ($p < 5 \times 10^{-8}$) assotsiatsiooni geneetiliste variantide, haiguste ja tunnuste vahel (MacArthur et al., 2017). Assotsiatsiooniuringute tulemused on viinud parema arusaamiseni haiguste vastuvõtlikkuse kohta (identifitseerides haigust põhjustavaid geene ja mehhanisme), ning edusammudeni kliinilise ravi arendamisel (identifitseerides uusi ravi

sihtmärke ja haiguse biomarkereid) ja personaalmeditsiinis (näiteks erinevate riskide ennustamine ja vastavalt genotüübile ravi optimeerimine).

GWAS analüüsi saab üldistatult jagada neljaks etapiks:

- (1) valimi moodustamine ehk piisava hulga juhtude ja kontrollindiviidide selektsioon;
- (2) valimi genotüpiseerimine ning andmete kvaliteedikontroll;
- (3) statistilised testid uuritava fenotüübi ja geneetiliste variantide vahel;
- (4) leitud assotsiatsioonide replitseerimine sõltumatu valimiga (Bush ja Moore, 2012).

1.4.1. Ülegenoomsetes assotsiatsiooniuringutes kasutatavad markerid

Ülegenoomsetes assotsiatsiooniuringutes analüüsitakse peamiselt SNP-sid, mis on DNA järjestuses paiknevad ühenukleotiidsed polümorfismid ja mida esineb iga 300 aluspaari kohta keskmiselt üks kord (McVean et al., 2012). SNP-d võivad olla funktsionaalsed, põhjustades aminohappe muutusi, mRNA transkripti stabiilsust ja muutes transkriptsioonifaktori sidumise afiinsust (Griffith et al., 2007). SNP-del on kaks või enam alleeli ning neid jagatakse harvema alleeli sageduse (MAF, *minor allele frequency*) alusel erinevatesse kategooriatesse: sagedased variandid – $MAF \geq 5\%$, madala sagedusega variandid – $MAF 1-5\%$ ja harvad variandid $MAF < 1\%$ (Agarwala et al., 2013). Väga väikse MAF-i puhul muutub assotsiatsiooni avastamise tõenäosus madalaks ning vaja on väga suuri uuringugruppe. Harvade variantide assotsiatsioone on tõenäolisem leida näiteks monogeensete haiguste puhul, kus variantide efektsuurus on väga suur (Hindorff et al., 2009).

Lisaks arvestatakse uuringu disainil aheldatuse tasakaalustamatust (*linkage disequilibrium*, LD) nii uuritavate valimisel kui ka hiljem markerite genotüpiseerimisel ja imputeerimisel. LD näitab kahe või enama genoomse lookuse alleelset mittejuhuslikku assotsieerumist (Nordborg ja Tavaré, 2002). LD määra suurus sõltub aset leidnud rekombinatsioonide arvust ehk tavaliselt, mida vanem on populatsioon, seda väiksem LD määr. Seetõttu on GWAS uuringus oluline, et juhud ja kontrollid oleksid sama etnilise taustaga, vähendades sellega valepositiivsete tulemuste hulka, mis on tingitud populatsioonide erinevast LD struktuurist (Pearson, 2008). Parameeter r^2 iseloomustab LD-d ning näitab kahe bialleelse markeri statistilist korrelatsiooni (Hill ja Robertson, 1968). Väärtusel $r^2=1$ juures on tegemist täieliku LD-ga ehk genotüübid on täielikult üksteisega aheldunud. Kui LD struktuur on teada, saab kasutada *tag*-SNP-sid, mille abil on võimalik kaardistada inimese haplotüüpe ehk SNP-de grupe. Kui hinnanguliselt 500 000-1 000 000 SNP-d on määratud, on kaetud kogu genoom ning on vaja vähem positsioone otseselt genotüpiseerida, mis teeb uurimisprotsessi soodsamaks ja vähendab tehnilist mahukust (Cooper et al., 2002). Seejärel saab puuduolevad markerid imputeerida, võttes aluseks LD struktuuri.

Genotüpiseerimispaneelid sisaldavad kuni mitu miljonit SNP-d, kuid vaatamata sellele ei pruugi need kõiki huvipakkuvaid markereid sisaldada (Spencer et al. 2009). Võimalikuks lahenduseks on genotüübi imputatsioon, kus ennustatakse uuritava valimi genotüpiseerimisel identifitseerimata jäänud SNP-de genotüüpe (Delaneau et al., 2013; Marchini ja Howie, 2010). GWAS-i puhul imputeeritakse genotüpiseeritud andmestikuga kogu genoom, mis katab puuduoleva genotüübiga markerid (Marchini ja Howie 2010). Puuduolevate markerite imputatsiooni refentsandmestik ja uuritav andmestik peavad olema geneetiliselt lähedased ning sarnase LD struktuuriga (Halperin ja Stephan 2009). Imputeerimise tulemusel suureneb uuritavate SNP-de arv ning lisaks genotüpiseeritud geneetilistele variantidele on võimalik hinnata ka nende lähedal paiknevate korreleeritud markerite genotüüpe. Selle tulemusena tõuseb uuringu võimsus ning suurem tõenäosus leida haigust põhjustavaid markereid (Spencer et al. 2009).

1.4.2. GWAS ja kandidaatgeenide uuringu võrdlus

Geneetika ja haiguste vastuvõtlikkuse seosed on saanud üheks olulisemaks uurimisteenaks. Seoseuuringute jaoks on olnud kasutusel kaks peamist lähenemisviisi: kandidaatgeenide uuring ning ülegenoomne assotsiatsiooniuring ehk GWAS. Nii kandidaatgeeni kui ka GWAS uuringu uuritavad markerid on samad või sarnase alleelisagedusega, kuid kandidaatgeeni uuringud sisaldavad tavaliselt oluliselt vähem uuritavaid ning seetõttu ei ole tulemused alati usaldusväärsed. Kuna kandidaatgeenide uuringute disain on piiratud meie olemasolevate teadmistega haiguste tekkemehhanismide osas, ei avasta sellised uuringud uusi seotud gene või geenikombinatsioone. GWAS-i hüpoteesivaba disain on aga olnud väga edukas uute geenivariantide ja uuritud fenotüübi seoste leidmisel. Edukalt on identifitseerinud suurel hulgal riskilookuseid, mis on seotud sagedaste haigustega nagu anoreksia (Duncan et al., 2017), depressioon (Hyde et al., 2016), erinevad vähivormid (Sud et al., 2017), 2.tüüpi diabeet (T2DM) (Zhao et al., 2017), skisofreenia (Li et al., 2017), unetus (Jansen et al., 2019) jt. Kuna GWAS käigus analüüsitakse väga palju markereid ja seega on mitmese testimise korrektoori järgselt p-väärtuse piir range, siis hea uuringu disain eeldab väga paljude inimeste uurimist, mis muudab tulemused usaldusväärsemaks (Wang et al., 2005).

Kuna levinumate vaginiitide etiopatogeneesis ning geneetilise eelsoodumuse osas on palju ebaselgust ning Geenivaramus olevad andmed võimaldavad seda fenotüüpi uurida senisest suuremas mahus, siis GWAS uuring on parim moodus, kuidas tõestada või lükata ümber hüpotees geneetiliste faktorite mõjust korduva vaginiidi esinemisele.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Käesoleva magistrیتöö eksperimentaalse osa eesmärgid on järgmised:

1. Leida korduvate vaginiitidega seotud geneetilised riskifaktorid, kasutades GWAS analüüsi;
2. Iseloomustada elustiili faktorite ja tervisemarkerite võimalikku mõju vaginiidi tekkele.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Valim

Antud uurimuse läbiviimiseks kasutati Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu (TÜ EGV) naisgeenidoonorite proove, mis olid kogutud üle Eesti vabatahtlikelt geenidoonoritelt vanuses ≥ 18 aastat. Kõik geenidoonorid olid läbinud standardiseeritud tervisekontrolli, andnud DNA, valgete verelibledede ja plasma testide jaoks vereproovi ning täitnud 16-moodulise elustiili, toitumist ja terviseseisundit kirjeldava (RHK-10 klassifikatsiooni kasutades) küsimustiku (Leitsalu et al., 2015). Infot geenidoonoriks olnud naiste terviseseisundi kohta täiendati lisaks E-tervise raviarvetega, mis on kättesaadavad tagasiulatuvalt alates 2004. aastast. Raviarvete episoodi infot ei vaadatud enne täisealise uuritava 15-aastaseks saamist.

Juht-kontrolluuringu GWAS analüüs viidi läbi järgmiste gruppidega (Tabel 2):

- a) 25-101-aastased (hetke vanus) naised ($n=6592$), kellel oli diagnoositud vähemalt 2 vaginiidi episoodi elu jooksul (vanus episoodi ajal 16-93 aastat). Inklusioonkriteeriumite alla kuulusid RHK-10 alusel järgmised diagnoosid: häbeme- ja tupekandidaas (RHK-10 klassifikatsiooniga B37.3), äge tupepõletik (RHK-10 klassifikatsiooniga N76.0) või alaäge ja krooniline vaginiit (RHK-10 klassifikatsiooniga N76.1).
- b) Kontrollgrupp, kellel ei olnud diagnoositud ühtki vaginiidi episoodi ($n=5945$, hetke vanus 24-100 aastat).

Lisaks analüüsiti geenidoonori küsimustiku andmete põhjal kontrollide ja juhtude elustiili seost huvipakkuvate diagnoosidega, mis pärinesid raviarvetelt. Elustiili puudutavad andmed olid olemas 6869 vaginiidi diagnoosiga patsiendi ja 6869 kontrolli kohta, kus patsientide keskmiseks vanuseks oli 45,7 ($SD\pm 0,14$) ja kontrollide vanuseks 44,9 ($SD\pm 0,15$). Erinevus kahe alauuringu valimi suuruses on tingitud sellest, et mõnedel fenotüübi andmetega naistel puuduvad genotüübi andmed või indiviidide identifitseerimiseks kasutatavate koodidel võib ühel inimesel olla mitu vastavat koodi, mis raskendab andmestike ühendamist.

Käesoleva magistrیتöö raames teostatud uuringute läbiviimise aluseks oli TÜ EGV poolt kinnitatud andmete väljastustaotlus nr 3-10/GI- 20454 ning Tartu Ülikooli inimuuringute

etikakomitee luba 234/T-12. Kõik uuritavad olid allkirjastanud informeeritud nõusoleku vormi andmete kasutamiseks teadusuuringutes.

Tabel 2. GWAS uuringugruppi kuuluvate juhtude ja kontrollide kriteeriumid ning isikute arv.

Grupp	Kirjeldus RHK-10 koodi alusel
Juhud (n=6870)	B37.3 (n=4926, 71,7%) alamjaotistega: häbeme- ja tupekandidaas (N77.1), kandidavulvovaginiit (N77.1), moniiliavulvovaginiit (N77.1), tupe seenhaigustus (N77.1).
	N76.0 (n=1244, 18,1%) alamjaotistega: äge tupepõletik, teisiti täpsustamata tupepõletik, teisiti täpsustamata vulvovaginiit e häbeme-tupe põletik, äge vulvovaginiit.
	N76.1 (n=2402, 35,0%) alamjaotistega: alaäge ja krooniline vaginiit ehk tupepõletik, alaäge vulvovaginiit, krooniline vulvovaginiit.
Kontrollid (n=5945)	Naissoost isik, kellel ei ole teadaolevalt elu jooksul diagnoositud ühtegi vaginiidi (B37.3, N76.0 või N76.1) episoodi.

2.2.2. Elustiili ja tervise andmete analüüs

E-tervise raviarvete ja Geenivaramu küsimustikust pärinevad elustiili ja tervise andmed olid kogutud nii korduvate vaginiidi episoodidega isikute kui ka kontrollide seas. Andmeid analüüsiti Past3 tarkvaraga (Hammer et al., 2001), kuhu Excelis olevaid andmeid kopeeriti Past3 töölehele. Kõikidele tunnustusele arvutati kokkuvõtvad statistikud - keskväärtus ja standardhälve/standardviga ning mediaan ja kvartiilid. Enne gruppide omavahelist võrdlust kontrolliti tunnuste vastavust normaaljaotusele kasutades Normality testi. Olenevalt p-väärtusest ($p > 5 \times 10^{-2}$ normaaljaotus, $p < 5 \times 10^{-2}$ mitte-normaaljaotus) valiti järgnevateks analüüsideks sobivad testid. Pidevate tunnuste puhul kasutati vastavalt võrdluses olevate gruppide arvule ja jaotuse tüübile kas t-testi, Mann-Whitney rank sum testi või Kruskal-Wallis testi.

Kategoriliste tunnuste seotuse statistiliseks võrdlemiseks kasutati hii-ruut või Fisher's exact testi.

2.2.3. Genotüpiseerimine, kvaliteedikontroll ja imputeerimine

Geenidoonorite hulka kuulunud indiviidide ülegenoomne genotüpiseerimine, kvaliteedikontroll ja imputeerimine viidi läbi TÜ EGV tuumiklaboris. Illumina GSA (*Global*

Screening Array) kiibiga genotüpiseeriti 6592 juhtu ning 5945 kontrolli, järgides tootjapoolset laboriprotokoll ja pakutavaid reaktiivide komplekte (www.illumina.com). Antud kiibile on võimalik kanda 24 proovi ning kiibi kogumarkerite arvuks oli 700 078. Genotüpiseeritud andmete kvaliteedikontroll ja filtreerimine viidi läbi Illumina GenomeStudio (www.illumina.com) ja PLINK tarkvara kasutades (Purcell et al., 2007).

Genotüpiseerimise järgselt teostati kvaliteedikontroll, kus indiviidi- ja markeripõhises kontrollis arvestati järgmiseid parameetreid ja näitajaid:

- indiviidi edukalt genotüpiseeritud markerite protsentuaalne osakaal (*Call rate*, CR);
- heterosügootsus;
- vähemesineva alleeli protsentuaalne osakaal markeril (*Minor Allele Frequency*, MAF);
- genotüübi ja fenotüübipõhise soo mittevastavus;
- indiviidide omavaheline sugulus;
- Hardy-Weinbergi tasakaalustatus (*Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE).

Genotüpiseerimise järgselt filtreeriti välja individid, kelle edukalt genotüpiseeritud markerite protsentuaalne osakaal ehk CR jäi alla 95%. Samuti need, kelle genotüübist ilmnenuid sugu ei vastanud fenotüübis märgitud soole. Enne imputatsiooni filtreeriti välja geneetilised variandid, mille CR <95 ja HWE p-väärtus $<1 \times 10^{-4}$, mitte-autosomaalsed markerid ja need, mille MAF oli alla 1%. Eelfaasimine viidi läbi Eagle v2.3 tarkvaraga (Loh et al., 2016). Imputatsioon teostati Beagle 5.0 tarkvaraga (Browning ja Browning, 2009), kasutades Eesti populatsiooni spetsiifilist referentspaneeli (Mitt et al., 2017).

2.2.4. GWAS analüüs SAIGE tarkvaraga

Assotsiatsioonianalüüs viidi läbi SAIGE tarkvaraga (Zhou et al., 2018), mis kasutades segamudelit (*Scalable and Accurate Implementation of Generalized mixed model*, SAIGE), sobib suurte kohortite ja sugulasi sisaldavate andmestike analüüsiks. Mudeli kovariaatidena kasutati sünniaastat ja populatsiooni stratifikatsiooni arvesse võtmiseks kümme esimest peakomponenti. Analüüsi käigus rakendati filtreid `--minMAF=0,0001` (minimaalne *minor allele frequency* piir, alla selle markereid ei analüüsitud) ja `--minMAC=1` (minimaalne *minor allele count* piir, alla selle markereid ei analüüsitud). Kokku läbisid filtri ning analüüsiti 25,8 miljonit markerit. Ülegenoomse olulisuse piiriks loeti assotsiatsioonianalüüsi p-väärtus $<5 \times 10^{-8}$ (Dey et al., 2017; IMHOF, 1961; Kuonen, 1999). Analüüsi viis läbi genoomika ja reproduktiivgeneetika vanemteadur Triin Laisk.

2.2.5. GWAS tulemuste annoteerimine FUMA platvormil

GWAS analüüsi tulemusi interpreteeriti FUMA platvormi abil, mis on loodud GWAS analüüsi tulemuste annotatsiooniks ja interpreteerimiseks (Watanabe et al., 2017). FUMA-s kasutati SNP2GENE funktsiooni, mis visualiseerib GWAS analüüsi tulemusi, valib kasutaja täpsustatud parameetrite (näiteks p-väärtuse lävend) alusel võimalikud seotud variandid ning prioritseerib kandidaatgeene. Kandidaatgeenide prioritseerimiseks kasutatakse ülegenoomselt olulisi SNP-sid (*independent significant SNPs*) ning nende SNP-dega LD-s olevaid SNP-sid kasutaja määratud r^2 alusel, ning kõrvutades neid näiteks ekspressiooni kvantitatiivsete tunnuste lookuste (*expression quantitative trait loci*, eQTL) ja kromatiininteraktsioonide andmestikega. Nii saab tuvastada, millised variandid milliste geenide ekspressiooni mõjutavad või nende võimalikus distaalses regulatsioonis osalevad, mis võimaldab liikuda seotud variantide juurest edasi võimalike põhjuslike geenide ning bioloogiliste mehhanismideni. Määratud r^2 näitab kahe bialleelse markeri statistilist korrelatsiooni ja iseloomustab LD-d (Hill ja Robertson, 1968). Väärtusel $r^2=1$ juures on tegemist täieliku LD-ga ehk genotüübid on täielikult üksteisega aheldunud.

Tulemuste interpreteerimisel kasutati lisaks andmebaase GnomAD (Karczewski et al., 2020), The Human Protein Atlas (Uhlen et al., 2015) (<http://www.proteinatlas.org>), NCBI (Coordinators, 2016), National Cancer Institute (<https://www.cancer.gov/>), FinnGen PheWeb (FinnGen, 2020, <http://r2.finnngen.fi/>), Mouse Genome Informatics (Bult et al. 2019) (<http://www.informatics.jax.org/>), PheWeb (Fernández et al., 2018) ja Oxford Brain Imaging Genetics (BIG) (<http://big.stats.ox.ac.uk/>). Viimased kaks andmebaasi koondavad UK Biopanga (<https://www.ukbiobank.ac.uk>, UKBB) andmetel teostatud GWAS analüüse, mis võimaldavad teostada seotud markeritele ülegenoomseid assotsiatsioonianalüüse ehk PheWAS'e (Phenome Wide Association Study). Lühidalt võimaldab see analüüsida, milliste fenotüüpidega on meile huvipakkuv SNP/geen veel seotud.

2.2.5.1 Geenipõhine analüüs

Geenipõhine ülegenoomne assotsiatsioonianalüüs viidi läbi MAGMA 1.6 tarkvara (de Leeuw et al., 2015) kasutades eelnevalt FUMA-s seatud parameetrite alusel. Ensembl 92 (Hunt et al., 2018) alusel tuvastati kõikide valku kodeerivate geenide ($n=20\ 438$) sees (± 1 kb geeni algusest ja lõpust) asuvad markerid, mille GWAS p-väärtuste põhjal arvutatakse markeri-kaupa mudeli (*SNP-wise model*) abil koondefekt geeni kohta. Arvestades testitud geenide arvu, seati ülegenoomse olulisuse määraks $0,05/19032=2,36 \times 10^{-6}$.

2.2.5.2. Funktsionaalne kaardistamine

SNP2GENE all laeti üles SAIGE tarkvaras (Zhou et al., 2018) genereeritud koondstatistikutega fail, mis sisaldas iga geneetilise variandi kohta kromosoomi, positsiooni ning assotsiatsioonitesti p-väärtust. Kokku oli valimis 13739 uuritavat. Seotud juhtivate SNP-de miinimum p-väärtuse läveks sätestati 5×10^{-6} , kusjuures markerid, mille omavaheline $r^2 < 0,1$ loeti eraldiseisvateks signaalideks. Kui kahe SNP omavaheline $r^2 < 0,6$ ning mõlemad ületasid kasutaja seatud olulisuse lävendi, loeti need sõltumatult olulisteks signaalideks. Kandidaat-SNP-deks selekteeriti kõik variandid, millel oli LD leitud sõltumatult oluliste SNP-dega ($r^2 \geq 0,6$), $MAF \geq 1\%$ ja GWAS meta-analüüsi p-väärtus $< 5 \times 10^{-2}$. Seotud lookuseks loeti ala, mis oli juhtiva SNP ümber LD bloki piires, kusjuures omavahel liideti LD blokid, mis olid üksteisele lähemal kui 250 kb. LD blokid määrati parameetrite alusel (blokkide maksimaalne vahemaa 250 kb), mille igasse blokki kuulub riskilookuse sõltumatult oluline SNP koos kandidaat-SNP-dega. Referentspaneeliks jäeti programmi poolt pakutud 1000G Phase3 EUR, mille alusel FUMA hindas markerite MAF väärtust ning nende omavahelist LD-d (Watanabe et al. 2017).

Iga riskilookuse kandidaat-SNP-d annoteeriti arvestades variantide funktsionaalsust (ANNOVAR (Wang et al., 2010)), CADD skoori (Combined Annotation Dependent Depletion, SNP skoor olenevalt tema mõjust valgu struktuurile või funktsioonile (Kircher et al. 2014)), RegulomeDB RDB skoori (1-7, kus madalam skoor näitab suuremat tõenäosust omada regulatoorset funktsiooni (Boyle et al., 2012)), 15 kromatiini olekut Roadmap Epigenomics Project'ist (Dunham et al., 2012; Kundaje et al., 2015), eQTL andmeid (GTEx v8, genotüübikoekspressioon (Genotype-Tissue Expression) (Lonsdale et al., 2013)), Blood eQTL brauserit (Westra et al., 2013), BIOS QTL brauserit (Zhernakova et al., 2017), GSE87112 3D kromatiininteraksioone HI-C eksperimendist 21 koes/rakutüübis (Schmitt et al., 2016) ning BRAINEAC (Ramasamy et al., 2014), MuTHER (Grundberg et al., 2012), xQTLServer (Ng et al., 2017) ja CommonMind Consortium (Fromer et al., 2016) andmeid.

Kandidaatgeenide kaardistamiseks kasutab FUMA mitut erinevat lähenemist:

1. Positsionaalne kaardistamine, mis märgib ära kõik geenid, mis asuvad juht- ja LD-s olevatest kandidaat-SNP-dest 10 kb kaugusel.
2. eQTL põhine kaardistamine, mis identifitseerib geneetilised variandid, mis on seotud kindla koe või rakutüübi geeniekspressiooni reguleerimisega (Rockman ja Kruglyak, 2006).
3. Kaardistamine kromatiininteraksioonide abil. Kromatiininteraksioonid reguleerivad geeni ekspressiooni, viies distaalsed regulatoorsed elemendid, näiteks DNA super-võimendajad (*Super-enhancers*) promooterelementide lähedusse, moodustades n-ö

aasa. Promooter piirkonnas olevad SNP-d võimaldavad seonduda kromatiininteraktsiooni läbi viiva transkriptsioonifaktoriga, mille tulemusel suurendatakse või vähendatakse konkreetse geeni transkriptsiooni (Akincilar et al., 2016). Andmed kromatiininteraktsioonide kohta pärinesid GSE87112 (Schmitt et al., 2016) andmestikust, HI-C-l põhinevad interaktsioonid Giusti-Rodrigues et al. 2019 andmetest (Giusti-Rodríguez et al., 2019), HI-C põhised andmed PsychENCODE andmebaasist (Wang et al., 2018) ning võimendaja ja promooter korrelatsioonid FANTOM5 andmetest (Noguchi et al., 2017). Kromatiininteraktsioonide kaardistamisel kasutati Schmitt et al. 2016 poolt soovitatud FDR (*False Discovery Rate*) läve $<1 \times 10^{-6}$. Läve ületanud kromatiinide interaktsioonid kujutleti Circos tarkvara (Krzywinski et al., 2009) joonistena. Joonistel (Joonis 5, Lisa 3-9) on kujutatud kahe regiooni vahelisi ühendusi, kus regioon 1 on FUMA poolt identifitseeritud riskilookus (GWAS käigus tuvastatud piirkond, mille markeri(te) p-väärtus on alla kasutaja määratud piiri) ja regioon 2 on teine oluline interaktsiooni punkt. Kui teine interaktsiooni punkt asub mõne geeni lähedal (arvestades promooter regiooni (transkriptsiooni alguskohast 250bp geeni algusesesse [*upstream*] ja 50bp geeni lõppu [*downstream*])), näitab see teoreetilist võimalust, et punktis 1 asuvad variandid võivad mõjutada interaktsiooni punktis 2 asuvate geenide regulaatoraladega, ning seega mõjutada distaalselt näiteks geeniekspressiooni regulatsiooni.

Võimalike kandidaatgeenide ekspressioon erinevates kudedes visualiseeriti FUMA funktsiooni GENE2FUNC abil (Watanabe et al., 2017), võttes aluseks geeniekspressiooni GTE_x v8 andmestikus (Lonsdale et al., 2013). Tulemused visualiseeriti heatmapi abil (Joonis 6).

2.2.6. Tulemuste visualiseerimine LocusZoom tarkvaraga

Selleks, et visualiseerida geenipõhise analüüsi tulemusi ja täpsemalt uurida konkreetsetes piirkonnas olevate üksikute markerite assotsiatsioonisignaali tugevust, ahelduse tasakaalutust (LD), rekombinatsioonimustreid ja geenide asukohti, kasutati LocusZoom tarkvara (Pruim et al., 2010).

LocusZoom tarkvara näitab vertikaalteljel p-väärtuseid skaalal $-\log_{10}$ ja horisontaalteljel kromosomaalset positsiooni. Regiooni täpsustamiseks sisestati FUMA (Watanabe et al., 2017) tarkvaraga leitud statistilise olulisuse piiri ületanud geeni nimi (*KRT6A*) ja analüüsil külgnevateks piirkondadeks pandi +300kb mõlemas suunas. SNP-de identifitseerimiseks näitab LocusZoomi poolt loodud joonis iga SNP assotsieerumise ulatust ning LD mustrit kõige tugevamalt assotsieerunud SNP-ga. Joonis 4 tegi vanemteadur Triin Laisk.

2.2.7. Teaduskirjandusest kandidaatgeenide leidmine

Käesoleva töö tulemuste võrdlemiseks varasemalt kirjanduses pakutud kandidaatgeenide nimekirjaga kureeriti teaduskirjandust manuaalselt. Kandidaatgeenide leidmiseks teostati erinevates andmebaasides päringuid, et leida geeni variatsioon, p-väärtus, mis mikroorganism seda mõjutab, millist haigust soodustab või kaitseb ning missuguse geenisisese muutusega on tegu (Lisa 10). Vajaliku andmestiku saamiseks kasutati NCBI PubMed (Coordinators, 2016) andmebaasi ning andmestikku lisati artiklid, mille avaldamisperiood oli 2004 kuni 2019. Töö koostamisel kasutati inglisekeelseid artikleid, mille leidmiseks kasutati järgmisi märksõnu: “*bacterial vaginosis*“, “*vulvovaginal candidosis*“, “GWAS“.

2.3. Tulemused

2.3.1. Elustiili ja tervise küsimustiku andmete tulemused

E-tervise raviarvete ja Geenivaramu küsimustikust pärinevad elustiili ja tervise andmed koguti nii korduva vaginiidi episoodidega naistelt kui ka kontrollidelt. E-tervise raviarvetes kajastusid korduva vaginiidi eri diagnoosiga (B37.3, N76.0, N76.1) naiste hetke vanus, vanus diagnoosi esmakordsel ja viimasel määramisel, vanus episoodide ajal, haiguseepisoodide arv, kui mitmel raviarvel on diagnoos olnud põhidiagnoosiks ning mitu korda on diagnoos esinenud haigekassa arvetel (Lisa 1). Eri diagnooside vanuseid võrreldes leiti, et alaäge ja krooniline vaginiit ehk tupepõletik (N76.1) esines alati natuke vanemate naiste seas ($p < 0,01$) (hetke vanus $48,1 \pm 0,25$ a.), kui häbeme- ja tupekandidaas (B37.3, hetke vanus $43,9 \pm 0,15$ a.) ning äge tupepõletik (N76.0, hetke vanus $46,9 \pm 0,34$ a.) (Lisa 1, Tabel 5). Samuti oli N76.1 diagnoosiga naistel oluliselt kõrgem vanus episoodi ajal ($38,4 \pm 12,5$ a., $p < 0,01$) ning vanus diagnoosi viimasel määramisel ($40,8 \pm 12,4$ a.). Rohkem esines episoodide häbeme- ja tupekandidaasi diagnoosi (B37.3) korral ($4,1 \pm 3,3$ korda), kui ägeda tupepõletiku (N76.0) ($2,8 \pm 1,5$ korda) ja alaägeda ja kroonilise vaginiidi (N76.1) korral ($3,3 \pm 2,2$ korda).

Juhtude ja kontrollide hetke vanuseid võrreldes statistiliselt olulist erinevust ei leitud (Tabel 3). Samuti ei leitud statistiliselt olulisi erinevusi juhtude ja kontrollide seas alkoholi tarvitamise, suitsetamise staatuse, menstruaaltsükli, raseduste arvu ja raseduse iseenesliku katkemise osas ($p > 0,05$) (Tabel 3, Lisa 2, Tabel 6). Küll aga kuuluvad olemasoleva kirjanduse andmetel suitsetamine, alkoholi tarbimine, menstruaatsioon ja rasedus vaginiiti soodustavate tegurite surrogaatmarkerite hulka (Cherpes et al., 2008; Hillier, 2005).

Analüüsis selgus, et tervetel naistel on elussündide arv kõrgem ($1,8 \pm 1,1$) kui korduva vaginiidi diagnoosiga naistel ($1,6 \pm 0,9$), samuti algab menopaus tervetel naistel natuke varem ($48,4 \pm 0,2$ vs $49,6 \pm 0,2$) ning tehislikke raseduse katkestamisi esineb oluliselt vähem ($p < 0,01$) (Tabel 3). Iseeneslike ja tehislike raseduste katkestamise ja raseduste ning elussündide arvu tulemusi võrreldes tuleb arvesse võtta, et korduva vaginiidi diagnoosiga naiste vastanute hulk oli vastamata jätnutest oluliselt suurem ($p < 0,01$).

E-tervise raviarvete põhjal võeti välja kõige sagedasemad kaasnevad haigused vaginiidi diagnoosiga naistel. Selgus, et kõige sagedasemaks ($n=5789/31789$) oli RHK-10 klassifikatsiooni alusel Z30.4 ehk kontratseptiivsete ravimite järelevalve. Sellele järgnesid kõige populaarsematena emakasisese kontratseptiivseadme järelevalve (Z30.5, $n=487$), emakakaela põletikuline haigus (N72, $n=180$), emakakaela erosioon ehk limaskestamarrastus ja ektroopion ehk väljapööre (N86, $n=110$), peamiselt suguliselt levivad muud täpsustatud haigused (A63.8, $n=145$) ja emaka intramuraalne leiomüoom (D25.1, $n=70$).

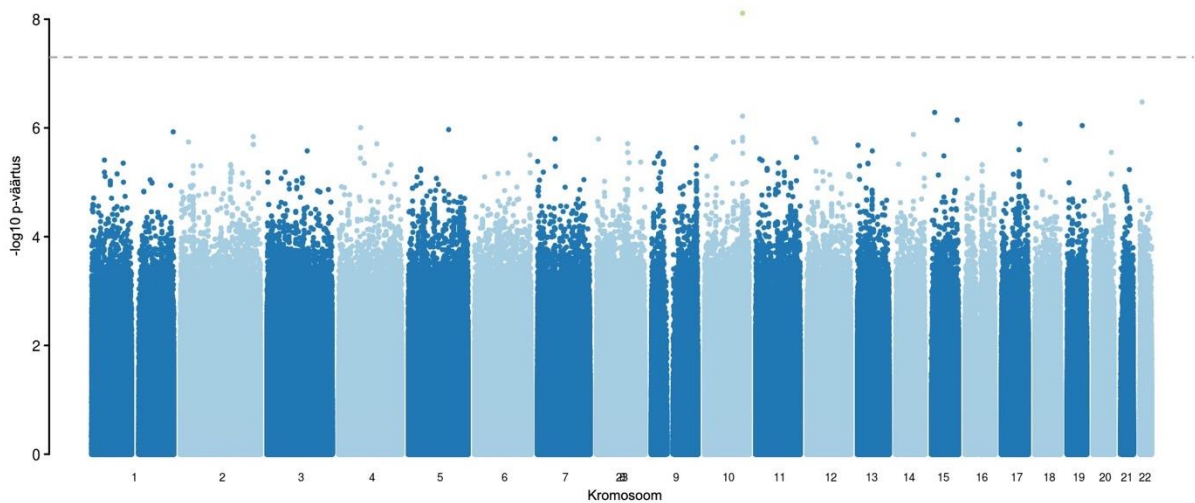
Ka eelnevates uurimustes on vaginiiti seostatud mitmesuguste reproduktiivtrakti probleemidega, sh suurema riskiga enneaegseks sünnituseks, sugulisel teel levivatesse haigustesse nakatumiseks, raseduse katkemiseks ja sünnitusjärgseks endometriidiks (Acobsson et al., 2002; Allsworth ja Peipert, 2011; Baeten et al., 2009; Hay et al., 1994; Larsson et al., 2000; Llahí-Camp et al., 1996; Spear et al., 2007). Ülejäänud tervist ja elustiili puudutavad andmed on leitavad Lisas 2.

Tabel 3. E-tervise raviarvete ja Geenivaramu küsimustikust pärinevate elustiili andmete tulemused. Juhtudeks on korduva vaginiidi (B37.3, N76.0, 76.1) diagnoosiga naised. Pidev tunnus on avaldatud keskmine \pm standard hälve [mediaan (kvartiil 25%-kvartiil 75%)].

	Juhud	Kontrollid	p-väärtus
Hetke vanus	45,7 \pm 0,14 [44 (37-52)] Min 25 Max 101 n=6869	44,9 \pm 0,15 [44 (34-52)] Min 24 Max 100 n=6869	p>0,05
Kas menstruatsioon alanud	Ei (n=3, 0,04%) Jah (n=6857, 99,96%) n=6860	Ei (n=9, 0,12%) Jah (n=6801, 99,88%) n=6810	p>0,05
Kui vanalt algas menstruatsioon	13,3 \pm 1,4 [13 (12-14)] n=5690	13,3 \pm 1,4 [13 (12-14)] n=5667	p>0,05
Menstruatsioon peatunud	n=464/953, 48,7%	n=527/960, 54,9%	p>0,05
Menstruatsioonide lõppemise vanus menopausiga naistel	49,6 \pm 0,2 [50 (48-52)] Min 20 Max 58 n=464	48,4 \pm 0,19 [49 (46-51)] Min 27 Max 59 n=526	p<0,01
Mitu rasedust on olnud	3,0 \pm 1,9 [3 (2-4)] Min 0 Max 23 n=5178	3,0 \pm 1,9 [3 (2-4)] Min 0 Max 16 n=4610	p>0,05
Elussündide arv	1,6 \pm 0,9 [2 (1-2)] Min 0 Max 8 n=4313	1,8 \pm 1,1 [2 (1-2)] Min 0 Max 11 n=3776	p<0,01
Tehislike raseduse katkestamiste arv	1,9 \pm 1,4 [1 (0-2)] Min 0 Max 16 n=4311	0,9 \pm 1,3 [0 (0-1)] Min 0 Max 13 n=3731	p<0,01
Iseeneslike raseduse katkemiste arv	0,2 \pm 0,6 [0 (0-0)] Min 0 Max 8 n=4308	0,2 \pm 0,6 [0 (0-0)] Min 0 Max 8 n=3725	p>0,05
Pole kunagi rase olnud	n=5/5178, 0,10%	n=3/4610, 0,07%	p>0,05

2.3.2. Üksikmarkeri assotsiatsioonianalüüs korduva vaginiidi esinemisel

Korduva vaginiidi GWAS analüüsil 6870 juhu ja 5945 kontrolli võrdlemisel leiti üks statistiliselt oluline ($p < 5 \times 10^{-8}$) marker 10. kromosoomil (chr10:115717300:C:T, GRCh37/hg19) (Joonis 2). Kõige tugevamat assotsiatsiooni omanud SNV (rs1036732378) MAF oli 0,0035 (MAF juhtudel 0,0016 ja kontrollidel 0,0056) ja $p = 7,8 \times 10^{-9}$. Tegemist on harva variandiga, mida Eestis esineb oluliselt sagedamini ($T = 0,0038$, 17/4480 eestlasel (Tasa et al. 2019)) kui GnomAD andmestikus ($T = 0,00061$, 19/31394 (Karczewski et al., 2020)), seega võib tegu olla Eesti-spetsiifilise leiuga. Leitud variandi kohta ei ole aprill 2020.a seisuga avaldatud ühtegi publikatsiooni ega avastatud kliiniliselt olulist leidu.



Joonis 2. Korduva vaginiidi (RHK-10 B73.3, N76.0, N76.1) üksiku markeri assotsiatsiooniuringu Manhattan'i joonis. X- teljel on märgitud assotsieerunud markerite genoomsed positsioonid ning Y-teljel p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm. Hall katkendjoon tähistab p-väärtust 5×10^{-8} . Assotsieerunud üksik statistiliselt oluline SNV (rs1036732378) (heleroheline) tähistatud 10.kromosoomil (chr10:115717300:C:T, GRCh37/hg19).

2.3.3. Geenipõhine assotsiatsioonianalüüs

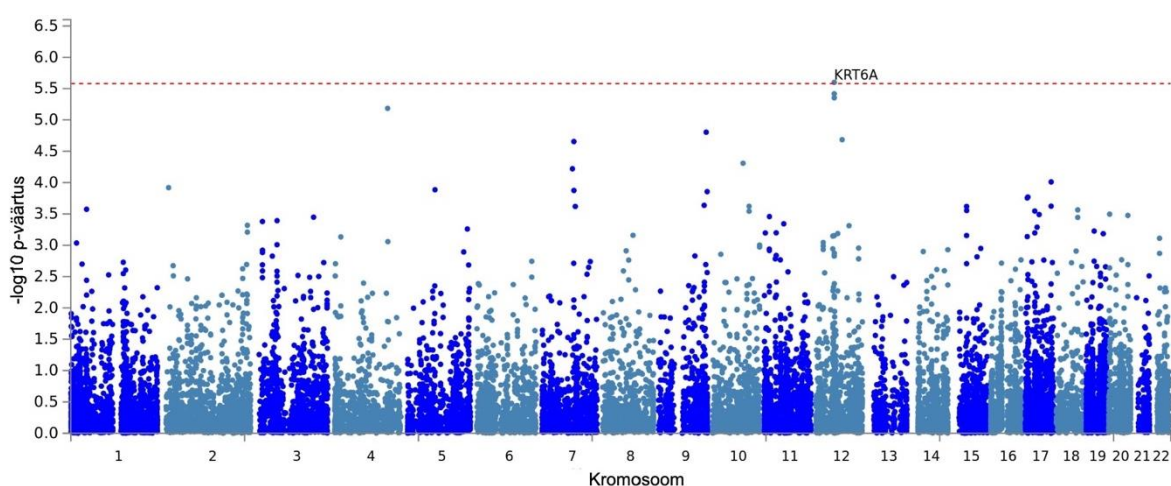
MAGMA (*Multi-marker Analysis of GenoMic Annotation* (de Leeuw et al., 2015)) ülegenoomne geeni assotsiatsioonianalüüsil oli üks geen, mis ületas soovitud olulisuse piiri ($p = 2,63 \times 10^{-6}$, Bonferroni korrigeerimine 19032 valku kodeeriva geeni assotsiatsiooni testil) (Joonis 3). *KRT6A* on keratiini geeniperekonda kuuluv Keratiin 6A geen. II tüüpi tsütokeratiinid koosnevad aluselitest või neutraalsetest valkudest, mida ekspresseeritakse lihtsate ja kihistunud epiteelkudede diferentseerumisel. Geeni ekspresseeritakse koos *KRT16* ja/või *KRT17* abil keele filiformsetes papillides, suu limaskestas kihistunud epiteelil ja söögitorus,

juuksejuure folliikuli välimises kihis, näärmeepiteelides, emakas, emakakaelas ja tupes (Uhlen et al., 2015) (<http://www.proteinatlas.org>).

Geeni C-terminaalse regiooni peptiidid omavad antimikroobset aktiivsust patogeenide suhtes. *KRT6A* kodeerib kõige rohkem isovorme ning nende geenide mutatsioone on seostatud haruldase autosomaalse dominantse nahahaigusega *pachyonychia congenita*. Hiirtel, kes on *KRT6A* geeni suhtes homosügootsed *knock-out*'id, on täheldatud haavade aeglast paranemist ja keratinotsüütide morfoloogia muutusi (Bult et al. 2019) (<http://www.informatics.jax.org/>).

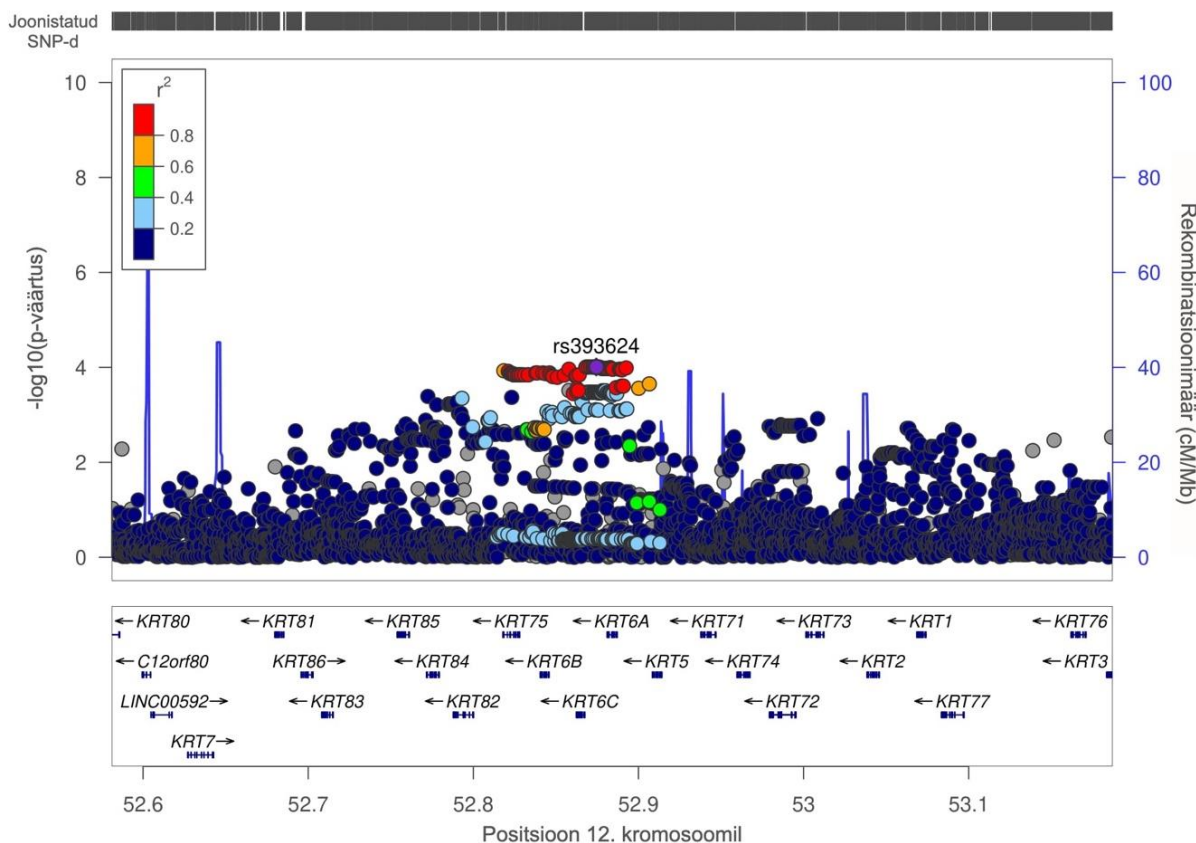
The Human Protein Atlase (Uhlen et al., 2015) andmetel on tupe epiteeli basaalkihis keratiini sisaldavad valgud (*KRT15*) kõrgelt ekspresseeritud, mis teevad epiteeli mehhaanilise stressi ja kahjustuste suhtes resistentsemaks. Lisaks tupele on sarnased geenid ekspresseeritud ka teistes lameepiteelkudedes, nagu söögitorus, keelel ja emakakaelas. Ka *KRT6A* on lisaks tupele kõrgelt ekspresseeritud söögitorus. Kuigi tupe ja söögitoru epiteelid on kategoriseeritud mittekeratiniseerituks, kasutavad mõlemad siiski keratiini valke, et luua vastupidav ja terviklik struktuur, kuid oluliselt vähem, kui veekindlates naha sarvkihtides (Uhlen et al., 2015).

PheWeb (Fernández et al., 2018) ja Oxford Brain Imaging Genetics (BIG) (<http://big.stats.ox.ac.uk/>) andmebaasis on seostatud *KRT6A* geeni lookust näiteks järgmiste fenotüüpidega: healoomuline neoplasm ajus või teistes närvisüsteemi osades ($p=3,1 \times 10^{-6}$); teiste sümptomitega alakõhu ja vaagna piirkonnas ($p=3,8 \times 10^{-6}$); suuremate süljenäärmete vähi ($p=4,4 \times 10^{-6}$); kolelitiias koos teiste koletsüstiitidega ($p=5,1 \times 10^{-6}$); täpsustamata emakakaela pahaloormuline kasvaja (RHK-10 C53.9) ($p=6,0 \times 10^{-25}$); mitteorgaanilised seksuaaldüsfunksioonid (RHK-10 F52) ($p=1,2 \times 10^{-15}$).



Joonis 3. Manhattan'i joonis MAGMA ülegenoomne geenipõhine assotsiatsioonianalüüsi kohta. Ülegenoomse statistilise olulisuse piiriks on $p=2,6 \times 10^{-6}$ (punane katkendjoon). X-teljel on märgitud geenide geoomsed positsioonid ning Y-teljel p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm.

MAGMA ülegenoomse geeni assotsiatsioonianalüüsi olulisuse piiri ületanud geen *KRT6A* piirkonnas (± 300 kb) paiknevad ka teised nominaalselt olulised ($p < 5 \times 10^{-2}$) *KRT* geenid. LocusZoom (Pruim et al., 2010) tarkvaras visualiseeriti 12. kromosoomis oleva *KRT6A* ümber paiknevat regiooni, kus on näha selles piirkonnas asuvaid teisi geene (Joonis 4).



Joonis 4. *KRT6A* geeni piirkonnas (chr12:52580957-53187181) paiknevad markerid. Erineva värvusega on esitatud markerite LD markeriga rs393624 ($p = 9,8 \times 10^{-5}$). X-teljel on märgitud markerite asukohad 12. kromosoomil ja Y-teljel p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm. Sinised jooned tähistavad rekombinatsioonimäära. Joonise all on välja toodud piirkonnas asuvate geenide asukohad UCSC (*University of California Santa Cruz*) Genome Browser'is (Kent et al., 2002). Geeni nimede all on kujutletud eksonite asukohti ja noolega on tähistatud transkribeeritud ahel.

2.3.4. Kandidaatvariandid

Korduva vaginiidi kandidaatvariantide leidmiseks sätestati minimaalseks p-väärtuse läveks 5×10^{-6} , mille alusel toodi välja juht-SNP-d 22. lookuses (Tabel 4), mis võivad uuritava fenotüübiga assotsieeruda. FUMA (Watanabe et al., 2017) kasutab markerite annoteerimisel Molecular Signatures Database (MSigDB) v5.2 (Liberzon et al., 2011; Subramanian et al., 2005) andmebaasi ja geeniontoloogia (GO) termineid. Enamus ($n=129/270$ ja $n=74/270$, 75,2%) kandidaatvariante asub vastavalt intergeenses või intronite piirkonnas ning 51,1% variantidest kattuvad mõne kromatiini oleku annotatsiooniga, mis viitab, et nad võivad mõjutada geeniregulatsiooni. Potentsiaalse efektortranskripti identifitseerimiseks 22-st

lookusest, sorteeriti välja eelkõige need geenid, mille kohta oli tõendeid eQTL andmestikest (st mõni identifitseeritud kandidaat-SNP-dest mõjutab teadaolevalt selle geeni ekspressiooni mõnes koes) (Joonis 6) ning eelkõige keskenduti valku kodeerivatele transkriptidele.

Kromosoom 1 riskilookuses (juhtiv SNP rs138927295, Tabel 4, Lisa 3, Joonis 7) on välja pakutud kandidaatgeenidest (kokku 36) nii eQTL kui ka kromatiininteraktsiooni andmeid *TRIM58* (*Tripartite Motif Containing 58*) kohta. Seda ubikvitiini ligaasi perekonna liiget on National Cancer Institute'i (<https://www.cancer.gov/>) andmetel seostatud kopsu lamerakulise kartsinoomi ja kopsu epidermoidse rakukartsinoomiga. FANTOM5 CAGE (Takahashi et al., 2012) andmestikus, mis koondab andmeid erinevate kudede RNA ekspressiooni kohta, on *TRIM58* kõrgelt ekspresseerunud platsentas (27,4 skaalatühikut miljoni kohta), kuid teistes reproduktiivtrakti kudedes on ekspressioon pigem madal.

Kromosoom 2 riskilookuses (juhtiv SNP rs13004371, Tabel 4, Lisa 4, Joonis 8) on neli võimalikku kandidaatgeeni (*PUS10*, *KIAA1841*, *AHSA2*, *USP34*), mis kaardistati eQTL andmete põhjal ehk riskilookuses asuvad kandidaat-SNPd on seotud kindlas koes või rakutüübis nende geenide ekspressiooni reguleerimisega. *PUS10*, *KIAA1841* ja *USP34* on madala koespetsiifilisusega ja neid leidub kõikides kudedes. *AHSA2* nimelist The Human Protein Atlases ei leidu, kuid samasse kuuma-šoki valk 90 ATPaasi aktivaatori perekonda kuuluv *AHSA1* omab tipes kõrget ekspressiooni taset (Uhlen et al., 2015) (<http://www.proteinatlas.org>).

Kromosoom 9 riskilookuses (juhtiv SNP rs12001180, Tabel 4, Lisa 5, Joonis 9) on eQTL andmete põhjal välja pakutud kandidaatgeen *VAV2*, mida FinnGen (FinnGen, 2020, <http://r2.finnngen.fi/>) GWAS uuringu tulemusel on seostatud sugulisel teel levivate haiguste vastuvõtlikkusega. Selles lookuses on kõige tõenäolisem efektor SNP FUMA andmetel rs57520738, mille RDB väärtus on 2b ehk see kandidaat-SNP tõenäoliselt mõjutab transkriptsioonifaktori seondumist. RDB ehk RegulomeDB skoorid põhinevad eQTL andmetele ja kromatiini tähistustel. Kliiniliselt olulist leidu pole selle variandi kohta avaldatud ning Eesti populatsioonis on harvema alleeli (G) esinemissagedus 0,1232 (552/3854) (Tasa et al., 2019). RDB skoor varieerub vahemikus 1a – 7, kus madalam skoor näitab suuremat tõenäosust, et antud variant omab regulatoorset funktsiooni.

Kromosoom 10 asuvas riskilookuses (juhtiv SNP rs7895098, Tabel 4, Lisa 6, Joonis 10) on eQTL andmete alusel kõige tõenäolisem kandidaatgeen *GRID1*. Protein Atlase andmetel seda geeni reproduktiivtrakti kudedes ei ekspresseerita, küll on mõningast ekspressiooni täheldatud immuunrakkudes (täpsemalt basofiilides) (Uhlen et al., 2015). Selles lookuses on 35 kandidaat-SNP-d, mille hulgas on kõige madalama RDB skooriga rs17400856 (2a), mis on *GRID1* intronis asuv variant, kuid millega pole kliiniliselt olulisi fenotüüpe varasemalt seostatud.

Kõige madalama RDB skooriga kandidaat-SNP-d asuvad 10. (rs17400856, 2a) ja 9. (rs57520738, 2b) kromosoomis, ülejäänud kromosoomide riskilookustes nii madala RDB skooriga tulemusi ei leitud, vaid varieerusid 3a-7.

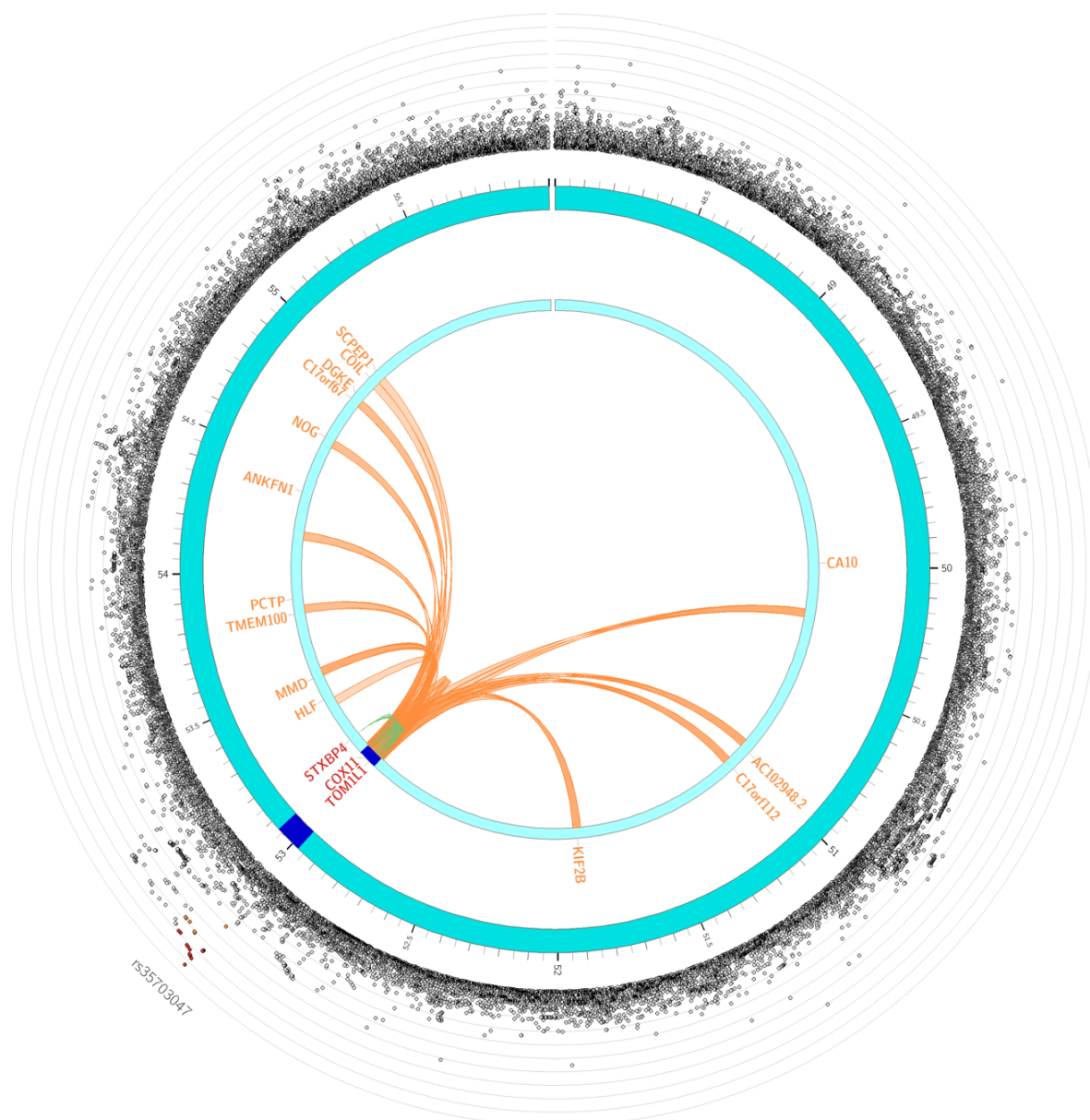
10. kromosoomis identifitseeriti lisaks üks signaal (rs117289551, chr10: 116064284, $p=2,9 \times 10^{-6}$), mis asub GWAS üksikvariandi analüüsi signaalist (rs1036732378, chr10: 115717300) ~347kb kaugusel. Selles lookuses pakuti kromatiininteraktsioonide alusel kandidaatgeenina välja aktiini filamendiga seotud *AFAPIL2*, mille valgu ekspressiooni on keskmisel tasemel leitud nii tipes kui ka munajuhades. Immuunrakutüübi spetsiifilisus on madal, kuid leidub rohkem T- ja B-rakkudes. *AFAPIL2* osaleb signaaliülekanne kaskaadis, suurendades Src kinaasi aktiivsust. (Uhlen et al., 2015). Vastava geeni *knock-out* hiirtel on täheldatud trahhea epiteeli paksenemist ning vigastusjärgset trahhea epiteeli hüperplaasiat, mis võib viidata *AFAPIL2* rollile epiteelirakkude funktsiooni reguleerimisel (Bult et al. 2019) (<http://www.informatics.jax.org/>).

Kromosoom 14 (juhtiv SNP rs111271943, Tabel 4, Lisa 7, Joonis 11) asuvad kandidaat-SNP-d on seotud kahe geeni (*PACS2*, *CRIP2*) ekspressiooni reguleerimisega. *PACS2* on madala ekspressiooniga reproduktiivkudedes, kuid selle ekspressiooni on täheldatud immuunrakkudes (dendriitrakkudes, monotsüütides). *CRIP2* on reproduktiivtraktis ekspresseeritud, selle kohta on tõendeid ka valgu tasandil ning lisaks ekspresseeritakse seda ka paljudes immuunrakkudes (T- ja B-rakkudes). (Uhlen et al., 2015) Kandidaat-SNP-sid on selles kromosoomis kaks (rs111271943, rs111376436).

Kromosoom 16 riskilookuses (juhtiv SNP rs13337510, Tabel 4, Lisa 8, Joonis 12) on eQTL andmete põhjal võimaliku kandidaatgeenina välja toodud *NOD2* (tuntud ka kui *Card15*). *NOD2* on nukleotiide siduv oligomerisatsioonidomeeni sisaldav madala koespetsiifilisusega geen, mille ekspressiooni on detekteeritud paljudes kudedes. *NOD2* funktsiooni on seostatud gastrointestinaaltrakti immuunsusega (Uhlen et al., 2015) ning hiirtel on selle geeni *knock-out* idel täheldanud immuunsüsteemis ebanormaalsel morfoloogiat, füsioloogiat ning suurenenud vastuvõtlikkust koliidile (Bult et al. 2019) (<http://www.informatics.jax.org/>). *NOD2/CARD15* on üks nendest geenidest, mida on varasemalt seostatud vaginiitide etiopatogeneesiga, kuna suudab reguleerida immuunvastust Gram-positiivsete ja Gram-negatiivsete bakterite suhtes (Verstraelen et al., 2009).

Kromosoom 17 riskilookuse juhtivaks SNP-ks on rs35703047 koos 24 kandidaat-SNP-ga (Joonis 5, Tabel 4), ning kandidaatgeenidena on eQTL ning kromatiininteraktsiooni andmete põhjal välja pakutud kolm geeni *COX11*, *TOM1L1* ja *STXBP4*. *STXBP4* on süntaksiini siduv valk, mis on kõrgelt ekspresseeritud (ka valgu tasemel) nii naise reproduktiivkudedes, kui ka erinevates immuunrakkudes. Nii *COX11* kui ka *TOM1L1* on madala koespetsiifilisusega ning

neid ekspresseeritakse (ka valgu tasemel) naise reproduktiivkudedes. *COX11* on ekspresseeritud ka erinevates immurakkudes, kuid *TOM1L1* peamiselt dendriit- ja T-rakkudes. (Uhlen et al., 2015).



Joonis 5. Kromosoom 17 Circos’ e joonis. Kõige välimine kiht on Manhattan’i joonis, kus on esindatud ainult need SNP-d, mille $p < 5 \times 10^{-2}$. Riskilookuses olevad SNP-d on värvitud vastavalt r^2 alusel juhtiva SNP suhtes lookuses: punasega $rs35703047$ ($r^2 > 0,8$), oranžiga ($r^2 > 0,6$) ja halliga SNP-d, mis ei ole LD-s ühegi sõltumatult olulise SNP-ga ($r^2 \leq 0,2$). Y-telg on SNP-de p-väärtuse negatiivne kümnendlogaritm. Riskilookus on tähistatud siniselt. Rohelised kaared ühendavad riskilookuses paikneva eQTL SNP ja geeni, mille ekspressiooniga vastav SNP seotud on. Punasega on tähistatud geenid (*STXBP4*, *COX11*, *TOM1L1*), mille kohta on andmeid nii eQTL kui kromatiininteraktsioonide andmestikest. Oranžid kaared tähistavad kromatiininteraktsioone ning oranžiga värvitud geenid on kaardistatud kromatiininteraktsioonide alusel ($FDR < 1 \times 10^{-6}$). Joonis on genereeritud Circos programmi abil (Krzywinski et al., 2009).

Kromosoom 20 (juhtiv SNP rs6014727, Tabel 4, Lisa 9, Joonis 13) riskilookuse lähedal leidub kolm (*RTFDCl*, *CSTF1*, *CASS4*) eQTL ja kromosoominteraktsioonide alusel kaardistatud geeni ning kolm (*FAM209B*, *FAM209A*, *GCNT7*) ainult eQTL tõenditega geeni. Nii *RTFDCl*, *CSTF1* kui ka *CASS4* geeni valk on naise reproduktiivkudedes ekspresseeritud. *CSTF1* ja *RTFDCl* on madala immuunrakuspetsiifilisusega ning on avaldunud kõikides immuunrakkudes. *CASS4* on rikastunud neutro- ja eosinofiilides. *FAM209B* ja *FAM209A* ekspressiooni naise reproduktiivkudedes tuvastatud pole, kuid teda leidub immuunrakkudes (neutrofiilides, T-rakkudes, eosinofiilides). *GCNT7* on madalal RNA tasemel ekspresseerunud munasarjades, tupes, rinnakoes ja endomeetriumis. Immuunrakkudest on tuvastatud *GCNT7* RNA tasemel neutrofiilidest (Uhlen et al., 2015).

Manuaalselt kureeritud teadusartiklitest leitud vaginiidi diagnoosiga seotud kandidaatgeenide loetelust (Lisa 10, Tabel 7) kontrolliti nende variantide p-väärtuseid, mille rs-numbrid olid artiklites üheselt arusaadavalt välja toodud. Varasemalt väljapakutud kandidaatgeen *CARD15* (Verstraelen et al., 2009), teise nimega *NOD2*, on ka antud töö raames 16. kromosoomi riskilookuses ühe kandidaatgeeninna välja pakutud. Konkreetselt kirjandusest leitud *NOD2* variant rs2066844 aga GWAS tulemustes statistilist olulisust ei oma ($p=0,9843$).

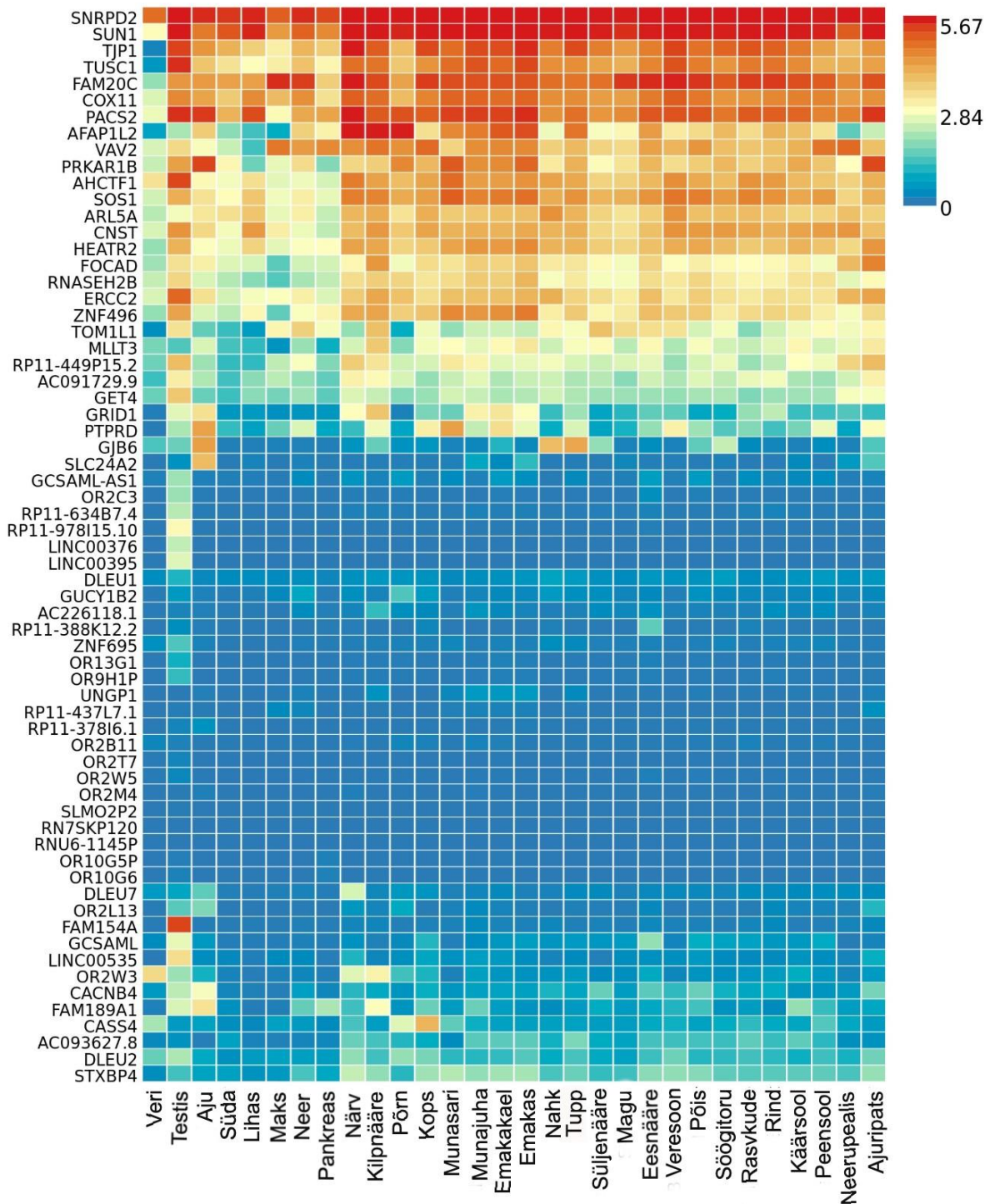
Lisaks leiti, et geeni *PRKCH* intronis olev variant rs2251260 (Tian et al., 2017) oli ka käesoleva GWAS üksikmarkeri analüüsis nominaalselt oluline ($p=0,0397$). *PRKCH* on valgu kinaas C, mis reguleerib keratinotsüütide diferentsiooni aktiveerides valgu kinaasse ensüümi (MAPK13) aktiveeritud valgu kinaasi kaskaadi (Kashiwagi et al. 2002).

MAGMA geenipõhise analüüsi tulemusi võrreldes varasema kirjanduse andmetega, osutus nominaalselt oluliseks ($p=0,0017$) *LBP* geen, mis on vähesel määral ekspresseeritud naise reproduktiivorganites ning on seostatud akuutse faasi immuunvastuse ja Gram-negatiivsete bakterite infektsiooniga, reageerides nende rakuseina lipopolüsahhariididega kutsub esile monotsüütide immuunvastuse (Uhlen et al., 2015).

Tabel 4. Statistiliselt kõige olulisemad korduva vaginiidiga seotud geenivariandid 22 riskilookuses. Kandidaatgeenide kaardistamisel kasutati nii juhtivaid SNP-sid (*leadSNPs*) kui ka kõiki kandidaat-SNP-sid, mis olid juhtivate SNP-dega LD-s $r^2 \geq 0,6$, $MAF \geq 1\%$, p -väärtus $> 5 \times 10^{-2}$. p -väärtused on ümardatud kümnetuhandikeni. Rasvaselt on välja toodud geenid, mis omasid eQTL tõendeid ehk olid Circos'e joonisel välja toodud rohelisena.

Marker	Kromosoom	Positsioon	Alleelid	MAF	Kandidaatgeenid	Kandidaat-SNP-de arv kaardistamisel
rs138927295	1	247694142	A:C	0,0010	<i>CNST; AHCTF1; ZNF695; ZNF670; ZNF496; OR2B11; OR2W5; GCSAML; GCSAML-AS1; OR2C3; RP11-978I15.10; RP11-634B7.4; OR13G1; OR9HIP; OR2W3; OR2L13; OR2M4; OR2T7</i>	46
rs144954582	2	152761469	A:G	0,0029	<i>ARL5A; CACNB4</i>	3
rs13004371	2	61839925	C:T	0,1799	<i>RNU6-1145P</i>	1
rs78317284	2	39293342	C:T	0,0119	<i>SOS1</i>	1
rs578183875	7	398997	C:G	0,0010	<i>AC093627.8; FAM20C; AC226118.1; PRKAR1B; HEATR2; SUN1; GET4; RP11-449P15.2; AC091729.9</i>	9
rs111227510	8	94276814	A:C	0,0278	<i>PACS2</i>	2
rs12001180	9	136745757	A:G	0,0003	<i>VAV2</i>	28
rs185370394	9	25433721	C:T	0,0020	<i>RN7SKP120; TUSC1</i>	4

rs529940132	9	19767281	C:T	0,0010	<i>FAM154A; SLC24A2; RP11-378I6.1; RP11-378I6.2; AL512635.1; MLLT3; FOCAD</i>	16
rs117765142	9	8935028	C:G	0,0010	<i>PTPRD</i>	1
rs7895098	10	87650378	A:G	0,1541	<i>GRID1</i>	35
rs117289551	10	116064284	C:T	0,0199	<i>AFAP1L2</i>	1
rs11219403	11	123872824	A:C	0,0020	<i>OR10G6; OR10G5P</i>	2
rs568217614	13	20851582	C:T	0,0020	<i>GJB6</i>	1
rs138651841	13	64120446	C:T	0,0060	<i>LINC00376; LINC00395</i>	2
rs545159245	13	50795309	A:C	0,0010	<i>DLEU2; DLEU1; DLEU7; RNASEH2B; GUCY1B2; SLMO2P2</i>	8
rs111271943	14	105810948	C:G	0,0278	<i>PACS2</i>	2
rs182259988	15	29866270	G:T	0,0010	<i>FAM189A1; TJP1</i>	2
rs13337510	16	51352918	A:G	0,1163	<i>UNGP1; RP11-437L7.1</i>	24
rs35703047	17	52985323	C:T	0,1050	<i>TOM1L1; COX11; STXBP4</i>	24
rs530228471	19	45875884	A:T	0,0010	<i>ERCC2; SNRPD2</i>	2
rs6014727	20	55009183	A:C	0,2097	<i>CASS4</i>	16



Joonis 6. FUMA poolt kaardistatud võimalike kandidaatgeenide keskmine log₂ transformeeritud ekspressiooniväärtus vastavas koes. Punasega värvitud tulemused tähistavad kõrgemat ekspressiooni taset koes. Ekspressiooni väärtus on transkripte miljoni kohta.

2.4. Arutelu

Vaginiit on üks peamisi põhjuseid, miks naised külastavad günekoloogi. Edukalt ravist hoolimata on korduvate sümptomite esinemine suureks probleemiks (Anderson, 2004; Lipsky et al., 2000). Korduvat vaginiiti on seostatud mõnede elustiilifaktoritega (Cherpes et al., 2008; Hillier, 2005). Viimasel kümnendil on proovitud leida seoseid naiste geneetikaga ning välja pakutud kandidaatgeenid on valdavalt seotud immuunsüsteemiga. Eestis vaginiitide geneetilist eelsoodumust varasemalt uuritud ei ole, samuti puuduvad samal teemal suuremahulised uuringud, mistõttu on teemavalik oluline ning edasist uurimist vajav.

Sellest tulenevalt oli käesoleva magistritöö peamiseks eesmärgiks leida korduvate vaginiitidega seotud geneetilised riskifaktorid. Lisaks võrreldi uuritava grupi elustiili ja tervisemarkerite andmeid tervete naiste andmetega, et paremini mõista elustiilifaktorite rolli korduvate vaginiitide tekkes.

Saadud elustiili ja tervisemarkerite analüüsi tulemused näitasid, et juhtude ja kontrollide seas ei esinenud statistiliselt olulist erinevust vanuse, alkoholi tarvitamise, suitsetamise staatuse, menstruaaltsükli ja raseduste arvu poolest, mis kinnitab varasema kirjanduse arvamust, et tegemist ei ole vaginiiti soodustavate tegurite, vaid surrogaatmarkeritega, mis koostöös teiste organismi interaktsioonidega võivad suurendada vaginiiti haigestumise riski (Cherpes et al., 2008; Hillier, 2005). Lisaks selgus veel, et tervetel naistel oli elussündide arv kõrgem kui vaginiidi diagnoosiga naistel ($1,8 \pm 1,1$ vs $1,6 \pm 0,9$), kuid tehisaborte oluliselt vähem ($0,9 \pm 1,3$ vs $1,9 \pm 1,4$), samas oli raseduste arv kahel grupil sarnane ($3,0 \pm 1,9$ vs $3,0 \pm 1,9$). See võib viidata kahe grupi erinevale reproduktiivkäitumisele, ka varasemalt on näidatud näiteks BV seost seksuaalkäitumise, sh kaitsmata vahekorra ning vahekorra sagedusega (Fethers et al. 2008; Jaspers et al. 2015; Verstraelen et al. 2010). Kahjuks polnud saadaval infot uuritavate seksuaalpartnerite arvu osas, mis võiks aidata seda küsimust täpsemalt lahata. Samuti tuleb iseeneslike ja tehislake raseduste katkemise ja raseduste ning elussündide arvu tulemusi võrreldes arvesse võtta, et korduva vaginiidi diagnoosiga naiste vastanute hulk oli vastamata jätnutest oluliselt suurem ($p < 0,01$). See tähendab, et mingil põhjusel on terved naised reproduktiivküsimustele vähem vastanud, mis võib viidata, et nad pole kunagi rasedad olnud ja seega polnud neil midagi vastata või lihtsalt ei soovinud seda teha. Kõiki küsimustiku andmete tõlgendamisel, peab arvestama seda, et vastused pärinevad küsimustikust, mida need naised täitsid geenidoonoriks hakkamise hetkel, seega praeguseks hetkeks võib olla kõik muutunud. Kuna tervise- ja elustiili info ei andnud selget infot korduvate vaginiitide põhjuste osas, siis see võib viidata, et korduva vaginiidi etiopatogenees on palju keerulisem ja oma roll võib muuhulgas olla geneetikal.

Üheks võimaluseks vaginiidi geneetika täpsemal uurimisel on ülegenoomne assotsiatsiooniuuring. Antud töös viidi uurimus läbi Eesti populatsioonis, kus valim koosnes 6870 korduva vaginiidiga naisest ning 5945 naisest, kellel ei ole elu jooksul diagnoositud ühtegi vaginiidi (RHK-10 B37.3, N76.0, N76.1) episoodi. Nii geenipõhise analüüsi tulemused kui seniste kandidaatgeenide/variantide testimine valimis viitavad epiteeli rollile vaginiidi kujunemisel, mida varasemates uuringutes pole põhjalikumalt uuritud ning näitab, et probleemi tuum on palju keerulisem ning ei sõltu valdavalt immuunsüsteemist.

Geenipõhises assotsiatsioonianalüüsis tuvastatud *KRT6A* geen on kõrgelt ekspresseeritud naise reproduktiivtraktis ning selle geeni *knock-out* hiirtel on täheldatud haavade aeglasemat paranemist ja keratinotsüütide morfoloogia muutuseid (Bult et al. 2019; <http://www.informatics.jax.org/>). *KRT6A* ekspressiooni puudumisel ei toimu epiteelikihtide diferentseerumist ning rakud on vastuvõtlikumad füüsilisele stressile. Kui epiteelikiht on õhuke, muutub tupe homöostaas, kutsudes esile immuunvastuse (Li et al., 2018), mistõttu on ka ilmselt üks põhjus, miks eelnevates uuringutes on seostatud vaginiiti erinevate immuungeenidega. Varasemalt on näidatud, et *KRT* geenid teevad tihedat koostööd teiste oma pereliikmetega tervikliku epiteeli kihtide moodustamisel (Wallace et al., 2012), ning ka antud töös asusid *KRT6A* lähedal teised nominaalselt olulised *KRT* geenid, mis näitab antud regiooni ja geenide võimalikku seost fenotüübiga. Vaginiidi korral on tupe mikrobiota mitmekesisus suurenenud ning bakterite tsütotoksiinide tõttu keratiingeenide ekspressioon märgatavalt langenud (Borgdorff et al., 2016; Eschenbach et al., 2000). *KRT6A* ekspressiooni muutus mõjutab aga epiteeli kihtide terviklikkust ning seega suureneb ka vastuvõtlikkus patogeenidele. Üksikmarkeri assotsiatsioonianalüüsil leiti 10. kromosoomil üks statistiliselt oluline marker rs1036732378, mida Eestis esineb oluliselt sagedamini kui mujal maailmas ning 2020.a kevade seisuga ei ole selle kohta avaldatud ühtegi publikatsiooni. Küll aga leiti sellest signaalist 347kb kaugusel üks marker, mis oli samuti fenotüübiga nominaalselt seotud (rs117289551, $p=2,9 \times 10^{-6}$), ning mis on mõnevõrra sagedasem (MAF=0,0199). Selles riskilookuses oli kromatiininteraktsioonide alusel võimaliku kandidaatgeeninna välja pakutud *AFAPIL2*, mis on ekspresseeritud ka tupes ja munajuhades (The Human Protein Atlas; Uhlen et al., 2015), ning mis võib mängida rolli epiteelirakkude funktsiooni reguleerimisel, kuna vastava geeni *knock-out* hiirtel on täheldatud muutusi trahhea epiteelis (Bult et al. 2019). *AFAPIL2* roll genitaaltrakti epiteelirakkudes ei ole teada. Edasiste analüüside käigus peaks selgitama, kas ja milline on LD rs1036732378 ja rs117289551 vahel, ning kas rs1036732378 võiks näiteks distaalselt mõjutada *AFAPIL2* ekspressiooni.

GWAS uuringu tulemused ja varasema kirjanduse andmed kattusid *Card15/NOD2*, *PRKCH* ja *LBP* geenide osas. Varasemalt on kirjanduses *Card15/NOD2* (eelkõige rs2066844) ja *LBP*

seostatud vaginiidi geneetilise eelsoodumusega (Verstraelen et al., 2009), kuna need geenid reguleerivad immuunvastust Gram-positiivsete ja Gram-negatiivsete bakterite suhtes. Ka antud töös oli 16.kromosoomi riskilookuses *NOD2* võimaliku kandidaatgeenina välja toodud, küll aga ei olnud kirjanduses mainitud riskivariant käesolevas GWAS tulemustes statistiliselt oluline. Nii varasema kirjanduse (Tian et al., 2017) kui ka antud GWAS tulemused kattusid *PRKCH* osas, kus variant rs2251260 oli nominaalselt oluline ka käesoleva GWAS üksikmarkeri analüüsis ning mille funktsiooni on seostatud keratinotsüütide diferentsiooniga (Kashiwagi et al. 2002). Tian et al. vulvovaginaalse kandidaasi uuringus tuli *PRKCH* geenis välja ka teisi SNP-sid, mis olid kõrges LD-s markeritega, mille funktsiooni on seostatud epidermise keratinotsüütidega. Nende uuring on olnud üks selle valdkonna suurimaid, mis tõstab saadud tulemuse usaldusväärsust ning geeni *PRKCH* keskset rolli vaginiitide kujunemisel. Kahjuks polnud kõikides artiklites üheselt arusaadavalt välja toodud variantide rs-numbreid, mis raskendas tulemuste võrdlemist käesoleva töö tulemustega.

Kõiki antud töö tulemusi tõlgendades tuleb arvestada, et tegemist on esialgsete leidudega, mis vajavad sõltumatut replikatsiooni. Mitmed tuvastatud kandidaatvariandid on harvad või madala sagedusega, mis võib tähendada, et tegemist on juhuslike leidudega. Usaldusväärsemate tulemuste saamiseks on vaja suuremat uuringugruppi. Antud uuringu uuritavate anamnees võib olla puudulik ning samuti võib esineda kontrollgrupis naisi, kellel tegelikult on huvipakkuvaid diagnoose esinenud, kuid need ei kajastu ametlikes terviseandmetes. Eriti vanemas eas naistel ei pruugi nooruses saadud diagnoosid kajastuda elektroonilistes terviseandmetes, sest E-tervise raviarvete andmed on alates 2004. aastast.

Käesolevas töös keskenduti kandidaatgeene prioritseerides eelkõige valku kodeerivatele transkriptidele, kuid paljudes identifitseeritud lookustes esines mittekodeeritavaid RNA transkripte, mille osalust ei saa välistada, kuid see nõuab edasisi uuringuid.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et kõiki saadud tulemusi arvestades kerkib esile epiteeli roll korduvate vaginiitide riski modifitseerimises, mis on uus ja huvitav teadmine, kuid saadud tulemuste kinnitamiseks tuleks järgmise sammuna leide replitseerida sõltumatu valimiga.

Kokkuvõte

Naissuguteede mikrobiotal on väga suur roll reproduktiivtrakti tervise tagamisel. Mikrobiota düsbilanss võib viia vaginiidi tekkeni, mida iseloomustavad ebamugavustunne tupes, valu, sügelus, ärritus, suguelu probleemid, ebameeldiv lõhn ning vooluse konsistentsi, värvuse ja koguse muutus. Kõige levinumateks vaginiidi diagnoosideks on bakteriaalne vaginosis ning vulvovaginaalne kandidaas, mis pärast edukat ravi kipuvad sageli korduma. Mitmete haiguste eelsoodumust võib reguleerida naise geneetika, mis mõjutades mikroobide kasvutingimusi, soodustavad või piiravad nende vohamist. Seetõttu on tõenäoline, et ka korduva vaginiidi üheks riskifaktoriks võib olla geneetiline komponent. Varasemalt on vaginiidi uuringuid teostatud kandidaatgeeni uuringutena ning uuritud geenid on valdavalt seotud immuunsüsteemiga. Kandidaatgeenide uuringud on aga tihtipeale väikese valimiga ning saadud tulemused ei ole nii usaldusväärsed. Korduva vaginiidi geneetilise eelsoodumuse täpsemaks uurimiseks ei ole teadaolevalt ühtegi ülegenoomset assotsiatsioonianalüüsi (GWAS) varasemalt teostatud ning käesolev töö oli maailmas esimene.

Antud uurimuse läbiviimiseks kasutati Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu naisgeenidonorite proove, kus GWAS käigus võrreldi 6870 korduvate vaginiidi episoodidega naise ja 5945 vaginiitideta naise genoomi. Juhtude alla kuulusid kõik naised, kes omasid genotüübi andmeid ning kellel on diagnoositud vähemalt 2 vaginiidi episoodi järgmiste diagnoosidega: häbeme- ja tupekandidaas (RHK-10 klassifikatsiooniga B37.3), äge tupepõletik (RHK-10 klassifikatsiooniga N76.0) või alaäge ja krooniline vaginiit (RHK-10 klassifikatsiooniga N76.1). Töös viidi läbi E-tervise raviarvete ja Geenivaramu küsimustikust pärinevate tervise- ja elustiili andmete võrdlus, üksikmarkeri- ja geenipõhine ülegenoomne assotsiatsioonianalüüs, kandidaatvariantide ja -geenide leidmine ning nende võrdlemine varasemate teadusartiklitega. E-tervise raviarveid ja Geenivaramu elustiili küsimustike andmeid analüüsid leiti juhtude ja kontrollide vahel statistiliselt oluline erinevus tehisabortide arvu ja elussündide arvu osas. Samuti esines statistiliselt olulisi erinevusi kolme erineva diagnoosi (B37.3, N76.0, N76.1) vahel, arvestades episoodide arvu ning hetke ja diagnoosi määramise vanust.

Üksikmarkeri assotsiatsioonianalüüsil ületas p -väärtuse läve ($p < 5 \times 10^{-8}$) rs1036732378 ($p = 7,8 \times 10^{-9}$), mis asub 10. kromosoomil. Tegemist on harva variandiga, mida Eestis esineb sagedamini, kui mujal maailmas. Kandidaatvariantide ($p < 5 \times 10^{-6}$) analüüsil toodi kromatiininteraktsioonide alusel võimaliku kandidaatgeeninna esile *AFAPIL2*, mis asub rs1036732378 lähedal (~347kb), on ekspresseeritud ka tupes ja munajuhades ning võib mängida rolli epiteelirakkude funktsiooni reguleerimisel. MAGMA geenipõhises assotsiatsioonianalüüsis ületas soovitud olulisuse piiri ($p = 2,6 \times 10^{-6}$) *KRT6A* geen, mis on

kõrgelt ekspresseeritud naise reproduktiivtraktis ning mida on varasemalt seostatud haavade aeglase paranemise ja keratinotsüütide morfoloogia muutustega. *KRT6A* piirkonnas olid nominaalselt olulised ($p < 5 \times 10^{-2}$) ka teised *KRT* perekonna geenid.

GWAS uuringu tulemused ja varasema kirjanduse andmed kattusid *Card15/NOD2*, *LBP* ja *PRKCH* geenide osas, neist esimesed kaks on seotud immuunsüsteemiga ning teine keratinotsüütide diferentsiooniga.

Töös saadud tulemused näitavad, et korduva vaginiidi esinemisel omab geneetiline eelsoodumus tõepoolest tähtsust ning saadud tulemuste põhjal esineb seos uuritava fenotüübi ning epiteeli omadustega seotud geenide vahel. Saadud tulemuste kinnitamiseks tuleks nähtud seoseid replitseerida sõltumatu valimiga, mis võimaldaks jõuda lähemale haiguse tekkemehhanismi ja bioloogilise tausta mõistmiseni ning sihtmärgipõhise ravivõimaluse leidmiseni.

Resümee/Summary

The genetic risk factors for recurrent vaginitis in Estonia

Evelin Mutli

Vaginitis is an inflammatory or proinflammatory vaginal microbiota imbalance that can cause pain, itching and abnormal vaginal discharge. The most common vaginitis diagnoses are bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. Almost every woman will experience vaginitis at least once in a lifetime. Women with vaginitis have increased risk for other sexually transmitted infections (STIs), preterm delivery, miscarriage and other consequences. Despite successful treatment, recurrent episodes are frequent.

Over the last decades, a lot of candidate gene studies have been conducted to identify the underlying genes and pathways related to vaginitis. A number of different immune system genes have been proposed as candidate genes for vaginitis, but the exact mechanisms are still unknown.

The aim of this study was to identify genetic risk factors that are associated with recurrent vaginitis using genome-wide association study (GWAS) in women with and without recurrent vaginitis as concerns their health and lifestyle data. In the current study, the genetic data of 6870 cases and 5945 controls from University of Tartu Estonian Genome Center (EGCUT) were analysed using a GWAS approach (both single marker and gene-based analyses), followed by functional annotation of associated variants, candidate gene mapping and comparison of results with previous studies. Also, E-Health data and EGCUT questionnaire data were compared between cases and controls.

As a result, in single marker analysis, one statistically significant ($p=7,8 \times 10^{-9}$) marker rs1036732378 was identified on chromosome 10. It is a rare variant that is more frequent in Estonia than anywhere else in the world. 347kb apart from this signal, rs117289551 ($p=2,9 \times 10^{-6}$, MAF= 0,0199) was identified as a potential candidate variant, and *AFAPIL2* was prioritized as a potential candidate gene using chromatin interaction data. *AFAPIL2* is expressed in vagina and fallopian tube and has previously been associated with regulating the epithelial cell functionality.

A gene-based analysis identified one associated gene - *KRT6A*, that had p-value lower than the significance threshold ($p=2,6 \times 10^{-6}$). *KRT6A* is a member of the keratin protein family and is expressed during differentiation in epithelial tissues. Other *KRT* gene family members in the region were also nominally significant.

Functional mapping and annotation of genetic associations for recurrent vaginitis identified 22 potential risk loci. Potential effector transcripts were prioritized by evidence from eQTL and chromatin interaction datasets.

When comparing our results with previous studies, we found that the results overlap for *Card15/NOD2*, *LBP* and *PRKCH* genes. *Card15/NOD2* rs2066844, *PRKCH* rs2251260 and *LBP* gene have previously been associated with vaginitis. *PRKCH* rs2251260 was also nominally significant ($p=0,0397$) in this GWAS and is thought to play a role in keratinocyte differentiation.

Cases and controls were of similar age, but there were significant differences in age and in number of episodes between different vaginitis diagnoses (NIH-10 classification B37.3, N76.0, N76.1). Lifestyle data analyses revealed no significant differences between cases and controls lifestyle. However, there were significant differences in number of artificial abortions and number of live births, which could point to differences in sexual behaviour.

Considering all the findings, the potential role of the vaginal epithelium in recurrent vaginitis is highlighted. However, the results from this study are preliminary and a replication to ensure correct genotype-phenotype association is needed. For this study, candidate genes were prioritized among protein coding transcripts, thus further research including non-coding transcripts in the same risk loci is necessary.

Tänuõnad

Täna kõiki inimesi, kes magistritöö kirjutamisel toeks olid ning parimal võimalikul moel abiks olid. Eelkõige tänan oma juhendajaid Triin Laiska, Kairi Koorti ja Reet Mändarit, kes alati nõuandeid jagasid ning konstruktiivset ja põhjalikku tagasisidet andsid. Samuti soovin tänada Elin Orgi, kes lõputöö alguses abiks oli ning suunas mind peajuhendaja juurde.

Lisaks suured tänuõnad Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramule ja E-tervise Sihtasutusele hea koostöö eest. Eraldi soovin tänada Krista-Roberta Saviauku ja Sirje Lindu vajalike andmete otsimise, sobivale kujule seadmise ja väljastamise eest, ning Reedik Mägi genotüübiandmete töötlemise eest. Minu suur tänu kuulub geenidoonoritele, tänu kellele oli uurimust võimalik läbi viia.

Kasutatud kirjandus

- Acobsson, B. J., P. P. Ernevi, L. C. Hidekel, ja J. J. (2002). „Bacterial vaginosis in early pregnancy may predispose for preterm birth and postpartum endometritis“. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*.
- Agarwala, Vineeta, Jason Flannick, Shamil Sunyaev, ja David Altshuler. (2013). „Evaluating empirical bounds on complex disease genetic architecture“. *Nature Genetics* 45(12): 1418–27. <http://www.nature.com/articles/ng.2804>.
- Al- Harthi, Lena et al. (1998). „A Human Immunodeficiency Virus (HIV)–Inducing Factor from the Female Genital Tract Activates HIV- 1 Gene Expression through the κ B Enhancer“. *The Journal of Infectious Diseases*.
- Alakomi, H. L. et al. (2000). „Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane“. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Allsworth, Jenifer E., ja Jeffrey F. Peipert. (2011). „Severity of bacterial vaginosis and the risk of sexually transmitted infection“. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.
- Amsel, Richard et al. (1983). „Nonspecific vaginitis“. *The American Journal of Medicine* 74(1): 14–22. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002934383911129>.
- Anderson, Matthew R. (2004). „Evaluation of Vaginal Complaints“. *JAMA* 291(11): 1368. <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.291.11.1368>.
- Baeten, J M et al. (2009). „Prospective study of correlates of vaginal Lactobacillus colonisation among high-risk HIV-1 seronegative women“. *Sexually Transmitted Infections* 85(5): 348–53. <http://sti.bmj.com/cgi/doi/10.1136/sti.2008.035451>.
- Bibbo M, ja Harris Mj. (1972). *Leptothrix*. 16. tr Acta Cytol.
- Borgdorff, H. et al. (2016). „Cervicovaginal microbiome dysbiosis is associated with proteome changes related to alterations of the cervicovaginal mucosal barrier“. *Mucosal Immunology*.
- Botchkarev, Vladimir A. et al. (2012). „Epigenetic Regulation of Gene Expression in Keratinocytes“. *Journal of Investigative Dermatology* 132(11): 2505–21. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1535524X>.
- Brookes, Anthony J. (1999). „The essence of SNPs“. *Gene* 234(2): 177–86. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037811199900219X>.
- Brotman, Rebecca M. (2011). „Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: An epidemiologic perspective“. *Journal of Clinical Investigation*.
- Brotman, Rebecca M., Ravel, J., Bavoiil P.M., Gravitt, P.E., Ghanem, K.G. (2014). „Microbiome, sex hormones, and immune responses in the reproductive tract: Challenges for vaccine development against sexually transmitted infections“. *Vaccine*.

- Browning, Brian L., ja Sharon R. Browning. (2009). „A Unified Approach to Genotype Imputation and Haplotype-Phase Inference for Large Data Sets of Trios and Unrelated Individuals“. *The American Journal of Human Genetics* 84(2): 210–23. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929709000123>.
- Budden, Kurtis F. et al. (2017). „Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis“. *Nature Reviews Microbiology*.
- Bult, Carol J et al. (2019). „Mouse Genome Database (MGD) 2019“. *Nucleic Acids Research* 47(D1): D801–6. <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D801/5165331>.
- Burton, J. P. et al. (2004). „Detection of *Atopobium vaginae* in Postmenopausal Women by Cultivation-Independent Methods Warrants Further Investigation“. *Journal of Clinical Microbiology* 42(4): 1829–31. <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.42.4.1829-1831.2004>.
- Bush, William S., ja Jason H. Moore. (2012). „Chapter 11: Genome-Wide Association Studies“. *PLoS Computational Biology* 8(12): e1002822. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1002822>.
- Cauci, Sabina et al. (2007). „Association of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms with bacterial vaginosis in non-pregnant Italian women“. *MHR: Basic science of reproductive medicine* 13(4): 243–50. [http://academic.oup.com/molehr/article/13/4/243/1011453/Association-of-interleukin1 \$\beta\$ -and-interleukin1](http://academic.oup.com/molehr/article/13/4/243/1011453/Association-of-interleukin1beta-and-interleukin1).
- Cerikcioglu, Nilgun, ja M. Sinan Beksac. (2004). „Cytolytic Vaginosis: Misdiagnosed as Candidal Vaginitis“. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 12(1): 13–16. <http://www.hindawi.com/journals/idog/2004/839762/abs/>.
- Chen, Chen et al. (2017). „The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases“. *Nature Communications* 8(1): 875. <http://www.nature.com/articles/s41467-017-00901-0>.
- Cherpes, T. L. et al. (2003). „Association between Acquisition of Herpes Simplex Virus Type 2 in Women and Bacterial Vaginosis“. *Clinical Infectious Diseases* 37(3): 319–25. <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/375819>.
- Cherpes, Thomas L. et al. (2008). „A Delicate Balance: Risk Factors for Acquisition of Bacterial Vaginosis Include Sexual Activity, Absence of Hydrogen Peroxide-Producing Lactobacilli, Black Race, and Positive Herpes Simplex Virus Type 2 Serology“. *Sexually Transmitted Diseases* 35(1): 78–83. <http://journals.lww.com/00007435-200801000-00018>.
- Chiu, A et al. (1999). „Recurrent vaginitis as a manifestation of inhaled latex allergy“. *Allergy*

- 54(2): 184–85. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1034/j.1398-9995.1999.00911.x>.
- Cibley, Leonard J., ja Laurence J. Cibley. (1991). „Cytolytic vaginosis“. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 165(4): 1245–49. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000293781290736X>.
- Cooper, R. et al. (2002). „The structure of haplotype blocks in the human genome“. *Science*.
- Coordinators, NCBI Resource. (2016). „Database Resources of the National Center for Biotechnology Information“. *Nucleic acids research* 44(D1): D7–19. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26615191>.
- Cribby, Sarah, Michelle Taylor, ja Gregor Reid. (2008). „Vaginal Microbiota and the Use of Probiotics“. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2008: 1–9. <http://www.hindawi.com/journals/ipid/2008/256490/>.
- Delaneau, Olivier et al. (2013). „Haplotype Estimation Using Sequencing Reads“. *The American Journal of Human Genetics* 93(4): 687–96. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929713004151>.
- Dembélé, Tiécoura, Vlastimil Obdržálek, ja Miroslav Votava. (1998). „Inhibition of bacterial pathogens by lactobacilli“. *Zentralblatt für Bakteriologie* 288(3): 395–401. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0934884098800133>.
- Dey, Rounak, Ellen M. Schmidt, Goncalo R. Abecasis, ja Seunggeun Lee. (2017). „A Fast and Accurate Algorithm to Test for Binary Phenotypes and Its Application to PheWAS“. *The American Journal of Human Genetics* 101(1): 37–49. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000292971730201X>.
- Donders, Gilbert G.G. et al. (2000). „Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora“. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.
- Dover, S. E., A. A. Aroutcheva, S. Faro, ja M. L. Chikindas. (2008). „Natural antimicrobials and their role in vaginal health: A short review“. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*.
- Duerr, A. (2003). „Incident and persistent vulvovaginal candidiasis among human immunodeficiency virus–infected women: Risk factors and severity“. *Obstetrics & Gynecology* 101(3): 548–56. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0029784402027291>.
- Duncan, Laramie et al. (2017). „Significant locus and metabolic genetic correlations revealed in genome-wide association study of anorexia nervosa“. *American Journal of Psychiatry*.
- Eckert, L. (1998). „Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm“. *Obstetrics & Gynecology* 92(5): 757–65.

- <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0029784498002646>.
- Eschenbach, D. A. et al. (2000.) „Influence of the Normal Menstrual Cycle on Vaginal Tissue, Discharge, and Microflora“. *Clinical Infectious Diseases*.
- Farage, Miranda A., Kenneth W. Miller, ja Jack D. Sobel. (2010). „Dynamics of the Vaginal Ecosystem—Hormonal Influences“. *Infectious Diseases: Research and Treatment 3: IDRT.S3903*. <http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/IDRT.S3903>.
- Fernández, Maria V. et al. (2018). „Evaluation of Gene-Based Family-Based Methods to Detect Novel Genes Associated With Familial Late Onset Alzheimer Disease“. *Frontiers in Neuroscience* 12. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00209/full>.
- Ferri, Fred F. (2016). *Ferri's Clinical Advisor 2017 E-Book: 5 Books in 1*. Elsevier Health Sciences.
- Fethers, Katherine A. et al. (2008). „Sexual Risk Factors and Bacterial Vaginosis: A Systematic Review and Meta- Analysis“. *Clinical Infectious Diseases* 47(11): 1426–35. <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/592974>.
- Fichorova, Raina N. et al. (2002). „Response to Neisseria gonorrhoeae by Cervicovaginal Epithelial Cells Occurs in the Absence of Toll-Like Receptor 4-Mediated Signaling“. *The Journal of Immunology*.
- Finlay, B. B. (1997). „Exploitation of Mammalian Host Cell Functions by Bacterial Pathogens“. *Science* 276(5313): 718–25. <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.276.5313.718>.
- Foxman, B. (1990). „The epidemiology of vulvovaginal candidiasis: risk factors.“ *American Journal of Public Health* 80(3): 329–31. <http://ajph.aphapublications.org/doi/10.2105/AJPH.80.3.329>.
- Fry A, Meagher S, ja Vollenhoven B. (1999). „A case of anaphylactic reaction caused by exposure to a latex probe cover in transvaginal ultrasound scanning.“ *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 13(5): 373–79. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-0705.1999.13050373.x>.
- Galask, Rudolph P. (1988). „Vaginal colonization by bacteria and yeast“. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 158(4): 993–95. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002937888901111>.
- Gardner, Herman L., ja Charles D. Dukes. (1955). „Haemophilus vaginalis vaginitis. A newly defined specific infection previously classified ‘nonspecific’ vaginitis“. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.
- Geiger, A M, B Foxman, ja B W Gillespie. (1995). „The epidemiology of vulvovaginal candidiasis among university students.“ *American Journal of Public Health* 85(8_Pt_1):

- 1146–48. http://ajph.aphapublications.org/doi/10.2105/AJPH.85.8_Pt_1.1146.
- Geiger, A M, B Foxman, ja J D Sobel. (1995). „Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *C. glabrata* and no candida.“ *Sexually Transmitted Infections* 71(5): 304–7. <http://sti.bmj.com/cgi/doi/10.1136/sti.71.5.304>.
- Genc, Mehmet R. et al. (2004). „Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women“. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 116(2): 152–56. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211504000740>.
- Genç, Mehmet R. et al. (2007). „TNFA-308G>A polymorphism influences the TNF- α response to altered vaginal flora“. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 134(2): 188–91. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211506005604>.
- Giraldo, Paulo C. et al. (2007). „Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphism, Vulvovaginal Candidiasis, and Bacterial Vaginosis“. *Obstetrics & Gynecology* 109(5): 1123–28. <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006250-200705000-00019>.
- Goepfert, Alice R. et al. (2005). „Differences in inflammatory cytokine and Toll-like receptor genes and bacterial vaginosis in pregnancy“. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 193(4): 1478–85. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937805004886>.
- Gray, RH, MJ Wawer, N Sewankambo, ja D Serwadda. (1997). „HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis“. *The Lancet* 350(9093): 1780. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673605636124>.
- Griffith, O. L. et al. (2007). „ORegAnno: an open-access community-driven resource for regulatory annotation“. *Nucleic Acids Research* 36(Database): D107–13. <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkm967>.
- Gupta, K. et al. (1998). „Inverse Association of H₂O₂-Producing Lactobacilli and Vaginal *Escherichia coli* Colonization in Women with Recurrent Urinary Tract Infections“. *Journal of Infectious Diseases*.
- Hacker, J. (2003). „Prokaryotic Chromosomes and Disease“. *Science* 301(5634): 790–93. <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1086802>.
- Haddad ZH. (1978). *Clearer picture of food and allergy is still needed. Perspect Allergy*. . 1. tr.
- Halperin, Eran, ja Dietrich A Stephan. (2009). „SNP imputation in association studies“. *Nature*

- Biotechnology* 27(4): 349–51. <http://www.nature.com/articles/nbt0409-349>.
- Hammer, Øyvind, David A.T. Harper, ja Paul D. Ryan. (2001). „Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis“. *Palaeontologia Electronica*.
- Hand, Timothy W., Ivan Vujkovic-Cvijin, Vanessa K. Ridaura, ja Yasmine Belkaid. (2016). „Linking the Microbiota, Chronic Disease, and the Immune System“. *Trends in Endocrinology and Metabolism*.
- Hay, P E et al. (1994). „Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage“. *BMJ* 308(6924): 295–98. <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.308.6924.295>.
- HEINE, PHILLIP, ja JAMES A. MCGREGOR. (1993). „Trichomonas Vaginalis: A Reemerging Pathogen“. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 36(1): 137–44. <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003081-199303000-00019>.
- Hickey, Roxana J. et al. (2012). „Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective“. *Translational Research* 160(4): 267–82. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524412000709>.
- Hill, Gale B. (1993). „The microbiology of bacterial vaginosis“. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 169(2): 450–54. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000293789390339K>.
- Hill, W. G., ja Alan Robertson. (1968). „Linkage disequilibrium in finite populations“. *Theoretical and Applied Genetics*.
- Hillier, Sharon L. et al. (1995). „Association between Bacterial Vaginosis and Preterm Delivery of a Low-Birth-Weight Infant“. *New England Journal of Medicine* 333(26): 1737–42. <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199512283332604>.
- Hillier, Sharon L. (2005). „The Complexity of Microbial Diversity in Bacterial Vaginosis“. *New England Journal of Medicine* 353(18): 1886–87. <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMp058191>.
- Hindorff, L. A. et al. (2009). „Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(23): 9362–67. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0903103106>.
- Honda, Kenya, ja Dan R. Littman. (2016). „The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease“. *Nature*.
- Horowitz, Benson J., Diane Giaquinta, ja Susan Ito. (1992). „Evolving Pathogens in Vulvovaginal Candidiasis: Implications for Patient Care“. *The Journal of Clinical Pharmacology* 32(3): 248–55. <http://doi.wiley.com/10.1002/j.1552-4604.1992.tb03833.x>.
- Hunt, Sarah E et al. (2018). „Ensembl variation resources“. *Database* 2018.

- <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/bay119/5255129>.
- Hyde, Craig L et al. (2016). „Identification of 15 genetic loci associated with risk of major depression in individuals of European descent“. *Nature Genetics* 48(9): 1031–36. <http://www.nature.com/articles/ng.3623>.
- Hyman, Richard W. et al. (2012). „The dynamics of the vaginal microbiome during infertility therapy with in vitro fertilization-embryo transfer“. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*.
- IMHOF, J. P. (1961). „Computing the distribution of quadratic forms in normal variables“. *Biometrika* 48(3–4): 419–26. <https://academic.oup.com/biomet/article-lookup/doi/10.1093/biomet/48.3-4.419>.
- Jaeger, M. et al. (2016). „Association of a variable number tandem repeat in the NLRP3 gene in women with susceptibility to RVVC“. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 35(5): 797–801. <http://link.springer.com/10.1007/s10096-016-2600-5>.
- Jaenisch, Rudolf, ja Adrian Bird. (2003). „Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals“. *Nature Genetics* 33(S3): 245–54. <http://www.nature.com/articles/ng1089z>.
- Jamieson, Denise J. et al. (2001). „Longitudinal analysis of bacterial vaginosis: Findings from the HIV epidemiology research study“. *Obstetrics and Gynecology*.
- Jansen, Philip R. et al. (2019). „Genome-wide analysis of insomnia in 1,331,010 individuals identifies new risk loci and functional pathways“. *Nature Genetics* 51(3): 394–403. <http://www.nature.com/articles/s41588-018-0333-3>.
- Jaspers, Vicky et al. (2012). „Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests“. *BMC Microbiology*.
- Jaspers, Vicky et al. (2015). „The significance of *Lactobacillus crispatus* and *L. vaginalis* for vaginal health and the negative effect of recent sex: a cross-sectional descriptive study across groups of African women“. *BMC Infectious Diseases* 15(1): 115. <https://bmcinfctdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-0825-z>.
- St. John, Elizabeth, Debra Mares, ja Gregory T. Spear. (2007). „Bacterial vaginosis and host immunity“. *Current HIV/AIDS Reports*.
- Kaper, James B., James P. Nataro, ja Harry L. T. Mobley. (2004). „Pathogenic *Escherichia coli*“. *Nature Reviews Microbiology* 2(2): 123–40. <http://www.nature.com/articles/nrmicro818>.
- Karczewski, Konrad J et al. (2020). „The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans“. *bioRxiv*: 531210. <http://biorxiv.org/content/early/2020/04/08/531210.abstract>.

- Kashiwagi, Mariko, Motoi Ohba, Kazuhiro Chida, ja Toshio Kuroki. (2002). „Protein kinase c η (PKC η): Its involvement in keratinocyte differentiation“. *Journal of Biochemistry*.
- Kent, W. J. et al. (2002). „The Human Genome Browser at UCSC“. *Genome Research* 12(6): 996–1006. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.229102>.
- Kho, Zhi Y., ja Sunil K. Lal. (2018). „The human gut microbiome - A potential controller of wellness and disease“. *Frontiers in Microbiology*.
- Klebanoff, Seymour J., D. Heather Watts, Christopher Mehlin, ja Catherine M. Headley. (1999). „Lactobacilli and Vaginal Host Defense: Activation of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Long Terminal Repeat, Cytokine Production, and NF- κ B“. *The Journal of Infectious Diseases*.
- Kruglyak, L. (1999). „Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes“. *Nature Genetics* 22(2): 139–44. http://www.nature.com/articles/ng0699_139.
- Kuonen, D. (1999). „Saddlepoint approximations for distributions of quadratic forms in normal variables“. *Biometrika*.
- Lacey, James V et al. (2009). „Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort“. *BMC Cancer* 9(1): 84. <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-9-84>.
- Lai, S. K. et al. (2009). „Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Trapped by Acidic but Not by Neutralized Human Cervicovaginal Mucus“. *Journal of Virology*.
- Lai, Yuping, ja Richard L. Gallo. (2009). „AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense“. *Trends in Immunology* 30(3): 131–41. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490609000052>.
- Lakshmi, K., J. R. Aishwarya, S. Chitralkha, ja G. A. Menezes. (2013). „Review on infectious vaginitis“. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*.
- Larsson, Per Göran et al. (2000). „Treatment with 2% clindamycin vaginal cream prior to first trimester surgical abortion to reduce signs of postoperative infection: A prospective, double-blinded, placebo-controlled, multicenter study“. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*.
- Ledger, William J., ja Gilles R. G. Monif. (2004). „A Growing Concern: Inability to Diagnose Vulvovaginal Infections Correctly“. *Obstetrics & Gynecology* 103(4): 782–84. <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006250-200404000-00029>.
- Lee, Jaehyoun et al. (2017). „Distinct Histone Modifications Modulate DEFB1 Expression in

- Human Vaginal Keratinocytes in Response to *Lactobacillus* spp.“ *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 9(4): 406–14. <http://link.springer.com/10.1007/s12602-017-9286-6>.
- de Leeuw, Christiaan A., Joris M. Mooij, Tom Heskes, ja Danielle Posthuma. (2015). „MAGMA: Generalized Gene-Set Analysis of GWAS Data“. *PLOS Computational Biology* 11(4): e1004219. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1004219>.
- Leitsalu, Liis et al. (2015). „Cohort profile: Estonian biobank of the Estonian genome center, university of Tartu“. *International Journal of Epidemiology*.
- Levy, D. A., S. Khouader, ja F. Leynadier. (1998). „Allergy to latex condoms“. *Allergy* 53(11): 1107–8. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1398-9995.1998.tb03827.x>.
- Li, Shuai et al. (2018). „Estrogen Action in the Epithelial Cells of the Mouse Vagina Regulates Neutrophil Infiltration and Vaginal Tissue Integrity“. *Scientific Reports*.
- Li, Zhiqiang et al. (2017). „Genome-wide association analysis identifies 30 new susceptibility loci for schizophrenia“. *Nature Genetics* 49(11): 1576–83. <http://www.nature.com/articles/ng.3973>.
- Liberzon, A. et al. (2011). „Molecular signatures database (MSigDB) 3.0“. *Bioinformatics* 27(12): 1739–40. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btr260>.
- Lipsky, M. S., T. Waters, ja L. K. Sharp. (2000). „Impact of Vaginal Antifungal Products on Utilization of Health Care Services: Evidence from Physician Visits“. *The Journal of the American Board of Family Medicine* 13(3): 178–82. <http://www.jabfm.org/cgi/doi/10.3122/15572625-13-3-178>.
- Llahí-Camp, J. M. et al. (1996). „Association of bacterial vaginosis with a history of second trimester miscarriage“. *Human Reproduction*.
- Loh, Po-Ru, Pier Francesco Palamara, ja Alkes L Price. (2016). „Fast and accurate long-range phasing in a UK Biobank cohort“. *Nature Genetics* 48(7): 811–16. <http://www.nature.com/articles/ng.3571>.
- MacArthur, Jacqueline et al. (2017). „The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog)“. *Nucleic Acids Research*.
- Mackelprang, R D et al. (2015). „Toll-like receptor gene variants and bacterial vaginosis among HIV-1 infected and uninfected African women“. *Genes & Immunity* 16(5): 362–65. <http://www.nature.com/articles/gene201513>.
- Marchesi, Julian R., ja Jacques Ravel. (2015). „The vocabulary of microbiome research: a proposal“. *Microbiome* 3(1): 31. <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-015-0094-5>.

- Marchini, Jonathan, ja Bryan Howie. (2010). „Genotype imputation for genome-wide association studies“. *Nature Reviews Genetics* 11(7): 499–511. <http://www.nature.com/articles/nrg2796>.
- Marrazzo, Jeanne M. et al. (2012). „Extravaginal Reservoirs of Vaginal Bacteria as Risk Factors for Incident Bacterial Vaginosis“. *The Journal of Infectious Diseases* 205(10): 1580–88. <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jis242>.
- Martin, Harold L. et al. (1999). „Vaginal Lactobacilli, Microbial Flora, and Risk of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Sexually Transmitted Disease Acquisition“. *The Journal of Infectious Diseases* 180(6): 1863–68. <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315127>.
- Martinez, Rafael C R et al. (2008). „Analysis of vaginal lactobacilli from healthy and infected Brazilian women“. *Applied and Environmental Microbiology*.
- McVean, Gil A et al. (2012). „An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes“. *Nature* 491(7422): 56–65. <https://doi.org/10.1038/nature11632>.
- Mendes-Soares, Helena, Haruo Suzuki, Roxana J. Hickey, ja Larry J. Forneya. (2014). „Comparative functional genomics of *Lactobacillus* spp. reveals possible mechanisms for specialization of vaginal lactobacilli to their environment“. *Journal of Bacteriology*.
- Mills, Benjie Brown. (2017). „Vaginitis“. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 44(2): 159–77. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889854517300438>.
- Miró, María Soledad et al. (2017). „Contribution of TLR2 pathway in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis“. *Pathogens and Disease* 75(7). <https://academic.oup.com/femspd/article/doi/10.1093/femspd/ftx096/4098498>.
- Mitchell, Caroline et al. (2012). „Behavioral Predictors of Colonization with *Lactobacillus crispatus* or *Lactobacillus jensenii* after Treatment for Bacterial Vaginosis: A Cohort Study“. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2012: 1–6. <http://www.hindawi.com/journals/ido/2012/706540/>.
- Mitt, Mario et al. (2017). „Improved imputation accuracy of rare and low-frequency variants using population-specific high-coverage WGS-based imputation reference panel“. *European Journal of Human Genetics* 25(7): 869–76. <http://www.nature.com/articles/ejhg201751>.
- Moraes, Paula S.A., ja Ernesto A Taketomi. (2000). „Allergic vulvovaginitis“. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 85(4): 253–67. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1081120610625276>.
- Mulley AG. (2000). *Primary Care Medicine: Office Evaluation and Management of the Adult Patient*. Goroll AH, Mulley AG. toim . Philadelphia: Pa: Lippincott, Williams & Wilkins.

- Nagy, E., G. Froman, ja P. A. Mardh. (1992). „Fibronectin binding of Lactobacillus species isolated from women with and without bacterial vaginosis“. *Journal of Medical Microbiology*.
- Nasielli, K. et al. (1972). „The occurrence of *Bacillus vaginalis* Döderlein and cytolysis in dysplasia, carcinoma in situ, and invasive carcinoma of the uterine cervix.“ *Acta Cytologica*.
- Nasioudis, Dimitrios et al. (2015). „ α -Amylase in Vaginal Fluid: Association with Conditions Favorable to Dominance of Lactobacillus“. *Reproductive Sciences*.
- Neal, Chemen M., Lauren H. Kus, Linda O. Eckert, ja Jeffrey F. Peipert. (2019). „Non-Candidal Vaginitis: A Comprehensive Approach to Diagnosis & Management“. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937819311068>.
- Nedovic, Bojan et al. (2014). „Mannose-Binding Lectin Codon 54 Gene Polymorphism and Vulvovaginal Candidiasis: A Systematic Review and Meta-Analysis“. *BioMed Research International* 2014: 1–7. <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/738298/>.
- Ness, Roberta B. et al. (2005). „A Cluster Analysis of Bacterial Vaginosis-associated Microflora and Pelvic Inflammatory Disease“. *American Journal of Epidemiology* 162(6): 585–90. <http://academic.oup.com/aje/article/162/6/585/100561/A-Cluster-Analysis-of-Bacterial>.
- Nordborg, Magnus, ja Simon Tavaré. (2002). „Linkage disequilibrium: what history has to tell us“. *Trends in Genetics* 18(2): 83–90.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016895250202557X>.
- Nougayrède, Jean Philippe et al. (2006). „*Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells“. *Science*.
- Nugent, R. P., M. A. Krohn, ja S. L. Hillier. (1991). „Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation“. *Journal of Clinical Microbiology*.
- O’Hanlon, Deirdre E., Thomas R. Moench, ja Richard A. Cone. (2011). „In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide“. *BMC Infectious Diseases*.
- O’Hanlon, Deirde E., Moench T.R., Cone, R.A. (2013). „Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota“. *PLoS ONE*.
- Oakley, B. B., T. L. Fiedler, J. M. Marrazzo, ja D. N. Fredricks. (2008). „Diversity of Human Vaginal Bacterial Communities and Associations with Clinically Defined Bacterial Vaginosis“. *Applied and Environmental Microbiology* 74(15): 4898–4909.

- <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02884-07>.
- De Oliveira, J. M. et al. (1993). „Prevalence of *Candida albicans* in vaginal fluid of asymptomatic Portuguese women“. *Journal of Reproductive Medicine for the Obstetrician and Gynecologist*,.
- Onderdonk, Andrew B., Mary L. Delaney, ja Raina N. Fichorova. (2016). „The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis“. *Clinical Microbiology Reviews* 29(2): 223–38. <https://cmr.asm.org/content/29/2/223>.
- Oscáriz, Juan C., ja Antonio G. Pisabarro. (2001). „Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria“. *International Microbiology* 4(1): 13–19. <http://link.springer.com/10.1007/s101230100003>.
- Paavonen, Jorma, ja Robert C. Brunham. (2018). „Bacterial Vaginosis and Desquamative Inflammatory Vaginitis“. *New England Journal of Medicine* 379(23): 2246–54. <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1808418>.
- Pearson, Thomas A. (2008). „How to Interpret a Genome-wide Association Study“. *JAMA* 299(11): 1335. <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.299.11.1335>.
- Petricević, Ljubomir et al. (2012). „Characterisation of the oral, vaginal and rectal *Lactobacillus* flora in healthy pregnant and postmenopausal women“. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 160(1): 93–99. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211511005902>.
- Pettersson, Fredrik H et al. (2009). „Marker selection for genetic case–control association studies“. *Nature Protocols* 4(5): 743–52. <http://www.nature.com/articles/nprot.2009.38>.
- Pruim, R. J. et al. (2010). „LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results“. *Bioinformatics* 26(18): 2336–37. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btq419>.
- Purcell, Shaun et al. (2007). „PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses“. *The American Journal of Human Genetics* 81(3): 559–75. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707613524>.
- Pybus, Vivien, ja Andrew B. Onderdonk. (1999). „Microbial interactions in the vaginal ecosystem, with emphasis on the pathogenesis of bacterial vaginosis“. *Microbes and Infection*.
- Rakoff-Nahoum, Seth, ja Ruslan Medzhitov. (2009). „Toll-like receptors and cancer“. *Nature Reviews Cancer* 9(1): 57–63. <http://www.nature.com/articles/nrc2541>.
- Ravel, J. et al. 2011. „Vaginal microbiome of reproductive-age women“. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences* 108(Supplement_1): 4680–87.
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1002611107>.
- Ravel, Jacques et al. (2011). „Vaginal microbiome of reproductive-age women“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Reichman, Orna, ja Jack Sobel. (2014). „Desquamative inflammatory vaginitis“. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 28(7): 1042–50.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693414001278>.
- Reid G, Jass J, Sebulsky T, ja McCormick J. (2003). „Potential uses of probiotics in clinical practice.“ *Clin Microbiol Rev* (16): 658–72.
- Reid, Gregor, ja Estelle Devillard. (2004). „Probiotics for mother and child.“ *Journal of clinical gastroenterology*.
- Rodríguez, Juan Antonio, Urko M Marigorta, ja Arcadi Navarro. (2014). „Integrating genomics into evolutionary medicine“. *Current Opinion in Genetics & Development* 29: 97–102.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959437X14000902>.
- Royse, Kathryn E. et al. (2012). „Toll-like receptor gene variants associated with bacterial vaginosis among HIV-1 infected adolescents“. *Journal of Reproductive Immunology* 96(1–2): 84–89. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165037812006171>.
- Rubinstein, Mara Roxana et al. (2013). „Fusobacterium nucleatum Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/ β -Catenin Signaling via its FadA Adhesin“. *Cell Host & Microbe* 14(2): 195–206.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312813002606>.
- Ryckman, K. K., H. N. Simhan, M. A. Krohn, ja S. M. Williams. (2009). „Predicting risk of bacterial vaginosis: The role of race, smoking and corticotropin-releasing hormone-related genes“. *Molecular Human Reproduction*.
- Schröder, Nicolas WJ, ja Ralf R Schumann. (2005). „Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease“. *The Lancet Infectious Diseases* 5(3): 156–64. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309905013083>.
- Selsted, Michael E, ja Andre J Ouellette. (2005). „Mammalian defensins in the antimicrobial immune response“. *Nature Immunology* 6(6): 551–57.
<http://www.nature.com/articles/ni1206>.
- Servin, Alain L. (2004). „Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens“. *FEMS Microbiology Reviews* 28(4): 405–40.
<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1016/j.femsre.2004.01.003>.
- Skarin, angelika, ja Jeanne Sylwan. (2009). „Vaginal lactobacilli inhibiting growth of Gardnerella vaginalis, Mobiluncus and other bacterial species cultured from vaginal

- content of women with bacterial vaginosis“. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology* 94B(1–6): 399–403. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1699-0463.1986.tb03074.x>.
- Sobel, Jack D. (1997). „Vaginitis“. *New England Journal of Medicine* 337(26): 1896–1903. <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199712253372607>.
- Sobel, J.D., Faro, S., Force, R. W., Foxman, B., Ledger, W.J., Nyijesy, P.R, Reed, B.D., Summers, P.R. (1998). „Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations“. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 178(2): 203–11. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000293789880001X>.
- Sobel, J.D. (1999). „Is there a protective role for vaginal flora?“ *Current Infectious Disease Reports*.
- Sobel, J.D. (2000). „Bacterial Vaginosis“. *Annual Review of Medicine* 51(1): 349–56. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.med.51.1.349>.
- Sobel, Jack D. (2007). „Vulvovaginal candidosis“. *The Lancet* 369(9577): 1961–71. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673607609179>.
- Spear, Gregory T. et al. (2014). „Human α -amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by *Lactobacillus*“. *Journal of Infectious Diseases*.
- Spear, Gregory T., Elizabeth St. John, ja M. Reza Reza. (2007). „Bacterial vaginosis and human immunodeficiency virus infection“. *AIDS Research and Therapy*.
- Spencer, Chris C. A., Zhan Su, Peter Donnelly, ja Jonathan Marchini. (2009). „Designing Genome-Wide Association Studies: Sample Size, Power, Imputation, and the Choice of Genotyping Chip“. *PLoS Genetics* 5(5): e1000477. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1000477>.
- Spiegel, C A. (1991). „Bacterial vaginosis.“ *Clinical Microbiology Reviews* 4(4): 485–502. <http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.4.4.485>.
- Subramanian, A. et al. (2005). „Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(43): 15545–50. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506580102>.
- Sud, Amit, Ben Kinnersley, ja Richard S. Houlston. (2017). „Genome-wide association studies of cancer: current insights and future perspectives“. *Nature Reviews Cancer* 17(11): 692–704. <http://www.nature.com/articles/nrc.2017.82>.
- Swidsinski, Alexander et al. (2008). „An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole“. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.

- Taha, Taha E. et al. (1998). „Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora“. *AIDS* 12(13): 1699–1706. <https://insights.ovid.com/crossref?an=00002030-199813000-00019>.
- Takahashi, Hazuki, Timo Lassmann, Mitsuyoshi Murata, ja Piero Carninci. (2012). „5' end-centered expression profiling using cap-analysis gene expression and next-generation sequencing“. *Nature Protocols* 7(3): 542–61. <http://www.nature.com/articles/nprot.2012.005>.
- Tasa, Tõnis et al. (2019). „Genetic variation in the Estonian population: pharmacogenomics study of adverse drug effects using electronic health records“. *European Journal of Human Genetics* 27(3): 442–54. <http://www.nature.com/articles/s41431-018-0300-6>.
- Taylor, Brandie D. et al. (2018). „Toll-like receptor variants and cervical *Atopobium vaginae* infection in women with pelvic inflammatory disease“. *American Journal of Reproductive Immunology* 79(2): e12804. <http://doi.wiley.com/10.1111/aji.12804>.
- Tempera, G. et al. (2006). „Topical Kanamycin: an Effective Therapeutic Option in Aerobic Vaginitis“. *Journal of Chemotherapy* 18(4): 409–14. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/joc.2006.18.4.409>.
- The Human Microbiome Project Consortium. (2012). „Structure, function and diversity of the healthy human microbiome The Human Microbiome Project Consortium*“. *Nature*.
- Tian, Chao et al. (2017). „Genome-wide association and HLA region fine-mapping studies identify susceptibility loci for multiple common infections“. *Nature Communications* 8(1): 599. <http://www.nature.com/articles/s41467-017-00257-5>.
- Uhlen, M. et al. (2015). „Tissue-based map of the human proteome“. *Science* 347(6220): 1260419–1260419. <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1260419>.
- Verstraelen, Hans, Rita Verhelst, Lieve Nuytinck, et al. (2009). „Gene polymorphisms of Toll-like and related recognition receptors in relation to the vaginal carriage of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae*“. *Journal of Reproductive Immunology*.
- Verstraelen, Hans, Rita Verhelst, Geert Claeys, et al. (2009). „Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora“. *BMC Microbiology* 9(1): 116. <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-9-116>.
- Verstraelen, Hans, Rita Verhelst, Mario Vaneechoutte, ja Marleen Temmerman. (2010). „The epidemiology of bacterial vaginosis in relation to sexual behaviour“. *BMC Infectious Diseases* 10(1): 81. <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-10-81>.
- Wallace, L., L. Roberts-Thompson, ja J. Reichelt. (2012). „Deletion of K1/K10 does not impair

- epidermal stratification but affects desmosomal structure and nuclear integrity“. *Journal of Cell Science* 125(7): 1750–58. <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.097139>.
- Wang, William Y.S., Bryan J. Barratt, David G. Clayton, ja John A. Todd. (2005). „Genome-wide association studies: Theoretical and practical concerns“. *Nature Reviews Genetics*.
- Watanabe, Kyoko, Erdogan Taskesen, Arjen Van Bochoven, ja Danielle Posthuma. (2017). „Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA“. *Nature Communications*.
- Watkins, Tonya N. et al. (2018). „Inhibition of EGFR Signaling Protects from Mucormycosis“. *mBio* 9(4). <https://mbio.asm.org/content/9/4/e01384-18>.
- Watts, D. Heather et al. (2005). „Effects of Bacterial Vaginosis and Other Genital Infections on the Natural History of Human Papillomavirus Infection in HIV- 1–Infected and High-Risk HIV- 1–Uninfected Women“. *The Journal of Infectious Diseases*.
- Wiesenfeld, Harold C. et al. (2003). „ Bacterial Vaginosis Is a Strong Predictor of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis Infection “. *Clinical Infectious Diseases*.
- van de Wijgert, Janneke H. H. M. (2017). „The vaginal microbiome and sexually transmitted infections are interlinked: Consequences for treatment and prevention“. *PLOS Medicine* 14(12): e1002478. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002478>.
- Van De Wijgert, Janneke H.H.M. et al. (2014). „The vaginal microbiota: What have we learned after a decade of molecular characterization?“ *PLoS ONE*.
- Willey, Joanne M, Linda Sherwood, ja Chris Woolverton. (2013). *Prescott’s Microbiology: 9th Revised Edition*. London: MCGRAW HILL HIGHER EDUCATION.
- Witkin, S, J Jeremias, ja W Ledger. (1988). „A localized vaginal allergic response in women with recurrent vaginitis“. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 81(2): 412–16. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0091674988909098>.
- Wolman, Igal. (2014). „Berek and Novak’s Gynecology 15th Edition: Lippincott Williams and Wilkins, 2012, 1560 pp, Hardcover, Rs. 2659 on www.flipkart.com, ISBN-139788184736106, ISBN-10818473610X“. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*.
- Yamamoto, Mayuko, ja Satoshi Matsumoto. (2016). „Gut microbiota and colorectal cancer“. *Genes and Environment* 38(1): 11. <http://genesenvironment.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41021-016-0038-8>.
- Yamamoto, Ted et al. (2009). „Bacterial Populations in the Vaginas of Healthy Adolescent Women“. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*.
- Zhao, Wei et al. (2017). „Identification of new susceptibility loci for type 2 diabetes and shared etiological pathways with coronary heart disease“. *Nature Genetics* 49(10): 1450–57.

<http://www.nature.com/articles/ng.3943>.

Zhou, Wei et al. (2018). „Efficiently controlling for case-control imbalance and sample relatedness in large-scale genetic association studies“. *Nature Genetics* 50(9): 1335–41. <http://www.nature.com/articles/s41588-018-0184-y>.

Zhou, Xia et al. (2004). „Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods“. *Microbiology*.

Zhou, Xia et al. (2007). „Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women“. *ISME Journal*.

Ziakas, Panayiotis D. et al. (2013). „The Role of TLR4 896 A>G and 1196 C>T in Susceptibility to Infections: A Review and Meta-Analysis of Genetic Association Studies“. *PLoS ONE* 8(11): e81047. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0081047>.

Kasutatud veebiaadressid

FinnGen PheWeb: <http://r2.finngen.fi/> (kasutatud 20.05.2020)

FUMA: <https://fuma.ctglab.nl/> (kasutatud 25.05.2020)

GnomAD: <https://gnomad.broadinstitute.org/> (kasutatud 06.04.2020)

Illumina: <http://www.illumina.com> (kasutatud 26.03.2020)

Mouse Genome Informatics: <http://www.informatics.jax.org/> (kasutatud 3.06.2020)

National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/> (kasutatud 02.05.2020)

NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (kasutatud 02.05.2020)

Oxford BIG browser: <http://big.stats.ox.ac.uk/> (kasutatud 06.04.2020)

PheWeb: <http://pheweb.sph.umich.edu/> (kasutatud 06.04.2020)

The Human Protein Atlas: <http://www.proteinatlas.org> (kasutatud 05.05.2020)

UK Biobank: <https://www.ukbiobank.ac.uk> (kasutatud 06.04.2020)

Wellcome Centre for Human Genetics: <https://www.well.ox.ac.uk/~wrayner/strand/> (kasutatud 06.04.2020)

LISAD

Lisa 1.

Tabel 5. E-tervise raviarvetest saadud andmed kolme erineva vaginiidi diagnoosi (B37.3, N76.0, N76.1) kohta. $p < 0,01$; Kruskal-Wallis test. Pidev tunnus on avaldatud keskmine \pm standard hälve [mediaan (kvartiil 25%-kvartiil 75%)].

	Diagnoos 1 B37.3 häbeme- ja tupekandidaas n=4926	Diagnoos 2 N76.0 äge tupepõletik n=1244	Diagnoos 3 N76.1 alaäge ja krooniline vaginiit e tupepõletik n=2402	p-väärtus n=6869
Hetke vanus	43,9 \pm 0,15 Min 25 a. Max 101 a.	46,9 \pm 0,34 Min 27 a. Max 93 a.	48,1 \pm 0,25 Min 27 a. Max 101 a.	p<0,01
Vanus diagnoosi esmakordsel määramisel	32,5 \pm 10,5 [30 (25-39)] Min 16 a. Max 93 a.	36,1 \pm 12,5 [34 (27-44)] Min 16 a. Max 84 a.	36,6 \pm 12,7 [35 (27-44)] Min 16 a. Max 89 a.	p<0,01
Isiku vanus episoodi ajal	34,5 \pm 9,9 [33 (27-40)] Min 16 a. Max 93 a.	37,9 \pm 12,4 [36 (28-45)] Min 16 a. Max 87 a.	38,4 \pm 12,5 [37 (29-46)] Min 16 a. Max 89 a.	p<0,01
Vanus diagnoosi viimasel määramisel	37,7 \pm 10,3 [36 (30-44)] Min 17 a. Max 93 a.	39,7 \pm 12,3 [38 (30-47)] Min 17 a. Max 87 a.	40,8 \pm 12,4 [40 (31-48)] Min 16 a. Max 89 a.	p<0,01

	4,1 ± 3,3 [3 (2-5)]	2,8 ± 1,5 [2 (2-3)]	3,3 ± 2,2 [3 (2-4)]	
Haigusepisoodide arv	Min 2 Max 48	Min 2 Max 18	Min 2 Max 25	p<0,01
Mitmel raviarvel on see diagnoos olnud põhidiagnoosiks	0,9 ± 0,8 [1 (0-1)] Min 0 korda Max 11 korda	0,8 ± 0,6 [1 (0-1)] Min 0 korda Max 5 korda	0,9 ± 0,7 [1 (0-1)] Min 0 korda Max 7 korda	p=1
Mitu korda on diagnoosi esinenud haigekassa arvetel	1,36 ± 0,77 [1 (1-2)] Min 1 kord Max 12 korda	1,2 ± 0,55 [1 (1-1)] Min 1 kord Max 8 korda	1,29 ± 0,62 [1 (1-1)] Min 1 kord Max 9 korda	p<0,01

Lisa 2.

Tabel 6. E-tervise raviarvetest ja Geenivaramu küsimustikest saadud andmed vaginiidi diagnoosiga naiste ja kontrolluuritavate kohta.

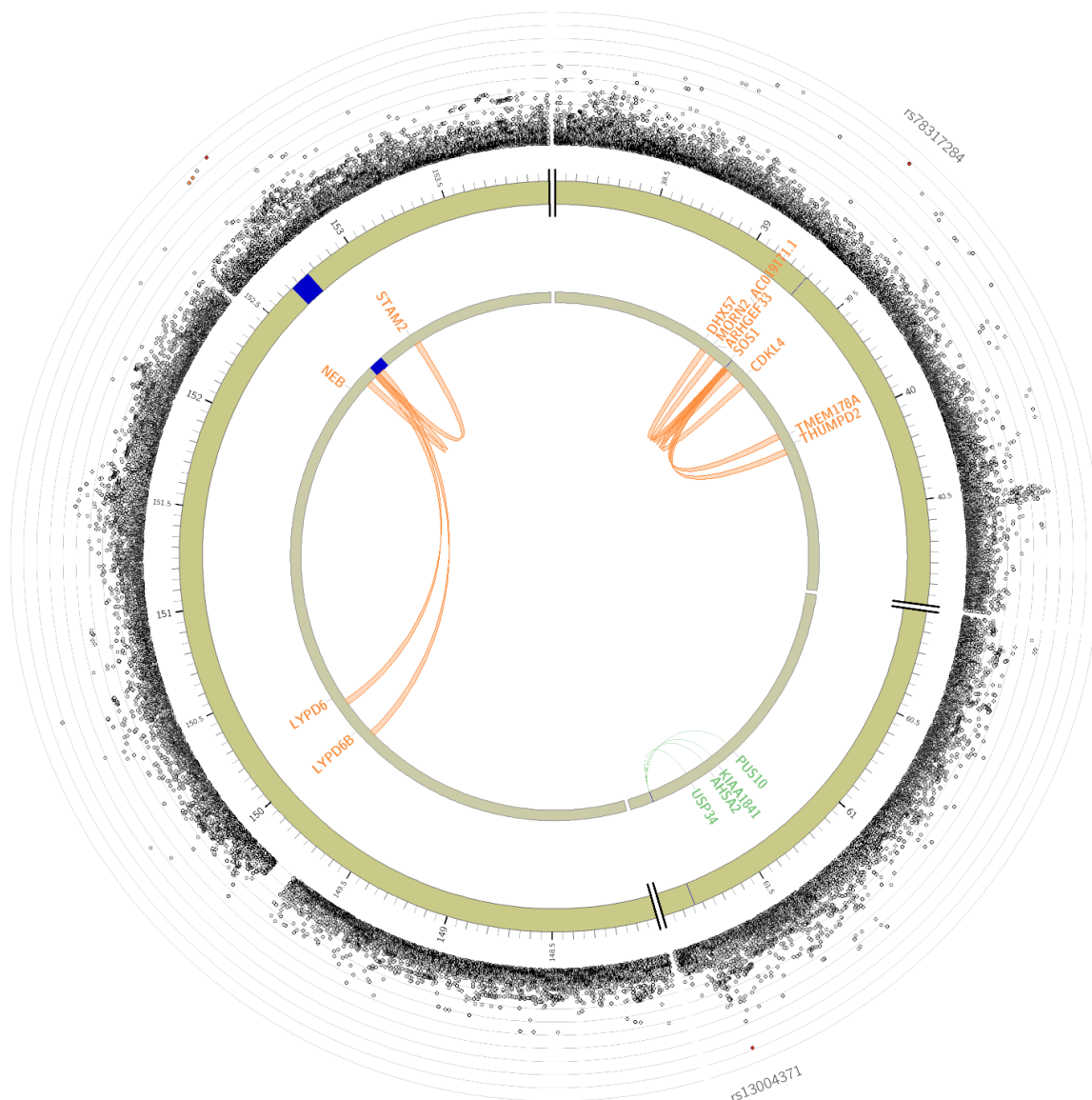
Pidev tunnus on avaldatud keskmine \pm standard hälve [mediaan (kvartiil 25%-kvartiil 75%)].

	Vaginiidi (B37.3, N76.0, N76.1) diagnoosiga patsient	Kontrollid	p-väärtus
Keskmine menstruaal-tsükli pikkus vanuses 25-35 eluaastat	a) Ei tea (n=113, 1,7%) b) Pole menstruaaltsükleid (n=5, 0,07%) c) Ebaregulaarsed (n=490, 7,2%) d) ≤ 20 päeva (n=44, 0,6%) e) 21-24 päeva (n=980, 14,4%) f) 25-29 päeva (n=4344, 63,6%) g) 30-35 päeva (n=809, 11,9%) h) >35 päeva (n=40, 0,6%) n=6825	a) Ei tea (n=211, 3,1%) b) Pole menstruaaltsükleid (n=14, 0,2%) c) Ebaregulaarsed (n=459, 6,8%) d) ≤ 20 päeva (n=49, 0,7%) e) 21-24 päeva (n=1035, 15,3%) f) 25-29 päeva (n=4187, 61,8%) g) 30-35 päeva (n=780, 11,5%) h) >35 päeva (n=42, 0,6%) n=6777	p>0,05
Menstruatsiooni peatumise põhjus	a) Menopaus (n=464, 48,7%) b) Rasedus (n=112, 11,8%) c) Rasestumisvastased vahendid (n=101, 10,6%) d) Günekoloogiline operatsioon (n=149, 15,6%) e) Ravimid (n=15, 1,6%) f) Madal kehakaal (n=1, 0,1%) g) Kaasuv haigus (n=5, 0,5%) h) Lapse rinnaga toitmine (n=106, 11%) n=953	a) Menopaus (n=527, 54,9%) b) Rasedus (n=99, 10,3%) c) Rasestumisvastased vahendid (n=87, 9,1%) d) Günekoloogiline operatsioon (n=125, 13,02%) e) Ravimid (n=15, 1,6%) f) Madal kehakaal (n=6, 0,6%) g) Kaasuv haigus (n=14, 1,5%) h) Lapse rinnaga toitmine (n=85, 8,9%) n=960	p>0,05
Alkoholi tarvitamise staatus	a) Mitte kunagi (n=842, 12,3%) b) Endine (n=346, 5,1%) c) Praegune (n=5614, 81,9%) d) Teadmata (n=48, 0,7%)	a) Mitte kunagi (n=780, 11,4%) b) Endine (n=375, 5,5%) c) Praegune (n=5626, 81,9%) d) Teadmata (n=87, 1,3%)	p>0,05

	n=6850	n=6868	
Kui sageli tarvitatakse alkohoolseid jooke	a) 4 ≥ korda nädalas (n=103, 2%) b) 2-3 korda nädalas (n=535, 10,4%) c) 2-4 korda kuus (n=2221, 43,1%) d) Kord kuus (n=1173, 22,8%) e) Mõned korrad aastas (n=970, 18,8%) f) Vähem kui kord aastas (n=134, 2,6%) g) 1 kord nädalas (n=15, 0,3%)	a) 4 ≥ korda nädalas (n=79, 1,5%) b) 2-3 korda nädalas (n=572, 11,0%) c) 2-4 korda kuus (n=2064, 39,6%) d) Kord kuus (n=1212, 23,3%) e) Mõned korrad aastas (n=1029, 19,8%) f) Vähem kui kord aastas (n=149, 2,9%) g) 1 kord nädalas (n=102, 2,0%)	p>0,05
	n=5151	n=5207	
Suitsetamise staatus	a) Mitte kunagi (n=4347, 63,4%) b) Endine (n=762, 11,1%) c) Praegune (n=1739, 25,3%) d) Teadmata (n=12, 0,17%)	a) Mitte kunagi (n=4324, 63,5%) b) Endine (n=701, 13,5%) c) Praegune (n=1827, 35,1%) d) Teadmata (n=9, 0,2%)	p>0,05
	n=6860	n=6861	
Toitumis- harjumused	a) Vegan (n=0, 0%) b) Lisaks taimetoidule ka piimasaadusi (n=9, 0,16%) c) Lisaks taimetoidule ja piimasaadustele ka mune (n=20, 0,35%) d) Lisaks taimetoidule ka kala (n=16, 0,3%) e) Kõigesööjad (n=5349, 93,4%) f) Kõige sööja v.a kala (n=151, 2,6%) g) Kõige sööja v.a nn punane liha (n=180, 0,3%) h) Kõigesööja v.a rõõsk piim ja rõõsk koor (n=0, 0%)	a) Vegan (n=6, 0,1%) b) Lisaks taimetoidule ka piimasaadusi (n=8, 0,14%) c) Lisaks taimetoidule ja piimasaadustele ka mune (n=27, 0,5%) d) Lisaks taimetoidule ka kala (n=32, 0,6%) e) Kõigesööjad (n=5281, 92,05%) f) Kõigesööja v.a kala (n=191, 3,3%) g) Kõigesööja v.a nn punane liha (n=166, 2,9%) h) Kõigesööja v.a rõõsk piim ja rõõsk koor (n=26, 0,45%)	p>0,05
	n=5725	n=5737	
On tegelenud tippspordiga	Ei (n=6401, 97,6%) Jah (n=155, 2,4%)	Ei (n=5899, 98,1%) Jah (n=115, 1,9%)	p>0,05
	n=6556	n=6014	

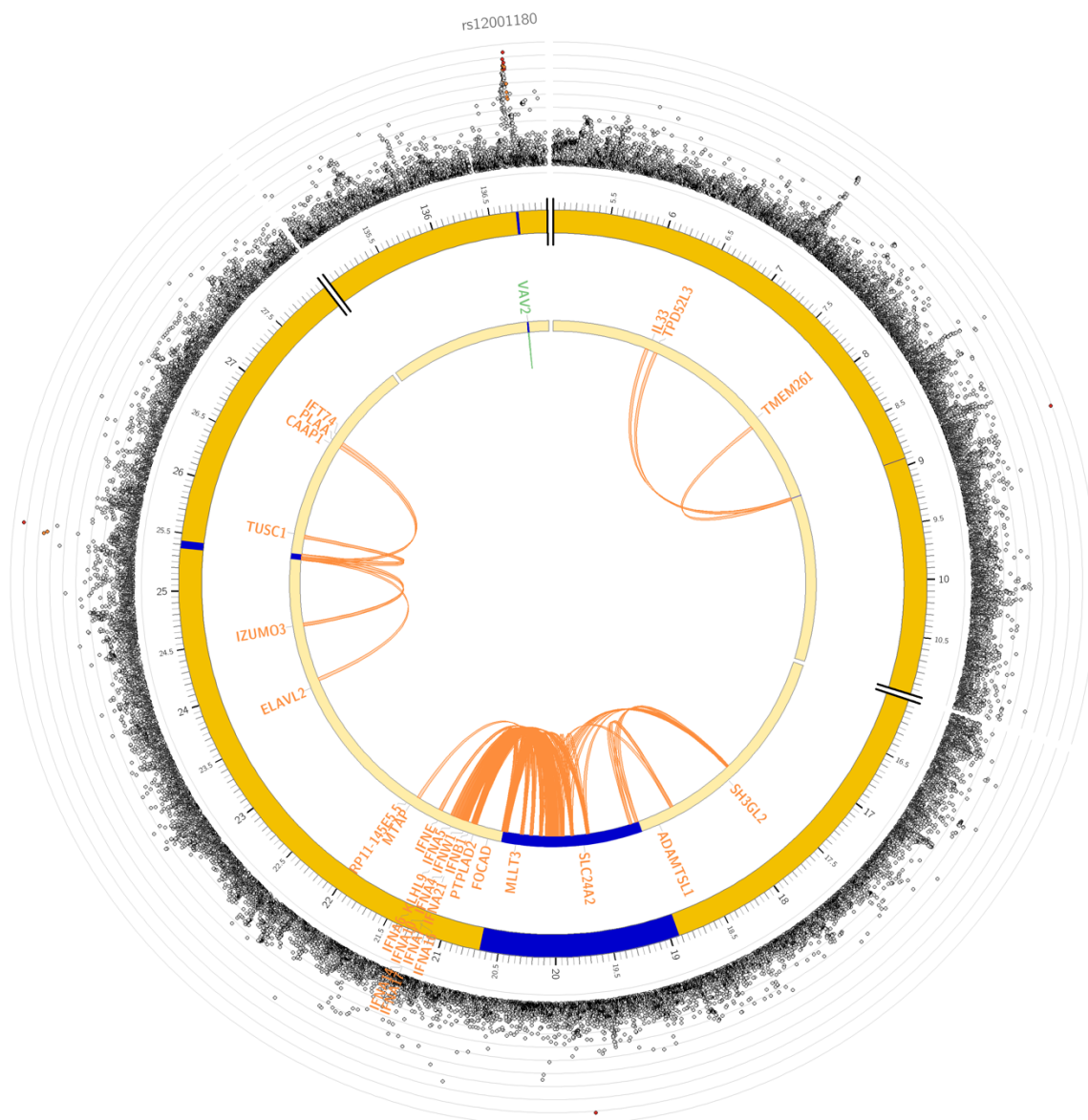
Emakaväliste raseduste arv	0,04 ± 0,2 [0 (0-0)] Min 0 Max 3 n=158/4306, 3,7%	0,04 ± 0,2 [0 (0-0)] Min 0 Max 5 n=130/3697, 3,5%	p>0,05
Kunstlike viljastamiste arv	2,3 ± 1,6 [2 (1-3)] Min 1 Max 7 n=60/6869, 0,87%	2,5 ± 2,0 [2 (1-3)] Min 1 Max 8 n=51/6869, 0,74%	p>0,05

Lisa 4.



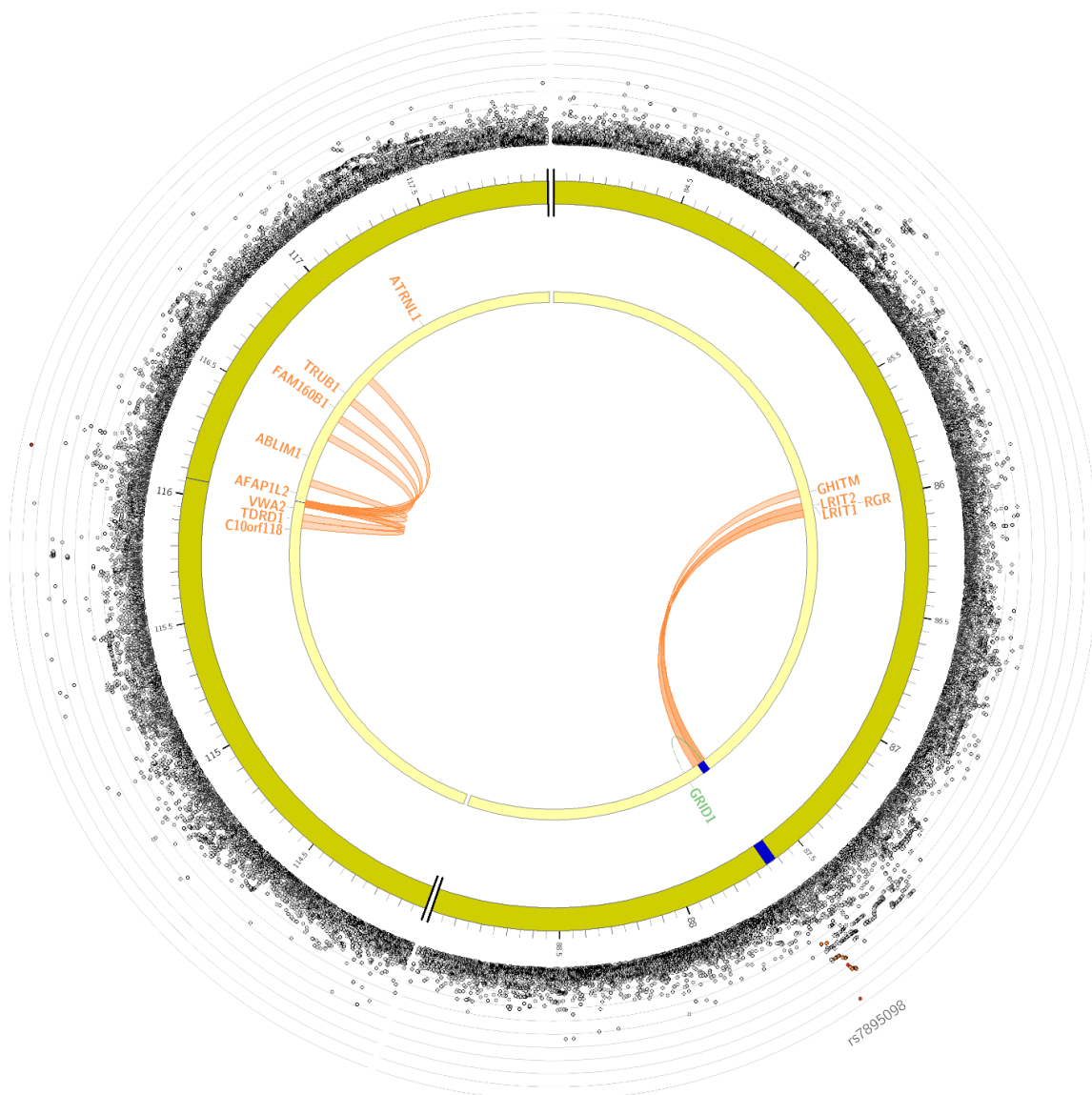
Joonis 8. Kromosoom 2 Circos’e joonis. Kõige välimine kiht on Manhattan’i joonis, kus on esindatud ainult need SNP-d, mille $p < 5 \times 10^{-2}$. Riskilookuses olevad SNP-d on värvitud vastavalt r^2 alusel juhtiva SNP suhtes lookuses: punasega ($r^2 > 0,8$), oranžiga ($r^2 > 0,6$) ja halliga SNP-d, mis ei ole LD-s ühegi sõltumatult olulise SNP-ga ($r^2 \leq 0,2$). Y-telg on SNP-de p-väärtuse negatiivne kümnendlogaritm. Riskilookus on tähistatud siniselt. Oranžiga on värvitud geenid, mis on kaardistatud kromatiininteraktsioonide alusel ($FDR < 1 \times 10^{-6}$). Rohelisega on tähistatud geenid, mis omavad eQTL tõendeid. Joonis on genereeritud Circos programmi abil (Krzywinski et al., 2009).

Lisa 5.



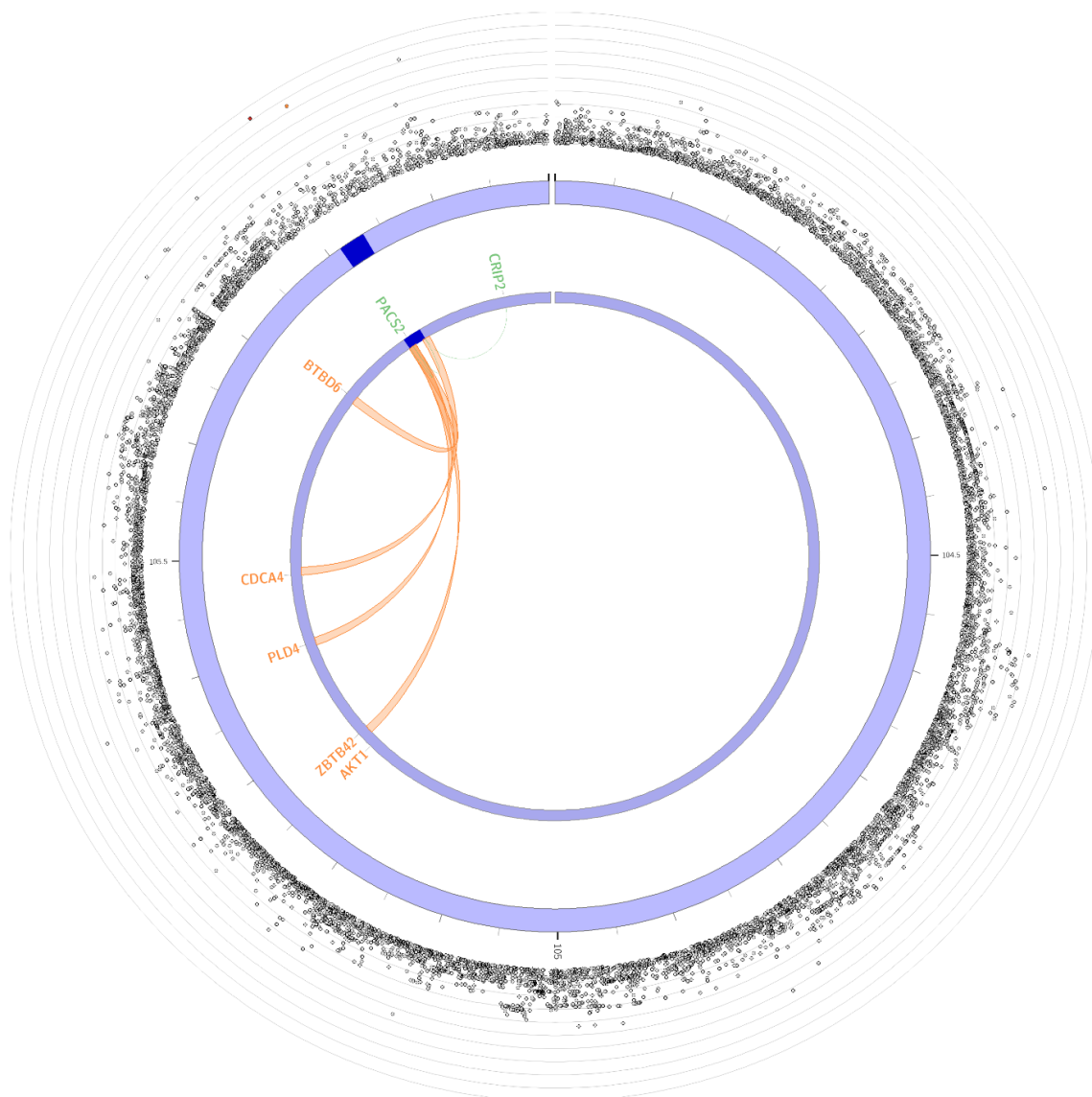
Joonis 9. Kromosoom 9 Circos'e joonis. Kõige välimine kiht on Manhattan'i joonis, kus on esindatud ainult need SNP-d, mille $p < 5 \times 10^{-2}$. Riskilookuses olevad SNP-d on värvitud vastavalt r^2 alusel juhtiva SNP suhtes lookuses: punasega ($r^2 > 0,8$), oranžiga ($r^2 > 0,6$) ja halliga SNP-d, mis ei ole LD-s ühegi sõltumatult olulise SNP-ga ($r^2 \leq 0,2$). Y-telg on SNP-de p-väärtuse negatiivne kümnendlogaritm. Riskilookus on tähistatud siniselt. Oranžiga on värvitud geenid, mis on kaardistatud kromatiininteraktsioonide alusel ($FDR < 1 \times 10^{-6}$). Rohelisega on tähistatud geen, mis omab eQTL tõendeid. Joonis on genereeritud Circos programmi abil (Krzywinski et al., 2009).

Lisa 6.



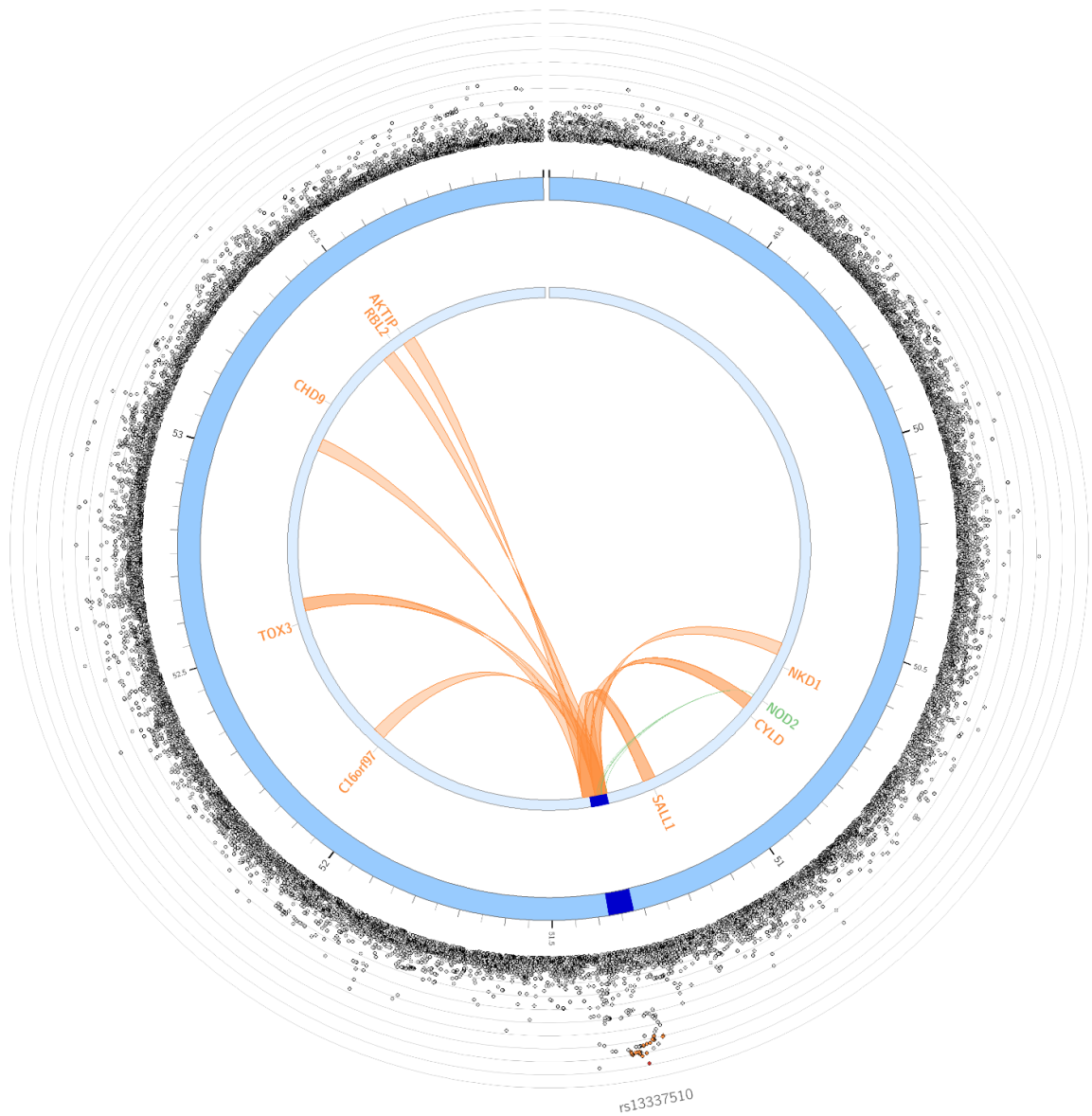
Joonis 10. Kromosoom 10 Circos' e joonis. Kõige välimine kiht on Manhattan'i joonis, kus on esindatud ainult need SNP-d, mille $p < 5 \times 10^{-2}$. Riskilookuses olevad SNP-d on värvitud vastavalt r^2 alusel juhtiva SNP suhtes lookuses: punasega ($r^2 > 0,8$), oranžiga ($r^2 > 0,6$) ja halliga SNP-d, mis ei ole LD-s ühegi sõltumatult olulise SNP-ga ($r^2 \leq 0,2$). Y-telg on SNP-de p-väärtuse negatiivne kümnendlogaritm. Riskilookus on tähistatud siniselt. Oranžiga on värvitud geenid, mis on kaardistatud kromatiininteraktsioonide alusel ($FDR < 1 \times 10^{-6}$). Rohelisega on tähistatud geen, mis omab eQTL tõendeid. Joonis on genereeritud Circos programmi abil (Krzywinski et al., 2009).

Lisa 7.



Joonis 11. Kromosoom 14 Circos'e joonis. Kõige välimine kiht on Manhattan'i joonis, kus on esindatud ainult need SNP-d, mille $p < 5 \times 10^{-2}$. Riskilookuses olevad SNP-d on värvitud vastavalt r^2 alusel juhtiva SNP suhtes lookuses: punasega ($r^2 > 0,8$), oranžiga ($r^2 > 0,6$) ja halliga SNP-d, mis ei ole LD-s ühegi sõltumatult olulise SNP-ga ($r^2 \leq 0,2$). Y-telg on SNP-de p-väärtuse negatiivne kümnendlogaritm. Riskilookus on tähistatud siniselt. Oranžiga on värvitud geenid, mis on kaardistatud kromatiininteraktsioonide alusel ($FDR < 1 \times 10^{-6}$). Rohelisega on tähistatud geenid, mis omavad eQTL tõendeid. Joonis on genereeritud Circos programmi abil (Krzywinski et al., 2009).

Lisa 8.



Joonis 12. Kromosoom 16 Circos'e joonis. Kõige välimine kiht on Manhattan'i joonis, kus on esindatud ainult need SNP-d, mille $p < 5 \times 10^{-2}$. Riskilookuses olevad SNP-d on värvitud vastavalt r^2 alusel juhtiva SNP suhtes lookuses: punasega ($r^2 > 0,8$), oranžiga ($r^2 > 0,6$) ja halliga SNP-d, mis ei ole LD-s ühegi sõltumatult olulise SNP-ga ($r^2 \leq 0,2$). Y-telg on SNP-de p-väärtuse negatiivne kümnendlogaritm. Riskilookus on tähistatud siniselt. Oranžiga on värvitud geenid, mis on kaardistatud kromatiininteraktsioonide alusel ($FDR < 1 \times 10^{-6}$). Rohelisega on tähistatud geen, mis omab eQTL tõendeid. Joonis on genereeritud Circos programmi abil (Krzywinski et al., 2009).

Lisa 10.

Tabel 7. Manuaalselt kureeritud teadusartiklitest leitud kandidaatgeenid ning -variandid korduva vaginiidi esinemisel.

Välja on toodud ainult nende variantide p-väärtused, mille rs-numbrid olid artiklites üheselt arusaadavalt välja toodud ja mida oli võimalik kontrollida. p-väärtused on ümardatud kümnetuhandikeni. NA- pole vastet.

Geen	Variant	Markeri p-väärtus üksikmarkeri analüüsis	Geeni p-väärtus MAGMA geenipõhises analüüsis	Viide
<i>TLR1</i>	743 A>G	0,6973	0,9473	Verstraelen et al., 2009
<i>TLR2</i>	rs11938228	0,4793	0,5328	Taylor et al., 2018
	rs1898830	0,4793	0,5328	Taylor et al., 2018
	Pro631His polümorfism		0,5328	Miró et al., 2017
<i>TLR4</i>	rs4986791	NA	0,4457	Ziakas et al., 2013
	399 C>T	NA	0,4457	Goepfert et al., 2005
	896 A>G	NA	0,4457	Genc et al., 2004
	rs4986790	0,1918	0,4457	Royse et al., 2012
<i>TLR9</i>	rs187084	0,5436	0,2197	Royse et al., 2012
<i>CD14</i>	rs2563298	0,5643	0,2083	Verstraelen et al., 2009
<i>MD2</i>	rs1809440	0,3925	0,5582	Verstraelen et al., 2009
<i>CARD15</i>	rs2066844	0,9843	0,7585	Verstraelen et al., 2009
<i>LBP</i>	rs2232618	0,0642	0,0017	Verstraelen et al., 2009
<i>CRH-BP</i>	CRH-BP +15033	NA	0,8399	Ryckman et al., 2009b
<i>MBL2</i>	G<A	NA	0,4187	Giraldo et al., 2007
	rs1800450	0,4370	0,4187	Nedovic et al., 2014
	rs1800451	0,4066	0,4187	Nedovic et al., 2014
	rs5030737	0,4503	0,4187	Nedovic et al., 2014

<i>IL-1b</i>	C/T aluse transitsioon	NA	0,7016	Cauci et al., 2007
	TaqI restriksiooni saidi polümorfism	NA	0,7016	Cauci et al., 2007
	3954 T/T, T/C, C/C	NA	0,7016	Goepfert et al., 2005
<i>IL6</i>	Heterosügootsus <i>IL6</i> -174 C/G	NA	0,8666	Goepfert et al., 2005
<i>IL8</i>	Heterosügootsus <i>IL8</i> -845 T/C	NA	0,6409	Goepfert et al., 2005
<i>IL10</i>	<i>IL10</i> -1082 A/A, A/G, G/G	NA	0,5387	Goepfert et al., 2005
<i>TNF-a</i>	<i>TNF-a</i> -238 G/A	NA	NA	Goepfert et al., 2005
	<i>TNF-a</i> -308 G/A	NA	NA	Goepfert et al., 2005
	<i>TNF-a</i> -308 G/A	NA	NA	Genç et al., 2007
<i>DSG1</i>	rs8091003	0,1979	0,6851	Tian et al., 2017
	rs200520431	NA	0,6851	Tian et al., 2017
	rs8091117	0,1902	0,6851	Tian et al., 2017
	rs16961689	0,1902	0,6851	Tian et al., 2017
	rs61730306	0,1903	0,6851	Tian et al., 2017
	rs34302455	0,1906	0,6851	Tian et al., 2017
<i>PRKCH</i>	rs2251260	0,0397	0,8412	Tian et al., 2017
<i>C14orf177</i>	rs7161578-T	0,7656	0,6441	Tian et al., 2017
<i>NLRP3</i>	42-bp VNTR in intron 4 (rs74163773)	NA	0,5430	Jaeger et al., 2016
<i>Dectin-1</i>	Stopp-koodon Tyr238X mutatsioon hiirtel	NA	0,5432	Genç et al., 2007

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Evelin Mutli,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Korduva vaginiidi geneetilised riskifaktorid Eesti populatsioonis,

mille juhendajadeks on vanemteadur Triin Laisk, lektor Kairi Koort ja professor Reet Mändar,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Evelin Mutli

31.05.2020