

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

*На правах рукописи*

**ЛЕНКОВА КСЕНИЯ ВЯЧЕСЛАВОВНА**

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ  
ФОРМИРОВАНИЯ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ**

1.5.7 – генетика

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Минниахметов Илдар Рамилевич

Уфа – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Клинико-эпидемиологическая характеристика рака шейки матки.....	14
1.2 Методы профилактики рака шейки матки.....	19
1.3 Методы диагностики рака шейки матки.....	22
1.4 Современные методы лечения рака шейки матки.....	26
1.5 Современные представления о генетике рака шейки матки.....	28
1.5.1 Влияние генов-регуляторов иммунного ответа на предрасположенность к раку шейки матки.....	30
1.5.2 Вклад генов-регуляторов клеточного цикла в развитие рака шейки матки.....	33
1.5.3 Варианты однунуклеотидных замен, выявленные в результате GWAS-исследований, которые ассоциированы с предрасположенностью к раку шейки матки.....	35
1.5.4 Роль секвенирования нового поколения в изучении молекулярных основ рака шейки матки.....	40
1.5.5 Эпигенетические механизмы развития рака шейки матки.....	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	46
2.1 Материалы исследования.....	46
2.2 Выделение ДНК.....	48
2.2.1 Выделение ДНК из соскобов с шейки матки.....	48
2.2.2 Выделение геномной ДНК.....	49
2.2.3 Выделение ДНК из парафиновых блоков FFPE.....	50
2.3 Определение ДНК вируса папилломы человека.....	52
2.3.1 ВПЧ-digene-тест.....	52
2.3.2 Определение ДНК вируса папилломы человека методом полимеразной цепной реакции.....	55
2.4 Проведение NGS-анализа.....	58
2.4.1 Пробоподготовка библиотеки для секвенирования.....	59

2.4.2 Проведение NGS-анализа, первичная и вторичная обработка данных.....	69
2.4.3 Третичный анализ данных и предсказательные инструменты.....	71
2.5 Анализ ассоциаций между полиморфизмами генов и риском развития рака шейки матки.....	72
2.6 Анализ состояния микросателлитной нестабильности в материале опухолей шейки матки.....	74
2.7 Статистический анализ.....	75
2.8 Дизайн исследования.....	76
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	78
3.1 Вирус папилломы человека, как основной этиологический агент рака шейки матки.....	78
3.1.1 Результаты пилотного проекта по скринингу ВПЧ-инфекции.....	78
3.1.2 Анализ распространенности типов ВПЧ в Республике Башкортостан с выделением когорты пациенток с элиминацией ВПЧ и персистенции вируса.....	79
3.2 Репликативное исследование локусов генов <i>CLPTM1L</i> (rs27069), <i>PAX8</i> (rs10175462) и <i>CDC42</i> (rs2268177), ассоциированных с риском развития рака шейки матки в результате GWAS, на когорте пациенток из Республики Башкортостан.....	84
3.3 Результаты анализа замен, выявленных в результате секвенирования нового поколения у женщин с клиническим диагнозом рак шейки матки из Республики Башкортостан.....	91
3.3.1. Патогенные и вероятно патогенные герминальные замены, обнаруженные в результате секвенирования нового поколения у женщин с клиническим диагнозом рак шейки матки из Республики Башкортостан ...	91
3.3.2 Редкие замены (менее 5%) неясной клинической значимости в онкогенах и генах супрессорах опухоли, выявленные у пациенток с клиническим диагнозом рак шейки матки.....	104

3.3.3 Частые замены (более 5%), выявленные у пациенток с клиническим диагнозом рак шейки матки.....	136
4.1 Оценка прогностической роли выявленных маркеров в риске развитии рака шейки матки .....	144
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	149
ВЫВОДЫ.....	154
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	156
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	158
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	180

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность и степень разработанности исследования**

Рак шейки матки (РШМ) (МКБ-10: C53.0, C53.1, C53.8, C53.9) – многофакторное онкологическое заболевание, развивающееся в неороговевающем многослойном плоском эпителии и/или железистом эпителии эндо- и экзоцервикального канала шейки матки. По оценочным данным, в 2022 году во всём мире зарегистрировано 662 301 новый случай РШМ и 348 874 случая смерти (Li Z. et al., 2025). Несмотря на существенное снижение заболеваемости за последние три десятилетия, РШМ остаётся значимой глобальной проблемой, демонстрируя выраженные региональные различия.

В странах с высоким уровнем дохода эффективные меры профилактики – вакцинация против вируса папилломы человека (ВПЧ) и программы скрининга – способствуют ускоренному сокращению заболеваемости. Среднегодовые показатели заболеваемости составляют: в странах Европы – 10,7 на 100 000 женщин, в США – 11,5 на 100 000, в Канаде и Австралии – около 7,1 на 100 000. В противоположность этому регионы Африки, Южной Америки, Юго-Восточной и Юго-Центральной Азии демонстрируют самые высокие показатели заболеваемости – от 15,3 до 40,1 на 100 000 женщин (Xu et al., 2025).

В России данный показатель составляет 13,8 на 100 000 женщин, что соответствует среднемировому уровню – 13 на 100 000 (Смирнова и др., 2024). В литературе РШМ нередко называют «болезнью неравенства» вследствие выраженной диспропорции заболеваемости и смертности между странами с низким и средним уровнем дохода и странами с высоким уровнем дохода (Vu et al., 2018). У женщин 15–44 лет РШМ входит в тройку наиболее распространённых видов рака в 149 странах и в тройку основных причин смерти от онкологических заболеваний в 154 странах (Li Z. et al., 2025).

С 1990 по 2021 год глобальное бремя женских онкологических заболеваний увеличивалось с различной скоростью. В 2021 году на рак молочной железы приходилось 2 000 800 случаев заболевания и 660 000 смертей. Для сравнения:

рак шейки матки, рак яичников и рак тела матки демонстрировали меньшие показатели – 670 000, 300 000 и 470 000 случаев соответственно (Li T. et al., 2025). Примечательно, что на РШМ приходится лишь 2% новых онкологических заболеваний в мире, но при этом – 86% связанных с ним смертей. По прогнозам, при отсутствии своевременных профилактических мероприятий смертность от РШМ увеличится на 88% к 2030 году (Кызы и др., 2024), а после 2050 года ежегодная заболеваемость достигнет 1 000 000 новых случаев (Пестрикова и др., 2022). Эти данные подчёркивают необходимость дальнейшего внедрения и расширения мер профилактики. Таким образом, РШМ является серьёзной медико-социальной проблемой, существенно снижающей качество и продолжительность жизни женщин.

Достоверно установлен этиологический агент, вызывающий РШМ. Инфекция вирусом папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска является причиной более чем 99% случаев заболевания. Однако у подавляющего большинства женщин инфицирование носит транзиторный характер, и вирус спонтанно элиминируется в течение двух лет (Bruni et al., 2021). Анализ данных Шведского регистра рака, демонстрирующий кластеризацию РШМ в семьях с отягощённой наследственностью (Ramachandran et al., 2021), позволяет заключить, что формирование ВПЧ-ассоциированного РШМ зависит от генетических и эпигенетических факторов. Тем не менее молекулярный патогенез заболевания остаётся недостаточно изученным.

С учётом того, что на сегодняшний день отсутствуют надёжные маркеры развития РШМ (кроме факта носительства ВПЧ высокого канцерогенного риска), актуальным является поиск генетических маркеров предрасположенности к заболеванию, которые в сочетании с ВПЧ-статусом позволят повысить эффективность профилактики, диагностики и мониторинга течения РШМ.

Использование современных молекулярно-генетических методов для скрининга герминальных вариантов, связанных с предрасположенностью к ВПЧ-ассоциированному РШМ, а также анализ выявленных генетических замен в совокупности с клиническими данными пациенток, является ключевым

инструментом для понимания молекулярного патогенеза и наследственного компонента заболевания.

### **Цель исследования**

Целью исследования является комплексная оценка вклада вирусологических факторов и наследственной вариабельности генома в риск развития рака шейки матки с идентификацией генетических маркеров и вирусологических характеристик для последующей оптимизации ранней диагностики и профилактики.

### **Задачи исследования**

1. Определение распространённости ВПЧ инфекции, идентификация спектра и частот онкогенных типов вируса у женщин из Республики Башкортостан с оценкой частоты спонтанной элиминации/перsistенции ВПЧ.
2. Поиск герминальных вариантов замен нуклеотидной последовательности ДНК, выявленных при таргетном NGS секвенировании 42 генов, с оценкой их значимости (*in silico*) при раке шейки матки.
3. Оценка микросателлитной нестабильности в соматической ДНК пациенток с герминальными вероятно патогенными мутациями в генах системы репарации неспаренных оснований ДНК (dMMR) на основе анализа 5 микросателлитных локусов (MSI): NR-21, BAT26, BAT-25, NR-24, NR-27.
4. Поиск ассоциаций частых вариантов 17 генов (rs1042522 гена *TP53*, rs1801133 и rs1801131 гена *MTHFR*, rs17879961 и rs1060502712 гена *CHEK2*, rs56391007 и rs34589476 гена *MET*, rs1058808 и rs1136201 гена *ERBB2*, rs1208 и rs1801280 гена *NAT2*, rs3822214 гена *KIT*, rs1799939 гена *RET*, rs144848 и rs4987117 гена *BRCA2*, rs1799950 и rs1799967 гена *BRCA1*, rs2229070 гена *ABL1*, rs1140475 гена *EGFR*, rs619203, rs529156 и rs529038 гена *ROS1*, rs1799971 гена *OPRM1*, rs4149056 гена *SLO1D1*, rs8192709 гена *CYP2B6*, rs6030, rs4524, rs1046712, rs6025, rs9332607 и rs6035 гена *F5*), выявленных при таргетном NGS секвенировании 42 генов, с риском развития рака шейки матки.

5. Выполнение репликативных исследований по результатам GWAS для вариантов генов *CLPTM1L* (rs27069), *PAX8* (rs10175462) и *CDC42* (rs2268177) с риском развитием рака шейки матки на популяции из Республики Башкортостан.
6. Определение генетических маркеров предрасположенности к раку шейки матки с целью оптимизации ранней диагностики и профилактики заболевания.

### **Научная новизна**

Впервые для Республики Башкортостан реализован пилотный популяционный скрининг ВПЧ у 28 928 женщин с проспективным мониторингом течения инфекции; оценены спектр и распространённость генотипов ВПЧ, что позволило стратифицировать когорту на группы персистирующего носительства и спонтанной элиминации.

Впервые в Российской Федерации выполнено репликационное исследование ассоциаций вариантов *CLPTM1L* rs27069, *PAX8* rs10175462, *CDC42* rs2268177, ранее выявленных в GWAS РШМ, на независимой выборке с учётом статуса ВПЧ (перsistенция/элиминация).

Впервые для региона охарактеризован спектр редких герминалных вариантов в панели из 48 генов у пациенток с РШМ; идентифицированы патогенные и вероятно патогенные варианты, а также описаны варианты с неопределенной клинической значимостью (VUS) с выделением подгруппы потенциально патогенных.

Проведён поисковый анализ ассоциаций частых вариантов в 20 генах с риском РШМ для женщин из Республики Башкортостан (дизайн «случай-контроль»).

Впервые для онкогинекологической когорты региона оценена микросателлитная нестабильность (MSI) опухолевой ДНК у носительниц герминалных dMMR-вариантов по панели локусов NR-21, BAT-26, BAT-25, NR-24, NR-27.

Сформирована кандидатная панель маркеров предрасположенности к РШМ, объединяющая вирусологические (типовыи спектр и персистенция ВПЧ) и генетические показатели, ориентированная на оптимизацию программ раннего выявления и профилактики в регионе.

### **Научно-практическая значимость работы**

Изучение генов, предрасполагающих к онкологическим заболеваниям, как в контексте выявления наследственных опухолевых синдромов, так и полиморфных вариантов, которые под воздействием внешних и внутренних факторов могут приобретать патогенные свойства, остаётся одной из наименее исследованных областей онкогенетики. Около 5-10% злокачественных новообразований имеют наследственную природу (Saipova, 2024). Носители генетических вариантов, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами, характеризуются высоким риском развития новообразований в детском или молодом возрасте, а также повышенной вероятностью возникновения нескольких независимых опухолей в течение жизни.

Однако с учётом особенностей патогенеза ВПЧ-ассоциированного РШМ развитие злокачественной опухоли определяется не только наличием генетического дефекта, но и временем контакта с модифицирующим фактором – ВПЧ-инфекцией; скорость прогрессии от дисплазии до рака также зависит от ряда дополнительных факторов, включая генетический компонент.

Несмотря на значимость наследственного фактора, его практическое применение в онкологии остаётся ограниченным. Клинические решения, как правило, принимаются уже после выявления злокачественного процесса у носителей патогенных вариантов. Поиск неблагоприятных герминалльных вариантов у пациентов с онкологическими заболеваниями является эффективным скрининговым инструментом для выявления групп высокого риска. В настоящее время существует ряд нозологий, для которых доказан наследственный компонент и внедрены программы скрининга мутаций в семьях с отягощённой

наследственностью: рак молочной железы, колоректальный рак, рак щитовидной железы.

Несмотря на наличие выраженного наследственного компонента, рак шейки матки остаётся недостаточно изученным онкологическим заболеванием. Внедрение предиктивных инструментов на основе генетического тестирования у пациенток с персистирующим носительством ВПЧ, спорными или неопределёнными результатами морфологических исследований шейки матки, а также у женщин с отягощённым наследственным анамнезом позволит оптимизировать стратегии ведения пациенток группы риска.

### **Методология и методы исследования**

В настоящем исследовании использован широкий спектр молекулярно-биологических методов, направленных на детекцию вирусной ДНК в образцах соскобов шейки матки. Для решения основных задач диссертационной работы применялись классические методы молекулярно-генетического анализа ДНК, включая выделение ДНК, гель-электрофорез, полимеразную цепную реакцию в реальном времени, секвенирование и секвенирование нового поколения. В качестве дополнительного метода использовалась иммуногистохимия. Биоматериал был собран с соблюдением биомедицинских этических норм и стандартов. Исследование выполнено на базе лаборатории генетики человека Института биохимии и генетики УФИЦ РАН (г. Уфа). Работа проведена в соответствии с рекомендациями Хельсинской декларации и одобрена Этическим комитетом Института биохимии и генетики РАН (код протокола: 19, дата: 25 ноября 2021 г.).

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

1. Частота носительства ВПЧ инфекции среди женщин 30-39 лет составила 10,3%, средний уровень вирусной нагрузки – 287,9 RLU/COV, у 21 женщины (0,69%) выявлен рак шейки матки.

2. Самые распространённые типы ВПЧ ВКР в исследуемом регионе 16, 51 и 56, а 56,6% ВПЧ-инфицированных женщин являются носителями как минимум трех типов вируса, не выявлено прямой зависимости между вирусной нагрузкой, элиминацией вируса и количеством типов ВПЧ в образце.
3. Идентифицированы герминальные патогенные варианты в генах *APC*, *BRCA2*, *BRAF*, *MSH2*, *MSH6* у пациенток с раком шейки матки.
4. Выявлены ранее не описанные ассоциации полиморфных вариантов генов *MET*, *CHEK2*, *ERBB2*, и *NAT2* с раком шейки матки, варианта p.Pro72Arg гена *TP53* с ранней манифестацией рака шейки матки, а варианта p.Glu429Ala гена *MTHFR* – с трехлетней выживаемостью.
5. Репликация GWAS исследований выявила ассоциации с аллелем G полиморфного локуса rs27069 гена *CLTP1L* и с аллелем Т и генотипом ТТ локуса rs2268177 гена *CDC42* с раком шейки матки.
6. Установлена прогностическая роль генотипа ТТ полиморфного варианта rs2268177 гена *CDC42* в развитии рака шейки матки и с более чем 2-3 кратным увеличением заболеваемости.

### **Степень достоверности и апробации результатов**

Достоверность и надежность полученных результатов опирается на репрезентативность выборки и использование современных молекулярно-генетических методов исследования, а также статистических и биоинформационических инструментов. Результаты исследования согласуются с литературными данными. Результаты исследования были представлены в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, а также на конференциях, соответствующих профилю исследования.

### **Личный вклад автора в проведенное исследование**

Определение темы, цели и задач диссертационной работы проводилось совместно с научным руководителем, к.б.н., Минниахметовым Илдаром Рамилевичем. Автор принимал активное участие в разработке дизайна

исследования и его структуры, осуществлял сбор биологического материала, проводил анкетирование пациенток и определял критерии включения образцов в исследование. Автор лично выполнял молекулярно-биологическую часть исследования, а также обработку и интерпретацию полученных данных, включая использование современных биоинформационических инструментов. В завершение работы автор провёл детальный анализ и систематизацию результатов, на основании которых был подготовлен ряд публикаций, вышедших в научных журналах, включённых в белый список ВАК.

## **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, из них 2 статьи в изданиях, индексируемые в международной базе Scopus.

## **Соответствие диссертации паспорту научной деятельности**

Диссертационная работа «Исследование молекулярно-генетических основ формирования рака шейки матки» соответствует формуле специальности 1.5.7. - генетика. В исследовании был проведен поиск изменений нуклеотидной последовательности 51 гена у женщин с РШМ из Республики Башкортостан с использованием современных молекулярно-генетических и биоинформационических методов анализа генома человека. Области исследования: «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни», «Молекулярные и цитологические основы наследственности», «Онкогенетика».

## **Структура и объем работы**

Текст диссертации соответствует традиционной структуре, включает в себя введение, основную часть и заключение. Основная часть, состоящая из несколько глав, включает в себя обзор литературы, где рассматривается актуальность проблемы, материалы и методы исследования, полученные результаты и их

последующее обсуждение. Диссертация изложена на 190 страницах машинописного текста, содержит 36 таблиц и 13 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 206 источников.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Клинико-эпидемиологическая характеристика рака шейки матки

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) РШМ занимает четвертое по распространенности место в структуре онкологических заболеваний у женщин. В 2022 году рак шейки матки был диагностирован у 660 000 женщин во всем мире, и около 350 000 женщин умерли от этой патологии. В 2020 году было зарегистрировано 604 127 случаев РШМ и 341 831 смертей от данного заболевания (Singh et al., 2023). В то же время в 2018 году приводились данные о 530 000 случаев. Таким образом, несмотря на стратегию ВОЗ по ликвидации РШМ, общемировая заболеваемость РШМ растет.

По данным 2022 года стандартизованный показатель заболеваемости раком шейки матки в России составил 13,8 случаев на 100 тыс. женщин. В общемировом масштабе он составил 13 случаев на 100 тысяч женщин, при этом показатель варьирует в разных странах мира и заболеваемость раком шейки матки различается, составляя от 2 до 75 случаев на 100 тысяч женщин. Распространённость рака шейки матки в РФ составляет 126,7 случаев на 100 тыс. женщин и держится на таком уровне уже достаточно долгое время. В РФ стандартизованный показатель смертности от рака шейки матки 5,2 случая на 100 тысяч женщин, а соотношение смертности и заболеваемости РШМ в РФ 0,49 (Смирнова и др., 2024). Таким образом заболеваемость и смертность от РШМ в нашей стране находится на достаточно высоком уровне.

Рак шейки матки имеет два основных подтипа: плоскоклеточный рак (ПР) и аденокарцинома (АК). ПР составляет 82,72% случаев рака шейки матки в мире, а АК – 12,18%. Возрастные тенденции показали, что ПР достигает пика примерно в возрасте 55 лет, а АК выходит на плато после 45 лет (Wang et al., 2024). К редким гистологическим подтипам РШМ относятся нейроэндокринные карциномы, муцинозная аденокарциномы желудочного типа и стекловидноклеточная аденокарцинома. Эти гистологические подтипы, как правило, характеризуются низкой частотой, агрессивным биологическим поведением, определенной

химиорадиорезистентностью и, следовательно, высокой частотой рецидивов с пагубным влиянием на выживаемость (Arango-Bravo et al., 2024).

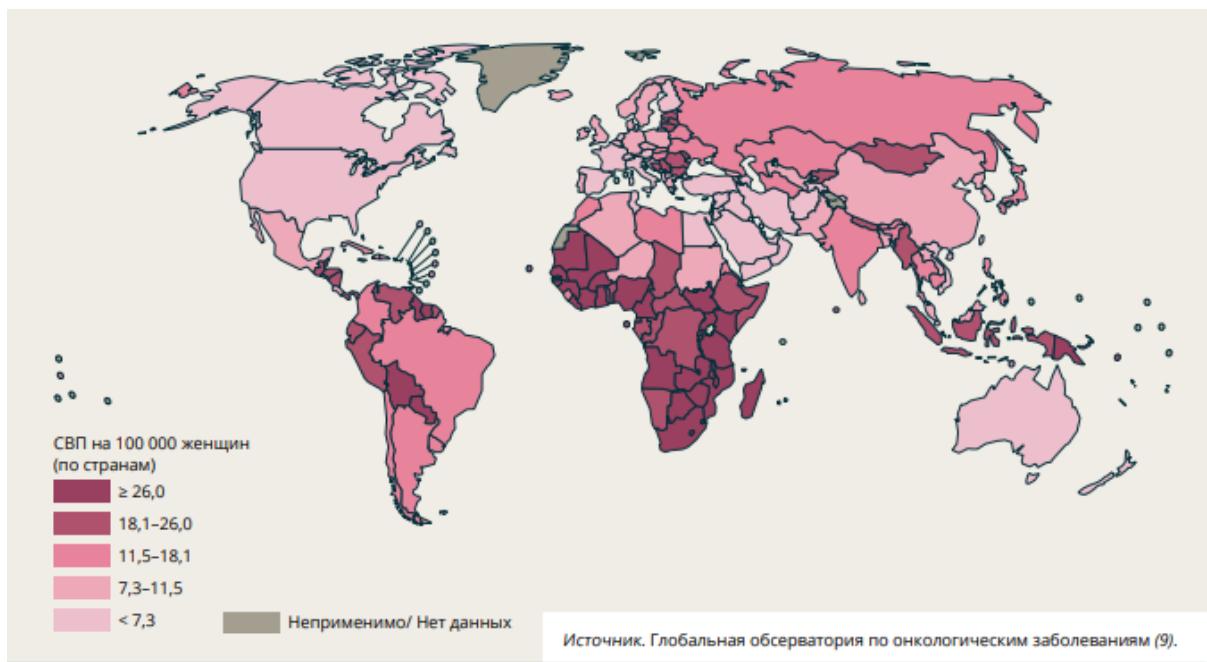


Рисунок 1 – Данные ВОЗ о стандартизированных по возрасту показателях заболеваемости раком шейки матки за 2018 г [5]

РШМ – онкологическое заболевание с установленным этиологическим агентом: вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) является самым сильным фактором риска развития интраэпителиальной неоплазии шейки матки и рака. В настоящее время показано, что статус курения и рак легкого меньше коррелируют между собой, чем ВПЧ-инфекция и РШМ (Okunade, 2020). Однако лишь у небольшого процента женщин, встречавшихся с ВПЧ, инфекция перетекает в персистентную форму, которая со временем может привести к РШМ (Moscicki et al., 2004).

ВПЧ распространен повсеместно, был обнаружен как у людей, так и у животных, является специфичным для своих хозяев. В 1987 году была опубликована первая работа по выявлению интеграции ВПЧ в геном человека. Копия ВПЧ 16 типа была обнаружена в участке между генами *KLF5* и *KLF12* на хромосоме 13q22 в клеточной линии SiHa (El Awady et al., 1987). Нет фактических данных о заболеваемости и распространенности ВПЧ инфекции, ввиду отсутствия

четкой статистики о количестве инфицированных людей (Burd, 2003). Харпер и соавторы сообщили, что ежегодно ВПЧ инфицируются более 1,4 миллионов человек (Harper et al., 2017). Риск заражения ВПЧ на протяжении всей жизни превышает 80%, что делает ВПЧ самой распространенной инфекцией, передаваемой половым путем (Конон и др., 2018).

ВПЧ относятся к семейству Papillomaviridae, которые представляют собой небольшие, безоболочечные вирусы с двухцепочечной ДНК. Геном ВПЧ имеет кольцевую форму и, по оценкам, имеет размер 8 000 пар нуклеотидов, при этом большинство из них кодируют восемь белков, которые можно разделить на белки ранних и поздних регионов. Ранний регион кодирует семь белков (E1, E2, E3, E4, E5, E6 и E7), которые отвечают за репликацию генома ВПЧ и иммунную модуляцию. Поздний регион кодирует капсидные белки L1 и L2, которые, как сообщается, играют роль в передаче вируса (Choi et al., 2023). Согласно сходству геномных последовательностей ВПЧ, было описано более 200 типов ВПЧ, при том, что каждый тип ВПЧ отличается от другого по крайней мере на 10% в высококонсервативном гене *L1*. На основании такого сходства ВПЧ делятся на пять родов ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  и  $\nu$ ), где  $\alpha$ -папилломавирусы преимущественно содержат типы ВПЧ, которые поражают эпителиальную слизистую оболочку (Muñoz-Bello et al., 2022). Учитывая роль ВПЧ в развитии РШМ, его можно классифицировать, как инфекцию высокого (ВКР) и низкого (НКР) канцерогенного риска. К ВПЧ НКР отнесены 6, 11, 42, 43 и 44 типы, ВКР включают 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 и 70 типы. ВПЧ НКР также иногда обнаруживаются при раке шейки матки (Burd, 2023). Персистенция ВПЧ может привести к изменениям в многослойном плоском неороговевающем эпителии цервикального канала, которые классифицируют как цервикальная интраэпителиальная неоплазия 1–3 степени (CIN) или дисплазия. Без ее своевременного и адекватного лечения данное состояние в некоторых случаях прогрессирует в CIS (cancer *in situ*), а в дальнейшем и в стадию инвазивного РШМ (Димитриади и др., 2020).

Несмотря на то, что большинство случаев ВПЧ бессимптомны, установлено, что вирусные онкопротеины E6 и E7 играют ключевую роль в онкогенезе. В

процессе репликации вирусного генома они могут вызывать все отличительные признаки раковой клетки, то есть неконтролируемую клеточную пролиферацию, ангиогенез, инвазию, метастазирование и неограниченную активность теломеразы наряду с уклонением от апоптоза и активности супрессоров роста (Pal et al., 2020). Доказано, что интеграция ВПЧ происходит со сдвигом открытых рамок считывания областей *E1* и *E2* вирусного генома, что приводит к активации онкогенов E6 и E7 (Hanahan et al., 2011), которые имеют несколько молекулярных мишней, способствующих малигнизации. Белок E6 связывает и разрушает опухолевый супрессор p53, кодируемый геном *TP53*, и проапоптотический белок BAK, который является членом семейства белков Bcl-2, что увеличивает устойчивость клетки-хозяина к апоптозу (Schiffman et al., 2007). Белок E7 подавляет экспрессию гена ретинобластомы 1 (*RB1*) с инициацией транскрипции фактора E2F, стимулирует продукцию циклинзависимой киназы 2 (CDK2)/циклин A, а также комплекса CDK2/циклин E (El Awady et al., 1987), тем самым блокируя остановку клеточного цикла, параллельно стимуляция деление клеток. При доброкачественном варианте вирусоносительства, ДНК ВПЧ обычно обнаруживается в клетках эпителия в эпизомальной форме. Злокачественные клетки могут содержать как эпизомальную, так и экстрахромосомную ДНК (Юсупова и др., 2019). В дополнение к этому, пораженные клетки активно преобразуют местную среду и создают поддерживающую постинфекционную микросреду, которая в свою очередь становится ключевым фактором перsistенции, размножения и малигнизации (Yuan et al., 2021).

Около 90% случаев инфицирования, вызванных ВПЧ, носят транзиторный характер и элиминируются спонтанно в течение одного-двух лет, не приводя к развитию патологических изменений, что обусловлено эффективностью иммунной системы (Довлетханова и др., 2023). Процесс канцерогенеза, начиная с первых клеточных изменений, вызванных ВПЧ-инфекцией, и заканчивая РШМ, может занимать от 10 до 40 лет (но в редких случаях РШМ может развиться и за 1-2 года), что обеспечивает окно для клинической профилактики, диагностики и лечения (Wang et al., 2020). Развитие РШМ идет по пути формирования

многофакторного заболевания, в котором помимо персистенции самого ВПЧ, большую роль играет системная иммуносупрессия, вызванная врожденными дефектами иммунной системы, ВИЧ-инфекцией или приемом иммунодепрессантов, локальной иммуносупрессией, которая может быть вызвана изменениями в вагинальной микробиоте женщины, а также канцерогенными факторами (Bowden et al., 2023). Также известно, что факторы генетической предрасположенности к кондиломам, гипогаммаглобулинемии, синдрому миелокатексиса (WHIM), синдрому Линча могут быть ассоциированы с РШМ (Antill et al., 2015). Менделевская рандомизация, выполненная при проведении GWAS-исследования, дополнительно подтвердила дополнительную роль курения, более старшего возраста первой беременности и количества половых партнеров в риске развития РШМ (Bowden et al., 2021). Кроме этого, специфический генетический профиль и эпигенетические нарушения вносят существенный вклад в развитие РШМ. Таким образом, на первый план выходит поиск генетических и эпигенетических факторов риска, поскольку они позволяют лучше понять взаимодействие между организмом и вирусом, а также расширяют общее этиологическое понимание канцерогенеза шейки матки (Минниахметов и др., 2020).

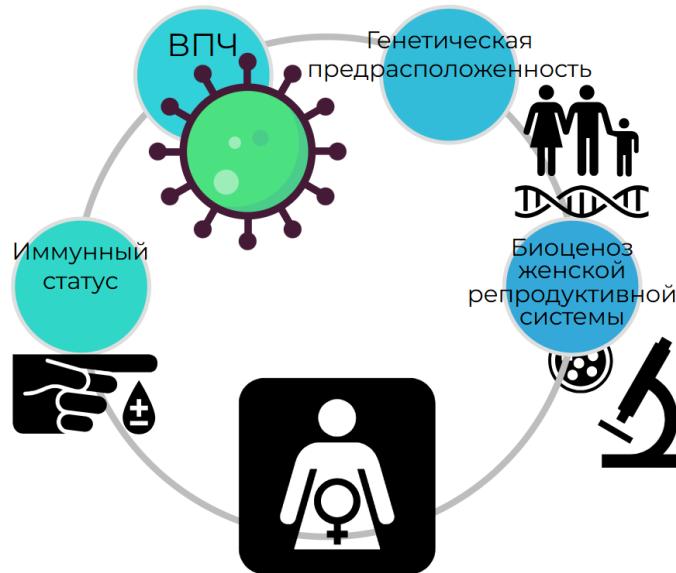


Рисунок 2 – Вклад различных факторов в канцерогенез РШМ  
(собственный дизайн)

## 1.2 Методы профилактики рака шейки матки

Поскольку почти все случаи РШМ (99%) ассоциированы с инфекцией вируса папилломы человека, вакцинация против ВПЧ является ключевой стратегией первичной профилактики. Однако скрининг, как инструмент вторичной профилактики, остаётся не менее важным компонентом ликвидации РШМ, особенно в регионах с низкой доступностью и недостаточным внедрением программ вакцинации против ВПЧ (Arbyn et al., 2020; Gakidou et al., 2008).

Глобальная стратегия ВОЗ по ликвидации РШМ включает достижение следующих целевых показателей: вакцинация 90% девочек против ВПЧ к 15 годам; скрининг 70% женщин с использованием высокоэффективного теста к 35 годам и повторно к 45 годам; а также обеспечение лечения для 90% женщин с заболеваниями шейки матки (Arroyo Mühr et al., 2024).

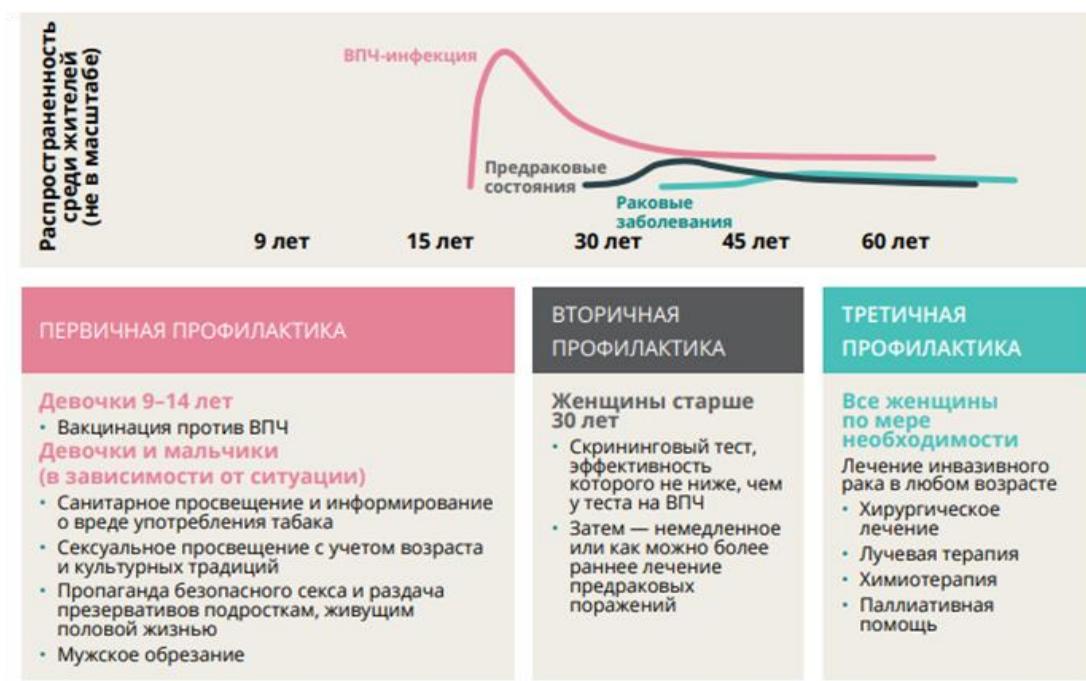


Рисунок 3 – Стратегия ВОЗ по ликвидации РШМ [5]

Программы вакцинации против ВПЧ достигли значительных успехов в профилактике заболеваний, связанных с ВПЧ, в первую очередь с РШМ. Страны, которые внесли в обязательную программу вакцинации вакцины против ВПЧ, регистрируют существенное снижение заболеваний, связанных с ВПЧ, а уровень

встречаемости непосредственно аномалий шейки матки высокой степени и генитальных бородавок упал до 83% (Gonzalez-Rodriguez et al., 2024).

Позитивным примером снижения заболеваемости РШМ является опыт таких стран, как Соединённые Штаты Америки, где благодаря широкодоступной вакцинации против ВПЧ и внедрению программ скрининга заболеваемость и смертность от РШМ существенно снизились за последние десятилетия (Pan et al., 2021). Однако необходимо учитывать, что, несмотря на высокую эффективность ВПЧ-вакцин и их ключевую роль в профилактике РШМ, существует группа лиц, демонстрирующих недостаточный серологический ответ на вакцинацию. В частности, значительная часть вакцинированных четырёхвалентной вакциной остаётся серонегативной по антителам к ВПЧ 18 в течение 2-12 лет после вакцинации. Кроме того, независимо от времени, 4% и 14,3% лиц, привитых четырёхвалентной вакциной, остаются серонегативными по нейтрализующим и связывающим антителам к ВПЧ 16 и ВПЧ 18 соответственно. Для сравнения, у женщин, вакцинированных двухвалентной вакциной, измеряемые антитела к ВПЧ 16 и ВПЧ 18 сохраняются на протяжении 2-12 лет (Gray et al., 2024).

В группу повышенного риска также входят иммуносупрессированные пациентки. Так, инфекция вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) снижает восприимчивость к вакцинам и их эффективность (Lacey, 2019). Более того, все существующие вакцины направлены на предотвращение заражения вирусом, в то время как препараты, способные индуцировать регресс уже сформировавшихся ВПЧ-ассоциированных поражений, всё ещё находятся на стадии разработки (Дорохотова и др., 2021).

Вакцины первого поколения предотвращают инфицирование ВПЧ 16 и ВПЧ 18 типов, вызывающих около 70% случаев РШМ и обладающих наибольшим канцерогенным потенциалом (Harper et al., 2017). В настоящее время также зарегистрированы четырёхвалентная вакцина против ВПЧ 6, 11, 16 и 18 типов и девятивалентная вакцина, обеспечивающая защиту от типов 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 и 58 (Дорохотова и др., 2021).

Согласно рекомендациям ВОЗ, основным инструментом вторичной профилактики РШМ является скрининг, при этом наиболее эффективным методом признан тест на ВПЧ высокого онкогенного риска. В странах с низким и средним уровнем дохода женщины сталкиваются с рядом барьеров для прохождения скрининга: индивидуальными, культурными, социальными, религиозными и структурно-системными (Petersen et al., 2022). Поэтому по экономическим причинам наблюдается выраженная диспропорция в уровнях заболеваемости и смертности между странами с низким и средним уровнем дохода и государствами с высоким уровнем дохода (Vu et al., 2018). Для обеспечения высокой эффективности скрининговых программ необходим максимальный охват населения. В отношении РШМ он должен составлять не менее 80% женского населения (Хайлова и др., 2025).

Цитологический скрининг шейки матки сыграл ключевую роль в снижении заболеваемости и смертности от РШМ в прошлом веке. Наличие убедительных данных о ведущей роли ВПЧ в патогенезе карцином шейки матки стимулировало разработку методов молекулярной диагностики. Эволюция подходов к скринингу привела к переходу от рефлексного тестирования на ВПЧ при лёгких цитологических изменениях к комбинированному применению цитологии и ВПЧ-тестирования, а затем – к внедрению первичного скрининга на ВПЧ как основной методики (Bhatla et al., 2020).

Третичной стратегией ликвидации РШМ является лечение уже возникшего заболевания. Такие случаи рассматриваются как упущеные возможности для своевременной первичной и вторичной профилактики. Современные подходы к лечению РШМ зависят от стадии опухолевого процесса. Основные терапевтические стратегии включают хирургическое вмешательство, химиотерапию, лучевую терапию или их комбинации. Хирургическое лечение преимущественно применяется при РШМ ранних стадий, тогда как на поздних стадиях используются химиотерапия либо химиолучевая терапия (Lien et al., 2025).

### **1.3 Методы диагностики рака шейки матки**

Шейка матки является органом, доступным для визуального осмотра, что теоретически позволяет минимизировать частоту возникновения РШМ и обеспечивает возможность своевременного выявления и лечения заболевания. Для онкологических заболеваний в целом доказано, что применение тестов для раннего выявления снижает смертность. В отношении РШМ качественно организованные программы скрининга, включая цитологическое исследование мазка шейки матки (тест Папаниколау), демонстрируют эффективность в снижении заболеваемости и смертности (Lugo-Salazar et al., 2024).

Первые эффективные программы скрининга РШМ в нашей стране были организованы в 1970-е годы, когда единственным доступным методом являлась цитология по Папаниколау. В настоящее время, наряду с традиционной цитологией, используется жидкостная цитология. При надлежащей квалификации цитолога их диагностическая эффективность сопоставима. Для интерпретации цитологических мазков с окраской по Папаниколау применяется единая классификация Bethesda (TBS) (Барчук и др., 2021).

Одним из ключевых морфологических признаков, применяемых для выявления эпителиальных аномалий, является увеличение размеров ядер по сравнению с ядрами промежуточных клеток. Дополнительными диагностически значимыми критериями служат гиперхромия, наличие зоны перинуклеарного просветления, выраженность ядрышек и др. (Alrajjal et al., 2021). В соответствии с классификацией TBS цитологические заключения формулируются следующим образом:

NILM (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy) – внутриэпителиальные поражения или злокачественные изменения не выявлены;

ASC-US (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) – атипичные клетки плоского эпителия неопределённого значения;

ASC-H (Atypical Squamous Cells - cannot exclude HSIL) – атипичные клетки плоского эпителия, при которых нельзя исключить высокоградное поражение;

LSIL (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion) – слабовыраженные плоскоклеточные внутриэпителиальные поражения;

HSIL (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion) – выраженные плоскоклеточные внутриэпителиальные поражения;

CIS (Carcinoma in situ) – карцинома in situ;

AGS-NOS (Atypical Glandular Cells, not otherwise specified) – атипичные железистые клетки неясного значения;

AGC-FN (Atypical Glandular Cells - favor neoplastic) – атипичные железистые клетки, предполагающие неоплазию;

AIS (Adenocarcinoma in situ) – аденокарцинома шейки матки in situ (Pangarkar, 2022).

Согласно рекомендациям ВОЗ (2010), цитологическому скринингу подлежат женщины в возрасте 25-65 лет: в группе 25-49 лет – с периодичностью один раз в 3 года, после 50 лет – один раз в 5 лет. Скрининг после 65 лет не требуется при наличии двух последних отрицательных результатов (Новик, 2020).

В ряде публикаций обсуждается целесообразность начала скрининга с 21 года. Ранее предполагалось, что начало обследований у женщин младше 21 года, особенно у подростков, может причинить больше вреда, чем пользы. Кроме того, подходы к лечению дисплазии и РШМ в этой возрастной группе осложняются необходимостью сохранения фертильности, что должно обязательно учитываться при выборе тактики ведения молодых пациенток (Pan et al., 2021).

Применение двойного цитохимического окрашивания, основанного на выявлении ко-экспрессии белков p16 и KI-67, в дополнении к цитологии повышает чувствительность для обнаружения дисплазии и является надежным маркером трансформации клеток под действием ВПЧ-инфекции (Rajaram et al., 2021). p16 и KI-67 являются белками-регуляторами клеточного цикла, и выявление их одновременной экспрессии в одной и той же клетке указывает на нарушение регуляции клеточного цикла, связанное с ВПЧ. Метод высокочувствителен и специфичен в сравнении с рутинным цитологическим скринингом (Ouh et al., 2021). Его применение особенно обоснованно для

верификации результатов цитологической диагностики, при аномальной кольпоскопической картины и длительной перsistенции ВПЧ.

Визуальные инспекционные тесты, такие как визуальный осмотр, с уксусной кислотой (VIA) и/или раствором Люголя (VILI), являются удовлетворительной альтернативой цитологии. Эпителий, в области которого происходит ВПЧ-трансформация, становится ацетобелым и отрицательным к раствору Люголя. Это простые, удобные в применении и экономически эффективные методы, которые могут использоваться медицинскими работниками и особенно полезны в странах с ограниченными ресурсами, где наблюдается недостаток финансирования, квалифицированных кадров, инфраструктуры и технической поддержки (Rajaram et al., 2021).

В настоящее время первичный скрининг на ВПЧ часто проводится с использованием молекулярно-биологических тестов для детекции вирусной ДНК в соскобах шейки матки. Эти методы обладают более высокой чувствительностью для выявления предраковых поражений, обеспечивают большую надёжность отрицательного результата и позволяют безопасно увеличивать интервалы между скринингами (Bhatla et al., 2020). Исследование выполняется на образцах эпителиальных клеток цервикального канала, собранных медицинским работником, с применением высокочувствительных молекулярно-генетических тестов, направленных на выявление специфических фрагментов ДНК вируса папилломы человека. В настоящее время доступны альтернативные способы забора материала: самостоятельный забор с последующей почтовой отправкой в лабораторию (Winer et al., 2023), а также использование мочи в качестве исследуемого образца (Nilyanimit et al., 2024).

По данным 2021 года, на мировом рынке представлено около 254 коммерческих тестов на ВПЧ и 425 различных вариантов тест-систем, при этом только 40% из них имеют хотя бы одну рецензируемую публикацию, а 90% не проходят оценку в соответствии с клиническими стандартами безопасности и качества (Rajaram et al., 2021).

Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) является относительно недорогим и позволяет оперативно определить тип ВПЧ с количественной и качественной оценкой вирусной нагрузки, а также дифференцировать высоко- и низкоонкогенные типы вируса (Пестрикова и др., 2022). Однако вирусная нагрузка ВПЧ может быстро изменяться в ходе канцерогенеза, и традиционная количественная ПЦР-РВ не всегда позволяет точно зафиксировать эти динамические колебания (Lv et al., 2023).

В качестве технологии ВПЧ-тестирования также применяется метод гибридного захвата, основанный на связывании вирусной ДНК с комплементарными РНК-зондами, последующем захвате образовавшегося гибрида моноклональными антителами и хемилюминесцентной детекции комплексов (Минниахметов и др., 2020).

Ещё одним высокочувствительным методом является капельная цифровая ПЦР, позволяющая точно определять количество копий ДНК-мишени путём разделения реакционной смеси на тысячи наноразмерных капель; наличие или отсутствие целевой последовательности в каждой капле регистрируется по флуоресценции, что обеспечивает цифровое считывание результатов (Bell et al., 2018).

Для комплексной оценки микробиома репродуктивной системы женщины может применяться метод секвенирования ампликонов гена 16S рРНК (Borgogna et al., 2020).

Анализ метилирования ДНК клеток цервикального канала представляет собой перспективный инструмент для направления женщин с положительным результатом ВПЧ-теста на кольпоскопию, что позволяет формировать более экономически эффективные скрининговые программы (Salta et al., 2023). В частности, определение аномального метилирования генов *FAM19A4* и *miR124-2* может служить не только эффективным дополнением к существующим методам скрининга, но и потенциально рассматриваться как будущая самостоятельная альтернатива в диагностике РШМ (Андреев и др., 2023).

Несмотря на наличие широкого спектра современных методов диагностики РШМ, «золотым стандартом» остаётся морфологическое гистологическое исследование микропрепарата шейки матки (Кузнецова и др., 2022). Согласно действующим клиническим рекомендациям, диагноз устанавливается на основании данных анамнеза, физикального обследования, морфологической верификации и результатов методов лучевой диагностики.

#### **1.4 Современные методы лечения рака шейки матки**

Большинство диспластических состояний шейки матки, таких как CIN I-CIN II, регressируют спонтанно в течение менее чем 24 месяцев, причём наиболее высокие показатели регрессии наблюдаются у молодых женщин. Прогрессирование дисплазии в рак отмечается менее чем в 0,5% случаев. Консервативное лечение является приоритетным, особенно у женщин репродуктивного возраста. Однако в связи с неоднородностью вероятности регрессии при HSIL, при выявлении тяжёлой дисплазии рекомендовано оперативное лечение (Loopik et al., 2021).

Основная тактика лечения пациенток с РШМ зависит от стадии заболевания.

При стадиях IA1-IA2 предпочтительным является хирургическое лечение.

При стадиях IB и IIА возможно проведение хирургического лечения, лучевой терапии или химиолучевой терапии.

При стадиях IIВ-IVА стандартом является проведение химиолучевой терапии по радикальной программе: сочетанная лучевая терапия (дистанционная + брахитерапия) в комбинации с еженедельным введением цисплатина по 40 мг/м<sup>2</sup> №5-6 в течение курса дистанционной лучевой терапии (Khokhlova et al., 2023; Abu-Rustum et al., 2023).

Иммунотерапия, в частности терапия ингибиторами контрольных точек, занимает всё более значимое место как новый эффективный подход к лечению РШМ. В действующих клинических рекомендациях предусмотрено проведение иммуногистохимических исследований, направленных на выявление экспрессии

PD-L1 (лиганд программируемой смерти 1) на иммунокомпетентных клетках, а также определение микросателлитной нестабильности опухоли для отбора пациенток, которым может быть назначена иммунотерапия. При положительном результате тестирования на PD-L1 препараты, такие как пембролизумаб, демонстрируют эффективность у пациенток с метастатическим или неоперабельным РШМ, прогрессирующим на фоне химиотерапии (Colombo et al., 2021). Положительная экспрессия PD-L1 значительно чаще наблюдается при плоскоклеточной карциноме шейки матки, чем при adenокарциноме (87% против 39%,  $p<0,001$ ) (Liu J. et al., 2022). Считается, что опухоли РШМ с феноменом микросателлитной нестабильности (MSI/dMMR) характеризуются более высоким уровнем экспрессии PD-L1 (Oliushina et al., 2023).

Одним из вариантов органосохраняющего лечения неоплазий шейки матки является фотодинамическая терапия (ФДТ), включающая введение фотосенсибилизатора и локальное воздействие направленного светового излучения (Гилярова и др., 2021). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что многоэтапные протоколы ФДТ при инвазивном РШМ могут обеспечивать высокий уровень терапевтического ответа и увеличивать безрецидивную выживаемость (Afanasiev et al., 2022).

Перспективным направлением терапии является коррекция эпигенетических нарушений, в частности реметилирование ДНК. Поскольку метилирование не изменяет первичную структуру ДНК, его можно обратить с помощью деметилирующих агентов. Исследуются ингибиторы ДНК-метилтрансфераз, такие как 5'-азацитидин (5-аза), которые потенциально могут применяться как противоопухолевые средства (Singh et al., 2022).

На сегодняшний день разработаны различные виды наноносителей для терапии РШМ; особую значимость имеют липидные наноструктуры благодаря их биосовместимости и безопасности. Гидрогелевые наночастицы также нашли применение в лечении РШМ; эти полимерные системы обеспечивают пролонгированное высвобождение терапевтических агентов и могут совмещать лечебные и диагностические функции (Xie et al., 2024).

Новой стратегией лечения ВПЧ-ассоциированных опухолей, включая РШМ, является использование технологии редактирования генов CRISPR-Cas9, позволяющей подавлять канцерогенные эффекты онкогенов *E6* и *E7*. Создание направляющих РНК, специфичных к интегрированной ДНК ВПЧ, способно привести к её элиминации и восстановлению функции белков p53 и pRb. Такая реактивация естественных регуляторных путей может останавливать aberrантный клеточный рост и запускать апоптоз (Kermanshahi et al., 2025).

### **1.5 Современные представления о генетике рака шейки матки**

Несмотря на накопленные данные об этиологии и патогенезе РШМ, приоритетной задачей является поиск прогностически значимых маркеров генетической предрасположенности к ВПЧ-ассоциированному РШМ. Фактически выделение таких маркеров позволит выявить группу риска, что свою очередь даст возможность для проведения таргетной профилактики заболевания. Очевидно, что в тех случаях, когда элиминации вируса не происходит, большую роль играет генетическая предрасположенность. Именно поэтому необходимо выявить наследственные генетические факторы предрасположенности к развитию РШМ, что позволит лучше понять механизмы взаимодействия вируса с организмом хозяина, а также расширит понимание этиологии канцерогенеза шейки матки. Кроме того, еще одной задачей является возможность получения прогноза реакций отдельных пациентов на лечение рака, ассоцииированного с ВПЧ: она различна, и существует потребность в поиске биомаркеров для стратификации риска, который может помочь определить тактику и интенсивность лечения.

По данным Шведского регистра рака, РШМ имеет семейную кластеризацию. В исследованиях сообщалось, что относительный риск развития РШМ в 1,5-2,3 раза выше в семьях с отягощенной наследственностью. Этот риск значителен и близок к относительному семейному риску при раке молочной железы, который имеет доказанный наследственный компонент (Ramachandran et al., 2021). Данный факт является убедительным доказательством того, что

генетические факторы, способствующие развитию ВПЧ-зависимого РШМ, существуют, хотя и достоверно неизвестны.

Большинство известных генов предрасположенности к раку участвуют в поддержании целостности генома, защищая ДНК от мутаций, которые в конечном итоге могут привести к злокачественным новообразованиям. Современные данные свидетельствуют о том, что герминальные замены, помимо увеличения риска развития рака, влияют на прогрессирование опухоли, формируя картину соматических изменений при раке (Chanock, 2021; Srinivasan et al., 2021). Считается, что в канцерогенезе РШМ значимую роль играют гены иммунной системы, гены репарации ДНК, а также ряд других функциональных генов (Ротару и др., 2020).

Исследования предрасположенности к РШМ развивались от поисков ассоциаций потенциально рисковых аллелей, генотипов и гаплотипов этих генов методом гель-электрофореза и ПЦР до применения технологии секвенирования нового поколения как с использованием герминальной, так и соматической ДНК пациенток с РШМ (NGS-next generation sequencing) и даже проведения GWAS-исследований (genome wide association studies – полногеномный поиск ассоциаций).

Подразделяющийся в своем подавляющем большинстве на ПР и АК, РШМ может быть обусловлен наличием герминальных потенциально онкогенных мутаций. При этом ПР шейки матки и АК имеют разные молекулярные профили (Wright et al., 2013). Так в исследовании ландшафта соматических мутаций было показано, что ПР шейки матки, так и АК имели высокие показатели мутаций *PIK3CA*, которые были связаны с уменьшением выживаемости. Аналогичным образом, потеря *PTEN* наблюдалась в обоих гистологических подтипах, хотя в целом она присутствовала в меньшем количестве в АК. Напротив, мутации *KRAS* были обнаружены исключительно в АК и не были связаны с различиями в выживаемости. Варианты *EGFR* были ограничены пациентами с ПР, что подтверждает гипотезу о молекулярных механизмах, специфичных для гистотипа, вовлеченных в патогенез РШМ (Wright et al., 2013). Молекулярные исследования

выявили несколько ассоциированных мутаций в нейроэндокринной карциноме (*PIK3CA*, *MYC*, *TP53*, *PTEN*, *ARID1A*, *KRAS*, *BRCA2*) и АК желудочного типа (*KRAS*, *ARID1A*, *PTEN*), которые могут служить молекулярными мишениями (Arango-Bravo et al., 2024).

### **1.5.1 Влияние генов-регуляторов иммунного ответа на предрасположенность к раку шейки матки**

Считается, что при персистирующей ВПЧ ВКР инфекции половых путей возникает хроническое воспаление с длительной продукцией провоспалительных цитокинов, что в свою очередь создает благоприятную среду для развития опухоли. Цитокины вырабатываются клетками иммунной системы в дополнение к опухолевым клеткам и, по-видимому, функционируют путем модуляции иммунной системы хозяина, что приводит к иммуносупрессивному ответу, а не к индукции эффективного защитного иммунного ответа, тем самым способствуя росту и прогрессированию опухоли (Alves et al., 2018).

Первые поиски генетической предрасположенности к РШМ были сосредоточены на генах *HLA* (Gimenes et al., 2014). Система человеческих лейкоцитарных антигенов (*HLA*) представляет собой высокополиморфное семейство генов, участвующих в иммунном ответе и отвечающих за идентификацию собственных и чужеродных антигенов (Madden et al., 2018). Изменения в активности продуктов генов *HLA* могут влиять на развитие РШМ посредством иммунологического контроля ВПЧ. Чанг Х. с соавторами показали, что *HLA-DQB1\*02*, \*03 и \*0603 достоверно ассоциированы со снижением риска РШМ, тогда как *DQB1\*05*, \*0301 и \*0402 напротив значительно повышают риск данного заболевания (Zhang et al., 2015). Позже Эспиноза Х. с соавторами в результате крупного мета-анализа выявили множественные *HLA-DRB1* аллели, ассоциированные с РШМ у женщин разного этнического происхождения: рисковыми проявили себя *DRB1\*09* и *DRB1\*15*, а *DRB1\*13* и оказывали проективное действие. Кроме того, варианты *HLA-DPB1\*0301*, *DPB1\*0402*, *DPB1\*1301*, rs9277535 и rs3117027 в гене *HLA-DP* достоверно ассоциированы с

РШМ (Espinoza H. et al., 2021). Коел М. с соавторами в результате крупнейшего метаанализа GWAS показали, что *HLA-DRB1\*1201* ( $p=1,2\times10^{-16}$ , ОШ=0,74(0,68–0,79)), *HLA-DRB1\*1301* ( $p=1,5\times10^{-11}$ , ОШ=0,82(0,78–0,87)), *HLA-DQB1\*0603* ( $p=1,2\times10^{-11}$ , ОШ=0,83(0,79–0,88)), *HLA-DQA1\*0103* ( $p=1,6\times10^{-11}$ , ОШ=0,83(0,79–0,88)), *HLA-DRB1\*0801* ( $p=2,2\times10^{-8}$ , ОШ=1,20(1,12–1,27)) и аллели *HLA-DQA1\*0401* ( $p=2,8\times10^{-8}$ , ОШ=1,19(1,12–1,27)) прошли порог значимости по всему геному. Эти результаты согласуются с предыдущими исследованиями РШМ: аллели *HLA-DRB1\*1301* и *DQB1\*0603* связаны с пониженным риском, и в более широком смысле, было показано, что гаплотип *HLA-DRB1\*1301–HLA-DQA1\*0103–HLA-DQB1\*0603* протективен для РШМ, а *HLA-DRB1\*0801* и *HLA-DQA1\*0401* находятся в сильном неравновесном сцеплении (LD) с *HLA-DQB1\*0402* ( $p=5,2\times10^{-8}$ ) и связаны, кроме того, с аутоиммунными заболеваниями, включая диабет 1 типа и системную красную волчанку (Koel M. et al., 2023).

Другое GWAS-исследование показало варианты восприимчивости к раку шейки матки в локусе *HLA* на хромосоме 6р21. rs17190106, rs1056429 и rs143954678/rs113937848 ассоциированы с цервикальными злокачественными новообразованиями в целом, тогда как rs17190106 и rs535777 ассоциированы конкретно с инвазивным ПР (ОШ=0,69, 95% CI=0,55-0,86,  $p=0,001$ ) или АК (ОШ=1,63, 95% CI=1,17-2,27,  $p=0,004$ ), соответственно (Eisenblätter et al., 2023). Таким образом, установлены ассоциации между *HLA* и ВПЧ-индуцированным развитием неоплазии. Наряду с аллелями, повышающими риск развития РШМ, были обнаружены и протективные аллели.

Женщины с более высокой продукцией IL-10 имеют повышенный риск дисплазии и РШМ, что подтверждено исследованиями на нескольких популяциях. На промоторную область гена *IL-10* приходится ряд значимых однонуклеотидных полиморфных вариантов, оказывающих влияние на экспрессию гена: rs1800896, rs1800871 и rs1800872. При этом гаплотип GCC ассоциирован с более высокой продукцией IL10 и предрасположенностью к цервикальному раку (Espinoza et al., 2021). Гупта с соавторами в исследовании на североиндийской популяции показали, что полиморфные варианты в промоторной части с.597A>G гена *IL-6* и

c.308G>A гена *TNF- $\alpha$*  показали значительную ассоциацию с РШМ ( $p<0,001$ ), в то время как комбинации однонуклеотидных замен GAT и GGT полиморфизмов *IL-6*-597A>G, *TNF- $\alpha$* -308G>A и *IL-1 $\beta$* -511C>T показали повышенный риск до 9,0 и 3,30 раз, соответственно (Gupta et al., 2016).

Toll-подобные рецепторы (TLR 3, 7, 8, 9 и 13) распознают нуклеиновые кислоты и индуцируют сигналы, контролирующие функцию нескольких типов иммунных клеток и инициируют врожденные и адаптивные иммунные реакции (Hamerman et al., 2024). Однонуклеотидный полиморфизм c.1486T>C гена *TLR9* был ассоциирован с риском развития РШМ (Yang et al., 2017). Полиморфизм c.+2848G>A гена *TLR9* влияет на механизм противовирусной защиты организма от таких типов ВПЧ, как ВПЧ 16, путем распознавания неметилированных CpG последовательностей ДНК, присутствующие в бактериальных и вирусных геномах. Белки E6 и E7 ВПЧ ингибируют экспрессию этого рецептора, тем самым оказывая негативное влияние на иммунный ответ (Pandey et al., 2019).

Для генотипа AA rs1801157 гена *CXCL12*, кодирующего антимикробный альфа-хемокин, были найдены независимые ассоциации с ВПЧ-инфекцией в аллельном распределении, кодоминантной, доминантной и рецессивной генетических моделях, а также с дисплазией и РШМ в кодоминантной и доминантной моделях. Для аллеля T rs2228014 гена *CXCR4* была показана ассоциация синфекцией ВПЧ в кодоминантной модели и аллельном распределении, а также дисплазией и РШМ в кодоминантной, доминантной и аллельной моделях. Показано, что наличие обоих полиморфизмов увеличивает восприимчивость к ВПЧ в 10,1 раза, увеличивает риск возникновения дисплазии в 2 раза, а РШМ в 4,2 раза (Okuyama et al., 2022).

## 1.5.2 Вклад генов-регуляторов клеточного цикла в развитие рака шейки матки

Не менее важную роль в канцерогенезе РШМ играют полиморфные варианты генов клеточного цикла. Мутации гена *TP53* являются распространенными генетическими событиями при большинстве видов рака, их эффект проявляется во влиянии на пролиферацию клеток, нарушению апоптотического механизма и часто приводят к генетической нестабильности. Эффект варианта p.Pro72Arg гена *TP53* при различных видах рака вызывает споры. Например, Стори и его коллеги показали, что вариант белка Arg72 в гомозиготном состоянии может увеличить в семь раз восприимчивость к РШМ, ассоцииированному с ВПЧ (Storey et al., 1998). Однако в чуть более позднем исследовании Ясутака Кавамата с соавторами показано, что уровень экспрессии белка p53 в нормальных человеческих кератиноцитах каждого генотипа кодона 72 *TP53* не были затронуты введением ВПЧ 16-Е6 из рекомбинантного аденоовируса, а мРНК p53 активируются независимо от генотипов *TP53*, когда экспрессируется ВПЧ 16-Е6. При статистическом анализе не было выявлено связи между генотипами *TP53* и развитием неоплазий шейки матки (Kawamata et al., 2002). Уго Соуза и соавторы, объединив и проанализировав литературные данные и мета-анализы заключили, что данный вариант по-разному сегрегируется в разных этнических и группах. Следовательно, возможная роль этого генетического варианта связана с определенным генетическим фоном, что может объяснить, почему некоторые исследования показывают повышенный риск развития рака шейки матки, связанный с вариантом аргинина *TP53* (Sousa et al., 2011). Орстед с коллегами показали, что полиморфный вариант p.Pro72Arg гена *TP53* влияет на продолжительность жизни и выживаемость пациентов с раком в общей популяции. Общая 12-летняя выживаемость была увеличена у носителей аминокислот Arg/Pro в 72 кодоне белка p53 на 3% ( $p=0,003$ ) и у гомозигот по варианту Pro/Pro на 6% ( $p=0,002$ ) по сравнению с гомозиготами вариантом Arg/Arg в белке p53, что соответствует увеличению медианы выживаемости на 3

года для гомозигот Pro/Pro по сравнению с Arg/Arg. Таким образом, замена p.Pro72Arg в белке p53 приводит к увеличению продолжительности жизни, но не к снижению риска рака (Orsted et al., 2011). Позднее на когорте пациенток с РШМ было доказано, что полиморфный вариант действительно влиял на общую выживаемость, поскольку у пациентов, несущих генотип *TP53* Arg/Pro, наблюдалось увеличение медианы выживаемости по сравнению с пациентами с генотипами *TP53* Arg/Arg и *TP53* Pro/Pro (126 месяцев против 111 месяцев соответственно; P=0,047) (Coelho et al., 2018).

Модуляция экспрессии генов *FAS* и *FASL* играет важную роль в контроле апоптоза и канцерогенезе. Полиморфный вариант гена *FAS* с.-671A>G может служить биомаркером для прогнозирования риска РШМ, однако существует ограничения в его применении в качестве биомаркера риска в других популяциях, кроме малайцев (Tan et al., 2017). Регуляторная область гена *FASL*, где происходит связывание факторов транскрипции C/EBP $\alpha$  и OCT1 имеет различное сродство при различных аллеях полиморфного варианта с.-844T>C, что приводит к подавлению активности гена *FASL* путем блокировки транскрипции. Этот механизм, предположительно, в конечном итоге приводит к развитию РШМ (Kedhari Sundaram et al., 2019).

Кроме того, у носителей мутаций зародышевой линии в гене *BRCA* были зарегистрированы повышенные риски развития рака в других локализациях, помимо груди и яичников. Было показано, что риск развития РШМ значительно повышен у женщин из семей с положительным статусом в генах *BRCA1* и *BRCA2* (RR=4,59, 95% ДИ=2,20–8,44 и RR=3,69, 95% ДИ=1,20–8,61; p<0,001) (Rhiem et al., 2007). По оценкам, заболеваемость РШМ была выше у носителей патологической мутации в одном из генов системы reparации неспаренных оснований MSI *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* или *PMS2* в 5,4 раза (95% ДИ 2,2–13,5; p>0,002) (Antill et al., 2010).

### 1.5.3 Варианты однонуклеотидных замен, выявленные в результате GWAS-исследований, которые ассоциированы с предрасположенностью к раку шейки матки

Благодаря технологическим достижениям в результате массового параллельного анализа миллионов вариантов по всему геному, за последнее десятилетие наблюдается определенный прогресс в изучении РШМ. Метод GWAS на сегодняшний день является одним из наиболее эффективных способов поиска генетических ассоциаций многофакториальных заболеваний.

Боуден с соавторами в начале 2021 года в результате исследования 4 769 образцов ДНК женщин с тяжелой дисплазией и инвазивным РШМ и 145 545 контрольных образцов в GWAS, проанализировав 9 600 464 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), определили 2 новых не-*HLA* замены: *PAX8* (rs10175462; p=0,015), *CLPTM1L* (rs27069; p=2,54 × 10<sup>7</sup>) (Bowden et al., 2021). Спустя полгода Рамачандран с соавторами предоставили результаты анализа вариантов восприимчивости к РШМ, полученные на основании данных недавних GWAS и метаанализа крупных когортных исследований.

Они предложили, что на хромосоме 2q14 ген *PAX8* (rs10175462, rs4849177), на 17q12 ген *GSDMB* (rs8067378) и на 5p15.33 ген *CLPTM1L* (rs27069) являются последовательно реплицируемыми локусами восприимчивости к РШМ, не относящимися к *HLA*-региону (Ramachandran et al., 2021). В результате полногеномного исследования ассоциаций в выборке из 9 229 случаев РШМ и 490 304 контролей в разных популяционных группах было выявлено 5 однонуклеотидных замен в генах вне *HLA*: *PAX8/PAX8-AS1* (rs4849177), *LINC00339* (rs3768579), *CDC42* (rs2268177), *CLPTM1L* (rs27069) и *GSDMB* (rs11078928) (Koel et al., 2023).

Фактор транскрипции *PAX8*, представитель парного семейства генов, играет ключевую роль в эмбриогенезе почек, щитовидной железы и нервной системы. Он описан как важный биомаркер опухолей щитовидной железы, паращитовидных желез, почек и тимуса. РШМ также часто характеризуется положительной экспрессией *PAX8*. Изоформы *PAX8* обладают различной

трансактивационной активностью, что делает их не только полезными диагностическими маркерами, но и потенциальными участниками регуляторных процессов, вовлечённых в канцерогенез (Lopez-Urrutia et al., 2016).

Антисмысловая РНК *PAX8-AS1*, предполагаемый регулятор экспрессии *PAX8*, содержит специфические однонуклеотидные полиморфизмы, которые могут являться экспрессионными количественными локусами (eQTL) для *PAX8*. Логистический регрессионный анализ показал, что вариантный аллель T rs4848320 (рецессивная модель: скорректированный ОШ=0,61; 95% ДИ=0,38-0,97; p=0,027) и аллель G rs1110839 (аддитивная модель: скорректированный ОШ=0,88; 95% ДИ=0,79-0,99; p=0,032) ассоциированы со снижением риска РШМ (Han et al., 2016).

Рашкин с коллегами впервые провели GWAS-исследование, комплексно оценив наследуемость и плейотропию для 18 типов рака в двух крупных когортах:

UK Biobank – 408 786 контролей и 48 961 образец пациентов европейского происхождения;

Kaiser Permanente Genetic Cohort – 66 526 контролей и 16 001 случай рака.

В результате было установлено, что вариант rs10175462 гена *PAX8* на 2q13 стал первой однонуклеотидной заменой за пределами HLA-региона, продемонстрировавшей полногеномно значимую ассоциацию с риском РШМ в европейской популяции (ОШ = 1,15; p =  $7,71 \times 10^{-14}$ ) (Rashkin et al., 2020).

Позднее Рамачандран и Ван с соавторами подтвердили ассоциацию rs10175462 в немецкой выборке, включавшей 1 122 случая инвазивного РШМ, 1 384 случая дисплазии шейки матки и 1 483 контроля. Было показано, что минорный аллель снижает риск развития РШМ примерно на 20% (ОШ=0,82; 95% ДИ=0,74-0,91; p= $2,4 \times 10^{-4}$ ), а также риск инвазивного плоскоклеточного рака (ОШ=0,80; 95% ДИ=0,68-0,94; p=0,006). Анализ экспрессии в образцах шейки матки показал, что транскрипты *PAX8* активируются в ВПЧ-положительных образцах (p=0,008), однако этот эффект отсутствовал при наличии протективного минорного аллеля rs10175462 (Ramachandran et al., 2021).

По данным Коэля и коллег, значимый вариант rs4849177 расположен в инtronной области гена *PAX8*. Локус, выявленный в GWAS, колокализуется с экспрессией *PAX8* и его потенциального регулятора *PAX8-AS1* в ряде типов тканей и клеток. Один из достоверных вариантов гаплотипного набора, rs1015753, перекрывается с фланкирующей областью сайта инициации транскрипции (TSS) в клетках HeLa (Koel et al., 2023).

Клеточная линия HeLa, полученная более 70 лет назад из агрессивного РШМ у молодой женщины, стала первой стабильной линией человеческих раковых клеток и с момента своего происхождения служит важнейшей моделью для исследования РШМ (Masters, 2002).

Белок CLPTM1L/CRR9 (белок 9, связанный с устойчивостью к цисплатину) является цитопротекторным онкофетальным белком, локализующимся на поверхности опухолевых клеток. CLPTM1L широко экспрессируется и накапливается в плазматической мембране опухолевых клеток яичников, тогда как в нормальных тканях его экспрессия минимальна или отсутствует (Parashar et al., 2021). По данным комплекса экспериментальных исследований, высокая экспрессия CLPTM1L может способствовать неблагоприятному прогнозу и повышать инвазивный, пролиферативный и миграционный потенциал плоскоклеточного рака полости рта (Hou et al., 2021).

CLPTM1L, выступая в качестве коактиватора рецептора эстрогена ER $\beta$ , усиливает транскрипцию его генов-мишеней и индуцирует радиорезистентность клеток немелкоклеточного рака лёгких, что позволяет рассматривать данный белок как перспективную терапевтическую мишень для повышения радиосенсибилизации (Li et al., 2021). Связь CLPTM1L с онкологическими заболеваниями слизистых оболочек, вызванными ВПЧ, предполагает его участие в регуляции передачи вируса через эпителиальные барьеры.

Исследования моноклональных антител против CLPTM1L при химиорезистентных формах рака лёгкого и поджелудочной железы также подтверждают его значение как потенциальной мишени для терапии различных

опухолей, особенно с учётом роли этого белка в механизмах апоптоза, индуцированного цисплатином, при его сверхэкспрессии (Bowden et al., 2021).

Примерно в 50 т.п.н. от локуса *CLPTM1L* расположен ген *TERT*, кодирующий каталитическую субъединицу теломеразы человека. Локус *CLPTM1L-TERT* ассоциирован с риском развития ряда гинекологических опухолей, однако функциональная роль варианта и его вклад в патогенез РШМ остаются недостаточно изученными. SNP rs27069, расположенный в координате 5:1 347 013 (GRCh38), находится приблизительно в 10 т.п.н. выше *CLPTM1L*. По данным метаанализа, данный локус продемонстрировал значимую ассоциацию с риском РШМ в европейской популяции ( $p = 6,1 \times 10^{-15}$ ), а также в смешанных выборках ( $p = 1,3 \times 10^{-14}$ ) (Koel et al., 2023).

Продуктами гена *GSDMB* (гасдермина В) являются четыре изоформы, GSDMB1-4. Показано, что *GSDMB* может быть вовлечён в развитие и прогрессирование РШМ (Sun et al., 2008). Поскольку *GSDMB* участвует в пироптозе и регуляции продукции воспалительных цитокинов, его высокая экспрессия была обнаружена в воспалительных и предраковых поражениях шейки матки (Li et al., 2023).

Лутковска с соавторами показали, что полиморфизм rs8067378 гена *GSDMB* может выступать фактором риска цервикального канцерогенеза (Lutkowska et al., 2017). При сравнении частот генотипов и аллелей rs8067378 между группой пациенток с интраэпителиальной неоплазией и контролем отмечены статистически значимые различия ( $p=0,05$  и  $p=0,02$  соответственно). Логистический регрессионный анализ после корректировки по возрасту показал, что rs8067378 ассоциирован со сниженным риском цервикальной неоплазии в доминантной ( $p=0,02$ ; ОШ=0,764; 95% ДИ=0,607–0,961) и аддитивной ( $p=0,02$ ; ОШ=0,814; 95% ДИ=0,684–0,968) моделях, а его минорный аллель G может быть вовлечён в прогрессию нормального эпителия до LSIL и HSIL. Однако значимых ассоциаций данного варианта с инвазивным РШМ выявлено не было ( $p>0,05$ ) (Li et al., 2023).

По данным крупного метаанализа GWAS (Koel et al., 2023), наиболее значимый локус на хромосоме 17 – rs12603332, находится в тесном неравновесном сцеплении (LD,  $r^2 > 0,8$ ) с акцепторным сплайсинговым вариантом rs11078928 гена *GSDMB*. Последний приводит к удалению экзона 6, кодирующего 13 аминокислот в критической N-концевой области, что устраняет пироптическую активность белка GSDMB.

Белок CDC42 – ключевой член семейства малых GTPаз Rho – участвует в регуляции клеточной полярности, цитоскелета и клеточного цикла. Высокая экспрессия *CDC42* коррелирует с клинической стадией РШМ, что указывает на его возможную роль в прогрессировании плоскоклеточной карциномы (Ma et al., 2015). Сверхэкспрессия CDC42 усиливает миграцию клеток РШМ, вероятно, за счёт усиленного формирования псевдоподий (Ye et al., 2015). Индуцируемая модель клонов эпителиальной линии HeLa показала, что DOCK10 функционирует как фактор обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) для CDC42 и Rac1, индуцируя образование филоподий и складок плазматической мембраны (Ruiz-Lafuente et al., 2021).

Основной генетический вариант 1p36.12 (rs2268177) расположен в инtronной области гена *CDC42*, ниже гена *WNT4*. Анализ колокализации показал, что этот локус колокализуется с экспрессией *CDC42*, *CDC42-AS1* и *LINC00339* (длинной межгенной некодирующей РНК) в различных тканях и типах клеток. Вариант rs2473290 (в интроне *CDC42-AS1*) объясняет основную часть общей ассоциации (апостериорная вероятность включения 0,95-0,99).

Другие значимые SNP располагаются в ключевых регуляторных регионах: rs3768579 и rs3754496 – в области промотора *LINC00339* и *CDC42*; rs72665317 и rs10917128 – в участках с признаками энхансерной активности в клетках HeLa. *LINC00339* известен как промотор пролиферации различных типов опухолей, а *CDC42* связан с инвазией и миграцией клеток РШМ (Koel et al., 2023).

### **1.5.4 Роль секвенирования нового поколения в изучении молекулярных основ рака шейки матки**

Помимо интеграции ВПЧ в геном, мутации в соматических клетках хозяина являются важным компонентом ВПЧ-индуцированного канцерогенеза. Анализ мутаций ДНК играет ключевую роль в выявлении молекулярно-генетических различий между опухолевой и нормальной тканью. Применение секвенирования нового поколения (NGS), позволяющего анализировать большие объёмы последовательностей ДНК и выявлять как известные, так и ранее не описанные генетические изменения, значительно расширило понимание соматического ландшафта РШМ.

Показано, что генами с наибольшей частотой соматических мутаций являются *PIK3CA* (31,3% опухолей), *KRAS* (8,8%) и *EGFR* (3,8%). Мутации *PIK3CA* были преимущественно активирующими и локализованы в «горячих точках» спирального домена экзона 9 (E545K и E542K); при этом 3,8% опухолей содержали двойные мутации в этом домене. Примечательно, что мутации в каталитическом домене экзона 20 (H1047R) *PIK3CA* обнаружены не были. Мутации в *KRAS* представляли собой классические миссенс-варианты G12 и G13 в домене гуанин-нуклеотидного обмена (GEF) (Wright et al., 2013).

Соматические мутации в плоскоклеточных карциномах включали повторяющиеся варианты E322K в *MAPK1* (8%), инактивирующие мутации в *HLA-B* (9%), а также изменения в *EP300* (16%), *FBXW7* (15%), *NFE2L2* (4%), *TP53* (5%) и *ERBB2* (6%). Для аденокарцином были характерны соматические мутации *ELF3* (13%) и *CBFB* (8%) (Wright et al., 2013).

Часто мутирующие гены при РШМ включают *PIK3CA*, *KMT2D* и *KMT2C*. Частота мутаций *PIK3CA* была значительно выше при плоскоклеточном раке (ПР), чем при аденокарциноме (АК) ( $p=0,004$ ). Независимыми предикторами высокой опухолевой мутационной нагрузки являлись мутации *KMT2C* и *LRP1B* ( $p<0,05$ ). Также установлено, что мутации *PTEN* ассоциированы с худшей выживаемостью (Liu et al., 2022).

Мультиплатформенная интеграция продемонстрировала широкий спектр соматических мутаций при РШМ. Десять наиболее часто мутирующих генов включали *TTN*, *PIK3CA*, *MUC4*, *KMT2C*, *MUC16*, *KMT2D*, *SYNE1*, *FLG*, *DST* и *EP300* с частотой от 12 до 33%. Анализ вариаций числа копий (CNV) с использованием модуля GISTIC выявил наиболее частые делеции в 4р, 11р и 11q и амплификации в 20q, 3q и 1q. Неконтролируемая консенсусная кластеризация CNV-профилей и профилей метилирования выделила четыре статистически значимых подтипа экспрессии. Интеграция многомерных данных позволила идентифицировать 10 потенциальных генов-драйверов: *GPR107*, *CHRNA5*, *ZBTB20*, *RB1*, *NCAPH2*, *SCA1*, *SLC25A5*, *RBPMS*, *DDX3X* и *H2BFM* (Xu et al., 2022).

Помимо исследования соматического ландшафта, одной из важных прикладных задач применения NGS является анализ герминальных вариантов у пациентов с РШМ. В последние годы было проведено несколько исследований, направленных на выявление герминальных замен, которые могут способствовать развитию заболевания или влиять на его течение.

Данные зародышевой линии The Cancer Genome Atlas показали, что варианты в генах восприимчивости к раку встречаются при атипичных формах намного чаще, чем предполагалось ранее (Bertelsen et al., 2019).

В исследовании Цю Л. и соавторов, включавшем 32 образца опухолевой ткани и 32 образца крови у 32 пациенток с РШМ, при использовании мультигенной панели из 571 гена было выявлено 810 соматических вариантов, 2730 вариантов зародышевой линии и 701 CNV. Наиболее часто мутировавшими генами оказались *FAT1*, *HLA-B*, *PIK3CA*, *MTOR*, *KMT2D* и *ZFHX3*. Локусы *PIK3CA*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* и *TP53* демонстрировали повышенную частоту CNV.

Роль *PIK3CA* была подтверждена сравнением данных с базой ONCOKB: мутации E545K и E542K ранее были описаны как факторы радиорезистентности РШМ. Анализ потенциальных терапевтических мишней показал, что пациентки с РШМ могут получать клиническую пользу от ингибиторов PARP – препаратов,

блокирующих ферменты поли(АДФ-рибоза)-полимеразы, участвующие в репарации ДНК. Их ингибиование приводит к накоплению критических повреждений ДНК и гибели опухолевых клеток (Qiu et al., 2022).

Исследование частоты патогенных и вероятно патогенных вариантов в 62 генах предрасположенности к раку, проведённое Хао Вэнь с соавторами в китайской популяции, показало, что распространённость таких вариантов составила 6,4% (23 из 358 пациенток) при РШМ (Qiu et al., 2022).

### **1.5.5 Эпигенетические механизмы развития рака шейки матки**

Эпигенетическим механизмам развития онкологических заболеваний в настоящее время уделяется значительное внимание. На всех стадиях прогрессирования РШМ, как в генах клеток хозяина, так и в генах ВПЧ, происходят эпигенетические изменения, включая гипо- и гиперметилирование ДНК, модификации гистонов и другие процессы. Метилирование ДНК при неоплазии шейки матки представляет собой ключевой эпигенетический механизм ВПЧ-индуцированного канцерогенеза: ковалентное присоединение метильной группы (-CH<sub>3</sub>) к цитозину ДНК приводит к формированию СрG-динуклеотидов (Allemani et al., 2015). СрG-мотивы могут концентрироваться в участках, богатых цитозином и гуанином, преимущественно локализованных в промоторных областях генов (Bird, 1986).

В процессе злокачественной трансформации локальное гиперметилирование промоторных СрG-островков генов-супрессоров опухолевого роста приводит к снижению их экспрессии (Tanaka et al., 2015). Как отмечалось ранее, паттерны метилирования СрG-участков обладают потенциалом для улучшения дифференциальной диагностики высокодифференцированных аномалий шейки матки (Bukowski et al., 2024), а также рассматриваются как перспективная основа для разработки генной терапии РШМ (Singh et al., 2021).

Опухоли с фенотипом СIMP (CpG Island Methylator Phenotype) характеризуются одновременным гиперметилированием нескольких генов, участвующих в клеточной трансформации, пролиферации, миграции –

ключевых процессах канцерогенеза. Высокий уровень СИМР ассоциирован с развитием тяжёлой дисплазии и РШМ при инфицировании ВПЧ высокого канцерогенного риска. Гены *SOX17*, *MAGI2*, *AJAP1*, *MYOD1*, *MGMT* и *CDH1*, подвергающиеся аномальному метилированию, рассматриваются как потенциальные биомаркеры данных патологий (Loaeza-Loaeza et al., 2022).

Онкобелок E7 способен взаимодействовать с ДНК-метилтрансферазой I и индуцировать гиперметилирование генов-супрессоров, таких как *CCNA1*, что приводит к снижению их экспрессии и способствует прогрессированию рака. Сверхэкспрессия E7 также повышает уровни метилирования *CGB3* и *NOP56* в клеточных линиях РШМ, что сопровождается подавлением их экспрессии (Singh et al., 2022).

Как отмечалось выше, клинически значимое метилирование промоторов *FAM19A4/miR124-2* используется в качестве триажа для женщин с положительным тестом на ВПЧ с целью оценки риска развития рака, особенно adenокарциномы (Lindroth et al., 2022). Диагностически перспективным также является определение уровня метилирования генов *MRVII* и *NTRK3*, экспрессия которых отрицательно коррелирует со степенью метилирования их промоторных CpG-областей. Повышенные уровни метилирования *MRVII* и *NTRK3* были подтверждены в опухолевых тканях методом пиросеквенирования (Ji et al., 2022).

Наряду с эпигенетическими изменениями генов хозяина, значительную роль в канцерогенезе играет метилирование генома ВПЧ. Гиперметилирование CpG-островков в длинной контрольной области (LCR) генома вируса регулирует экспрессию онкогенов *E6* и *E7* и связано с прогрессированием опухолевого процесса. Более высокий уровень метилирования CpG-сайтов в промоторе *E6/E7* выявлен в плоскоклеточном раке шейки матки по сравнению с LSIL и HSIL (Ding et al., 2009). В другом исследовании полногеномного пиросеквенирования ВПЧ типов 18, 31 и 45 установлено значительное повышение уровней метилирования в областях *E2*, *L1* и *L2* при тяжёлой цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN III) по сравнению с транзиторной инфекцией (Wentzensen et al., 2009).

Ещё одним важным эпигенетическим механизмом являются посттрансляционные модификации гистонов, включающие ацетилирование, пропионилирование, бутирилирование, малонилирование и сукцинилирование, среди которых наиболее изучено ацетилирование лизиновых остатков. Нарушение регуляции ацетилирования гистонов – значимое эпигенетическое событие, тесно связанное с основными патологическими процессами, включая канцерогенез. Дисбаланс ацетилирования способствует опухолеобразованию, приводя к инактивации генов-супрессоров и активации онкогенных путей (Pan et al., 2024).

Гены ВПЧ влияют на модификации хроматина множеством механизмов. В частности, активация онкобелков E6 и E7 индуцирует ацетилирование гистона H3K9, что может приводить к подавлению экспрессии отдельных генов. Таким образом, эти онкогены прямо и косвенно воздействуют на апоптоз, пролиферацию и рост клеток, что способствует злокачественной трансформации (Lourenco de Freitas et al., 2021).

Гистонацетилтрансфераза CSRP2BP участвует в эпителиально-мезенхимальном переходе и способствует метастазированию РШМ. В связи с этим предполагается, что CSRP2BP может служить прогностическим маркером и перспективной терапевтической мишенью (Yang et al., 2021).

Недавние данные выявили эпигенетический механизм, посредством которого метформин – сахароснижающее средство класса бигуанидов, широко применяемое для лечения сахарного диабета 2-го типа – подавляет пролиферацию клеток РШМ *in vitro* и *in vivo*. Метформин, действуя как агонист АМФ-активируемой протеинкиназы (AMPK), активирует её, что приводит к ацетилированию H3K9 и ремоделированию хроматина. Это, в свою очередь, усиливает связывание H3K9 с промоторными областями большого числа генов-супрессоров, стимулируя их транскрипцию. Более того, отсутствие лизиновой ацетилтрансферазы 2B (PCAF) делает невозможным индуцированное AMPK ацетилирование H3K9 (Pan et al., 2024).

Некодирующие РНК (нкРНК) представляют собой класс РНК, которые не кодируют белки, но составляют значительную часть транскриптома человека. К ним относятся длинные некодирующие РНК (lncRNA), микроРНК (miRNA), циркулярные РНК (circRNA) и другие виды. Дезрегуляция lncRNA, miRNA и circRNA вовлечена в онкогенез и прогрессирование рака шейки матки, выступая как онкогенными драйверами, так и опухолевыми супрессорами (Zheng et al., 2022).

Кластеры miRNA, включающие несколько генов, кодирующих микроРНК, играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов. Их активность контролируется различными факторами, включая циркулярные РНК и ДНК-метилирование. Нарушение регуляции кластеров miRNA тесно связано с развитием РШМ и способствует формированию характерных черт опухолевого фенотипа (Sriharikrishnaa et al., 2024).

Учитывая, что значительная часть генов человека регулируется miRNA, полиморфизм сайтов связывания микроРНК может существенно влиять на патогенез заболевания, включая иммунный ответ хозяина на ВПЧ-инфекцию (Espinoza et al., 2021).

Ряд полиморфных вариантов miRNA был ассоциирован с персистенцией ВПЧ, предраковыми изменениями и РШМ. Недавний метаанализ шести исследований установил связь варианта rs531564 (*miR-124*) с повышенным риском РШМ (Liu et al., 2021).

MiR-377-5p рассматривается как опухолевый супрессор при ряде злокачественных новообразований. В тканях и клеточных линиях РШМ отмечено снижение экспрессии miR-377-5p, а низкий её уровень ассоциирован с неблагоприятным прогнозом (Wang et al., 2023).

Длинные некодирующие РНК также играют важную регуляторную роль в канцерогенезе. *LINC00858* – недавно обнаруженная lncRNA длиной 2685 нуклеотидов – характеризуется аномально высокой экспрессией в различных злокачественных опухолях, включая РШМ (Zhang et al., 2021).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы исследования

Материалом исследования послужили образцы соскоба эпителиальных клеток шейки матки 28 928 женщин в возрасте 30-39 лет, обследованных в рамках пилотного проекта по скринингу рака шейки матки (2019 г.) с применением ВПЧ-тестирования (Digene HPV Test, Hybrid Capture Technology, Qiagen, США) (Минниахметов и др., 2020). Для качественного определения типов вируса в соскобе шейки матки были использованы образцы 219 женщин, случайно отобранных из положительных проб, обследованных в рамках пилотного проекта. Для выделения группы женщин, не предрасположенных к персистенции ВПЧ и РШМ, было обследовано 70 женщин, повторно приглашенных на прием спустя 2-4 года после положительного результата Digene HPV-теста, с целью фиксации элиминации вируса, с последующим выделением их герминальной ДНК из лимфоцитов периферической крови и выделением ДНК папилломавирусной инфекции из соскоба шейки матки. Информация о цитологическом и гистологическом исследовании была взята из медицинских карт пациенток.

В исследовании использовалась герминальная ДНК 495 женщин: 111 пациенток с клиническим диагнозом РШМ, 51 с зафиксированной элиминацией ВПЧ, 333 условно-здоровых женщин. ДНК 19 женщин, у которых была зафиксирована персистенция ВПЧ в течении 2-4 лет, представляет группу риска и была исключена из исследования, т.к. неясно приведет данная персистенция к неоплазии или нет. Женщины в выборке представляют три наиболее распространенные на территории Республики Башкортостан этнические группы: русские, татары и башкиры.

Выборка из 111 женщин с клиническим диагнозом РШМ представлена индивидами, не состоящих в кровном родстве, проживающих в Республике Башкортостан. Обследование, окончательная постановка диагноза и лечение пациенток проводились на базе Государственного автономного учреждения здравоохранения «Республиканский клинический онкологический диспансер»

Министерства здравоохранения Республики Башкортостан. Выборка состоит из женщин 1951-1994 годов рождения, средний возраст которых составил 50 лет. Основной сбор биоматериала происходил с конца 2020 до начала 2022 года. ВПЧ статус основного числа пациенток неизвестен, т.к. по умолчанию считается положительным и не влияет на подход к терапии. Выбор метода лечения РШМ определялся индивидуально и зависел от распространенности опухолевого процесса и тяжести сопутствующей соматической патологии. Лечение проводилось согласно действующим клиническим рекомендациям. По гистологическому типу большинство женщин в исследуемой выборке с плоскоклеточной карциномой (89,1%), аденокарциномы, в том числе муцинозные опухоли, составили 7,92%, аденоактиномозный РМШ – 0,99%, апластический РШМ – 0,99% и лейомиосаркома – 0,99%, с различной степенью дифференцировки, стадией заболевания от *in situ* до метастатической.

Группа сравнения представлена 51 женщиной с зафиксированной элиминацией ВПЧ. Сам факт элиминации вируса означает, что организм самостоятельно справился с инфекцией, таким образом ее носитель не предрасположен к персистенции ВПЧ, а значит и к ВПЧ-зависимому РШМ. В случае выявления ассоциации или тенденции к ассоциации с признаком и генетическим маркером между группами сравнения мы расширяли группу здоровых пациентов при помощи ДНК 333 женщин без РШМ с целью увеличения мощности исследования.

Для дополнительного исследования так же было использовано соматическое ДНК опухолевой ткани 2 пациенток с выявленными патогенными герминальными заменами в системе генов dMMR и для 2 пациенток с заменами неясной клинической значимости.

## 2.2 Выделение ДНК

### 2.2.1 Выделение ДНК из соскобов с шейки матки

Экстракция ДНК из соскоба эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса) для последующего анализа методом полимеразной цепной реакции была проведена при помощи набора «Ампли Прайм РИБО-преп» («НекстБио», Москва, Россия). В основе методики лежит осаждение нуклеиновых кислот изопропанолом и их экстракция в раствор, которым предшествует лизис эпителия шейки матки по средствам хаотропного агента (гуанидинтиоцианат).

Для выделения ДНК одной пробы в одноразовую промаркованную пластиковую пробирку на 1,5 мл типа эппendorф вносили 10 мкл «ВКО» (внутренний контрольный образец) и 300 мкл раствора для лизиса. После этого с использованием наконечников с фильтром в смесь «ВКО» и раствора для лизиса вносили хорошо ресуспензированная проба, представляющая из себя взятый гинекологом образец эпителиальных клеток цервикального канала, находящийся в транспортной среде. Кроме того, с целью контроля выделения, добавляли в 2 эппендорфа со смесью «ВКО» и раствора для лизиса контрольные образцы: в пробирку отрицательного контроля выделения вносили 100 мкл «ОКО» (отрицательный контрольный образец), а в пробирку положительного контроля выделения - 90 мкл «ОКО» и 10 мкл «ПКО» (положительный контрольный образец). После этого прогревали образцы при 65°C течение 5 минут, предварительно перемешав их на вортексе и сбросив капли жидкости с крышки на микроцентрефуге около 5 секунд. После данной манипуляции добавляли по 400 мкл раствора для преципитации, после чего перемешивали смесь на вортексе. Далее, после пятиминутного центрифугирования образцов при 13000 об/мин, отбирали надосадочную жидкость индивидуальным наконечником для каждого образца и добавляли в пробирки по 500 мкл «раствора для отмычки 3», осторожно промывали осадок, переворачивая плотно закрытые эппендорфы 3-5 раз. Далее с использованием индивидуального наконечника, отбирали 10 мкл надосадочной

жидкости каждой пробы, предварительно процентрифутировав их на 13000 об/мин в течение 1-2 минут. После добавления в эпендорфы по 200 мкл «раствора для отмыки 4», осторожно промывали осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Далее с использованием индивидуального наконечника, отбирали 10 мкл надосадочной жидкости каждой пробы, предварительно процентрифутировав их на 13000 об/мин в течении 1-2 минут. На следующем этапе, с целью подсушивания осадка, образцы с открытыми крышками помещали на 5 минут в термостат при температуре 65°C, после чего добавляли по 50 мкл «РНК-буфера» с последующим перемешиванием на вортексе. Далее помещали пробирки в термостат на 5 минут при температуре 65 °C. После проделанных манипуляций, для получения надосадочной жидкости, содержащей ДНК и РНК, образцы центрифутировали в течение 1 минуты при 13000 об/мин.

### **2.2.2 Выделение геномной ДНК**

Для проведения исследования геномная ДНК пациентов и контрольной группы была выделена из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции по Метью (Mathew, 1984). Забор венозной крови проводился в вакутейнеры с консервантом К3ЭДТА объемом 2 мл. После забора, с целью предотвращения свертывания крови, вакутейнер перемешивали путем переворачивания 3-5 раз, с последующем хранением до выделения. Процесс выделения ДНК начался с переноса всего объема биоматериала в стерильную пробирку объемом 40 мл с добавлением 30 мл охлажденного лизирующего буфера, в состав которого входило 320 mM сахарозы, 1% тритон X-100, 5 mM MDBP12, 10 mMTris-HCl и pH 7,6. После данной манипуляции смесь центрифутировали 20 минут на центрифуге с охлаждением при -20°C и 4000 об./мин. По завершении центрифугирования надосадочную жидкость осторожно сливали, а к осадку снова добавляли 20 мл лизирующего буфера и центрифутировали при тех же условиях в течение 10 мин. После этого надосадочная жидкость сливалась, а осадок переносился в чистый эпендорф объемом 2 мл с добавлением 800 мкл буфера Saline ЭДТА, в состав которого входили 25 mM ЭДТА, pH 8,0 и 75 mMNaCl, 80

мкл 10% SDS, 40 мкл протеиназы К (10мг/мл). Следующим этапом была инкубация данной смеси при 37°C в течении 12-16 часов. Экстракция ДНК проводилась на следующий день с добавления забуференного фенола, состоящего из 200 мкл меркаптоэтанола и 50 мл фенола-Трис-HCl с pH 7,8. 800 мкл данного раствора смешивали с лизатом до образования однородной массы в течении 10 минут с помощью устройства для перемешивания проб, с последующим центрифугированием в течении 10 минут при 10000 об/мин. После этого супернатант переносили индивидуальным наконечником в новый эплендорф с добавлением 400 мкл забуференного фенола и 400 мкл хлороформа-изоамилового, состоящего из смеси 2 мл изоамилового спирта на 48 мл хлороформа, с последующим 10 минутным перемешиванием до однородной массы и 10 минутным центрифугированием при 10000 об/мин. После проделанных манипуляций супернатант переносили в чистый эплендорф с добавлением 1000 мкл хлороформа-изоамилового спирта с последующим 5 минутным перемешиванием и 5 минутным центрифугированием при 5000 об/мин. Далее, из полученного супернатанта проводили осаждение ДНК путем промывки охлажденным 70% спиртом и последующим и 2x кратной промывкой 96% спиртом. Полученную ДНК после удаления спирта подсушивали на воздухе и растворяли в деионизированной воде.

### **2.2.3 Выделение ДНК из парафиновых блоков FFPE**

Для выделения ДНК из опухолевых клеток были использованы образцы ткани РШМ, фиксированные в 10% нейтральном формалине в течении 24-72 часов и залитые в парафин набор для выделения и очистки ДНК из образцов FFPE «Extract DNA FFPE» (Евроген, Москва, Россия). 3-6 тонких срезов толщиной 4-6 мкр помещали в 1,5 мл эплендорф и добавляли 100 мкл «Раствора ДПП» с последующем перемешиванием микропробирки на вортексе в течении 3 сек и инкубацией в термостате час при +56°C. По прошествии времени повторно перемешивали пробу на вортексе и помещали в термостат на час при +90°C. После в пробирку вносили 100 мкл «Лизирующего раствора М», перемешивали на

вортоксе и сбрасывали капли с крышки при помощи 5 сек короткого центрифугирования пробирки на микроцентрефуге. Далее после инкубации образца при +98°C 2 минуты и последующего 2х минутного центрифугирования при 10000 об/мин, его помещали в холодильник при +4 °C на 5 минут. После охлаждения в пробирке был виден осадок, полупрозрачная надосадочная жидкость, содержащая ДНК, и плотное кольцо из застывшего парафина. Далее чистым наконечником отбирали 180 мкл жидкости, не захватывая осадок и парафин, и помещали в новую пробирку объемом 1,5 мл, с последующей инкубацией в термостате при +56 °C в течение 30 мин. Далее к супернатанту добавляли 200 мкл 96 % этилового спирта и перемешивали на вортоксе. Следующим шагом было добавление 400 мкл «Связывающего раствора М» и перемешивание смеси до гомогенного состояния. Далее в чистую собирательную пробирку помещали колонку и аккуратно вносили в нее 760 мкл раствора, содержащего ДНК с последующим центрифугированием в течении 30 сек. В отцентрифужированную колонку после помещения в новую собирательную пробирку добавляли 700 мкл «Промывочного раствора» с последующим 30 секундным центрифугированием. После чего повторяли последнюю манипуляцию с новой собирательной пробиркой. Далее мы центрифугировали колонку в собирательной пробирке 2 минуты с целью полного удаления «Промывочного раствора» с последующим переносом колонки в чистую пробирку на 1,5 мл. Для испарения остатка спиртов колонку с открытой крышкой оставляли при комнатной температуре на 5 мин. После чего в центр мембранны колонки вносили 100 мкл предварительно прогретого «Элюирующего раствора» с последующей 3х минутной инкубацией колонки с закрытой крышкой при комнатной температуре. После минутного центрифугирования пробирке на дне будет готовая к использованию очищенная ДНК.

## 2.3 Определение ДНК вируса папилломы человека

### 2.3.1 ВПЧ-digene-тест

ВПЧ-digene-тест (Digene, QIAGEN, Германия), называемый так же методом гибридного захвата, представляет собой технологию Hybrid Capture 2 (извлечения гибридных молекул РНК:ДНК из раствора избирательным связыванием с антителами на микропланшете) в сочетании с иммуноферментным умножением сигнала и последующей регистрацией хемилюминесценции. Образцы, содержащие вирусную ВПЧ-ДНК, гибридизуют со смесью специфичных РНК-копий ВПЧ-генома (РНК-зонды для нескольких типов вируса папилломы). Получающиеся в результате гибридные молекулы РНК:ДНК избирательно связываются на поверхности микролуночного планшета, покрытой антителами, специальными к этим гибридам (анти-РНК:ДНК). Затем с иммобилизованными гибридами взаимодействуют вносимые в лунки специфичные анти-РНК-ДНК, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Количество связавшегося в лунках ферmenta определяют с помощью добавления хемилюминесцентного ферментного субстрата. Так как в конъюгате на одну молекулу иммуноглобулина приходится несколько молекул щелочной фосфатазы, одна избирательно выделенная из инкубационной смеси гибридная РНК:ДНК-молекула оказывается в комплексе с несколькими молекулами ферmenta. Благодаря этому ускоряется разрушение хемилюминесцентного субстрата, что дает очень хорошее усиление испускаемого светового сигнала. В качестве материала использовали соскоб из шейки матки, полученный с помощью цервикальной щётки во флаконы (виалы) (Digene cervical sampler) с консервирующей средой. В работе использовали набор реагентов digene HC2 High-Risk HPV DNA Test производства QIAGEN GmbH (Германия) для обнаружения *in vitro* 13 типов вируса высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) с определением суммарной вирусной нагрузки. Интенсивность свечения измеряли на люминометре и она была выражена в условных единицах свечения (Relative Light Units=RLU). На присутствие ДНК-ВПЧ в образце указывали результаты анализа (выраженные в

RLU), эквивалентные величине порогового контроля (Cut off Value=COV) или превышающие ее. Величины RLU ниже COV свидетельствовали либо об отсутствии в образце специфических ДНК ВПЧ, либо о таком количестве молекул ДНК, которое не превышает порога чувствительности метода. Уровень COV соответствует следующей концентрации ВПЧ = 1 пг/мл или 105 копий/мл или 5000 копий/тест. При величине отношения RLU/COV  $\geq 1,0$  образцы считались позитивными, при величине отношения RLU/COV  $< 1,0$ , образцы считались негативными. Анализ проводили в три этапа: пробоподготовка, непосредственно анализ и детекция методом Hybrid Capture.

Пробоподготовка образцов для теста включает проведение денатурации анализируемых и контрольных образцов денатурирующим реагентом и проводилась каждый раз непосредственно перед проведением анализа. Перед началом работы заранее за 1 час включали водяную баню на 65 °С и за 15-30 мин доставали пробирки холодильника с образцами и необходимые реагенты. Помещали в штатив для образцов пробирки с контролями и образцами в том же порядке, в котором их тестировали, при этом контроли, калибраторы и контроли качества располагали в штативе первыми. Во флакон с денатурирующим реагентом (Denaturation Reagent: разбавленный раствор NaOH) добавляли 5 капель индикаторной краски (Indicator Dye: содержит 0,05% азida натрия) и тщательно перемешивали. Снимали все крышки с контролей и образцов, после чего аккуратно, вертикально, строго над центром отверстия пробирки добавляли в пробирку денатурирующий реагент с индикаторной краской, не прикасаясь наконечником пипетки к стенкам пробирок, чтобы избежать перекрестного загрязнения образцов. В пробирки с отрицательным контролем (Negative Control: ДНК-матрица в Транспортной Среде для Образцов (СТМ), содержит азид натрия) (2 мл) вносили 1 мл денатурирующего реагента, а в пробирки с положительным калибратором для вирусов высокого риска (High-Risk HPV Calibrator: Раствор в СТМ (1,0 пкг/мл) вновь синтезированной ВПЧ -16 -ДНК и ДНК-матрицы, содержащий азид натрия), контроля качества для вирусов высокого риска (High-Risk HPV Quality Control: Раствор в СТМ (5,0 пкг/мл – 500000 копий/мл) вновь

синтезированной ВПЧ- 16 -ДНК и ДНК-матрицы, содержащий 0,05% азид натрия) и контроля качества для вируса низкого риска (Low-Risk HPV Quality Control: Раствор в СТМ (5,0 пкг/мл – 500000 копий/мл) вновь синтезированной ВПЧ-6-ДНК и ДНК-матрицы, содержащий 0,05% азид натрия) (1 мл) или с образцами (1 мл в СТМ) - 500 мкл денатурирующего реагента. Нельзя удалять приспособление, использовавшиеся для взятия образцов, из пробирок до тех пор, пока не прошла денатурация. Далее, накрыв специальной пленкой Dura Seal TM все пробирки в штативе, накрывали штатив с пробирками специальной крышкой, защелкнув ее. Поставив штатив в мультивортекс, устанавливали максимальную частоту встряхивания на 10 сек. Следующим этапом была инкубация проб в течение  $45 \pm 5$  мин при  $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$  на водяной бане. Далее следовало повторное встряхивание на мультивортексе и тестирование при помощи автоматического робота для проведения исследования.

Для специфического связывания гибридов (HYBRID CAPTURE), детекции связавшихся гибридных молекул и промывки доставали штативы с микропробирками из водяной бани, удалив пленку с микропробирок, и, расположив в роботе одноразовые наконечники, Hybrid Capture (Микропланшет Hybrid Capture (Capture Microplate): Покрыт антителами к гибридам РНК/ДНК), приготовленный проявляющий Реагента 1 (DetectionReagent 1: Антитела к гибридным молекулам РНК/ДНК, конъюгированные с щелочной фосфатазой, растворенные в буфере с азидом натрия), Зонды ВПЧ высокого риска (High-Risk HPV Probe: Смесь РНК-зондов ВПЧ 16/18/31/33/35/39/51/52/56/58/59/68 в буферном растворе), Проявляющий Реагент 2 (Detection Reagent 2: Хемилюминесцентный субстрат (CDP-Star<sup>TM</sup> + Emerald II) согласно установленной производителем схеме запускали прибор с помощью партитивного компьютера. Следующим шагом было измерение люминисценции на микропланшетном люменометре DML 3000/DML 2000 (QIAGEN, Германия). После запуска программного обеспечения и создания профиля планшета, вставляли планшет в DML 2000, убедившись при этом, что лунка A2 находилась в правом дальнем углу платформы, и кликали на кнопку «Start» для измерения

планшета. По окончании измерения сохраняли полученные результаты с последующим анализом полученных данных.

### **2.3.2 Определение ДНК вируса папилломы человека методом полимеразной цепной реакции**

С целью определения частоты и спектра распространенности ВПЧ-инфекции был использован набор для детекции ДНК ВПЧ *in vitro* (выявления, типирования и количественного определения ДНК вируса папилломы человека HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 в соскобе с шейки матки пациенток, взятый гинекологом гинекологическим урогенитальным зондом в транспортную среду) «HPV КВАНТ-21» («ДНК-Технология ТС», Москва, Россия) и детектирующего амплификатора «ДТ-прайм-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва, Россия). Программное обеспечение для прибора предоставляются производителем набора реагентов. Метод основан на амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей дестройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров Таq-полимеразой. Исследование состоит из этапов выделения ДНК (см. 2.2.1) и проведения ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

На подготовительном этапе марковали по одному стрипу с запечатанными парафином смесями для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+). При этом один стрип рассчитан на исследование одного образца, таким образом, что если необходимо проанализировать два образца, для этого нужно промаркировать 4 стрипа – два для исследуемых образцов, один для «К-» и один для «К+». Мы добавляли в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора «Таq-полимеразы MAX», предварительно встряхнув его на вортексе и сбросив капли со стенок и крышки, и по 20 мкл минерального масла. После вносили в соответствующие

промаркированные пробирки стрипа, не повреждая слой парафина, по 5 мкл ДНК, выделенного из соскоба шейки матки. В стрипы с отрицательным контролем «К-» и положительным контролем «К+» подобным образом вносятся по 5 мкл отрицательного и положительного контроля соответственно. Далее устанавливали стрипы в блок детектирующего амплификатора, предварительно процентрифугировав их на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с, запустив соответствующую программу амплификации (таблица 1) для проведения ПЦР. Для этого запускали программное обеспечение RealTime\_PCR в режиме «Работа с прибором», загружали файл «HPV\_quant.ini», добавляли в протокол соответствующие тесты, указывали количество и идентификаторы образцов, отмечая расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

Таблица 1. Программа амплификации для теста «HPV квант-21»

№ блока	Температура	Время (сек)	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	30	1		Цикл
	94,0	90			
2	94,0	30	5		Цикл
	64,0	15		√	
3	94,0	10	45		Цикл
	64,0	15		√	
4	94,0	5	1		Цикл
5	10,0	...	Хранение		Хранение

По окончании работы прибора фиксировали спектр и распространенность ВПЧ ВКР в положительных пробах.

С целью выявления группы женщин с элиминацией ВПЧ и определения вирусоносительства был использован набор реагентов для качественного определения ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов ВКР методом ПЦР-РВ «АмплиПрайм ВПЧ ВКР 14» (ООО «НекстБио», Москва, Россия) и амплификаторе CFX-96 (Bio-RadLaboratories, США). Данный набор был

выбран ввиду сходства его состава с ВПЧ-digene-тестом. Принцип метода основан на проведении одновременной реакции амплификации участков ДНК выявляемых типов ВПЧ ВКР и ДНК внутреннего эндогенного контроля (ДНК β-глобинового гена человека) при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-полимеразы. Детекция ВПЧ ВКР позволяет через канал FAM выявить 16 тип вируса, через HEX – 18, через ROX – 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, а канал Су5 детектирует эндогенный контроль. Материалом так же является ДНК, выделенное из соскоба шейки матки.

Исследование начинали с подготовки реакционной смеси, для чего к 10 мкл (N+1) ПЦР-смеси ВПЧ-скрининг добавляли 5 мкл (N+1) Буфера В, где N – количество проб. Перемешивали смесь и осаждали ее на вортексе. Далее вносили в каждую микропробирку по 15 мкл смеси и добавляли 10 мкл ДНК выделенной пробы. Вносили контрольные образцы: где в одну пробирку для образца К2 вносили 10 мкл К2 ВПЧ скрининг (положительный контроль), в одну пробирку для образца ОК внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО (отрицательный контроль), в одну пробирку для образца К- внести 10 мкл реагента К- (отрицательный контроль). Далее программировали амплификатор для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (таблица 2) с последующим анализом.

Таблица 2. Программа амплификации для теста «АмплиПрайм ВПЧ ВКР 14»

Цикл	Температура	Время	Число циклов	Режим оптических измерений
1	50,0	15 мин	1	
2	95,0	15 мин	1	
3	95,0	10 сек	45	
	60,0	20 сек		✓

## 2.4 Проведение NGS-анализа

Исследование ДНК женщин с РШМ (108 женщин), выделенного из лимфоцитов периферической крови, проведено с использованием разработанной нами совместно с «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус», Москва) кастомной NGS панели, состоящей из 48 генов. Выбор генов и их участков происходил по принципу полных кодирующих и некодирующих последовательностей генов, вовлеченных в патогенез наследственных онкологических заболеваний, а для поиска соматических изменений конкретные точки мажорных мутаций. В проведенном исследовании для обозначения и поиска геномных координат была использована 37 геномная сборка (GRCh37UCSC). Гены, включенные в панель, отображены в таблице 3.

Таблица 3. Гены, входящие в таргетную панель NGS

№ пп	Гены	Анализируемые участки генов
Протоонкогены и гены-онкосупрессоры (n 28)		
1	<i>RET</i>	Экзоны 2,5,7,9,10,12-19
2	<i>MET</i>	Все кодирующие регионы
3	<i>KIT</i>	Экзоны 2,3,5,8-20
4	<i>CHEK2</i>	Все кодирующие регионы
5	<i>ALK</i>	Экзоны 3-7,9,10,12,14-16,20-28
6	<i>MSH2</i>	Все кодирующие регионы
7	<i>MSH6</i>	Несколько регионов
8	<i>MLH1</i>	Все кодирующие регионы
9	<i>PIK3CA</i>	Экзоны 2-6,8,10,20,21
10	<i>PDGFRA</i>	Экзоны 3-23
11	<i>TERT</i>	Промотор
12	<i>APC</i>	Экзоны 2,3,5,6,7,9,10,12-16
13	<i>ROS1</i>	Экзоны 2,10,15,16,22,23,27, 37-42; Интроны:31,32
14	<i>PMS2</i>	Все кодирующие регионы
15	<i>EGFR</i>	Все кодирующие регионы
16	<i>BRAF</i>	Экзоны 3,8,10-18
17	<i>CD274</i>	Все кодирующие регионы
18	<i>ABL1</i>	Экзоны 2,4-8,11
19	<i>BRCA2</i>	Все кодирующие регионы
20	<i>IDH2</i>	Экзон 4
21	<i>TP53</i>	Все кодирующие регионы

№ пп	Гены	Анализируемые участки генов
22	<i>ERBB2</i>	Все кодирующие регионы
23	<i>BRCA1</i>	Все кодирующие регионы
24	<i>NAT2</i>	Несколько регионов
25	<i>PTEN</i>	Все кодирующие регионы
26	<i>NRAS</i>	Экзоны 2,3,4
27	<i>IDH1</i>	Экзоны 4,8,9
28	<i>KRAS</i>	Все кодирующие регионы
Гены, не участвующие напрямую в опухолеобразовании (n 20)		
29	<i>MTHFR</i>	Варианты с.665C>T и с.1286A>C
30	<i>DPYD</i>	Герминальные варианты rs67376798, rs3918290 (735G>A), rs55886062
31	<i>F5</i>	Все кодирующие регионы
32	<i>GGCX</i>	Вариант rs11676382
33	<i>UGT1A1</i>	Герминальный вариант SCV000268415
34	<i>TPMT</i>	Варианты rs1800462, rs1800460, rs1142345, с.460G>A
35	<i>OPRM1</i>	Вариант с.118A>G
36	<i>IFNL3</i>	rs12979860 C>T
37	<i>CYP3A5</i>	Вариант rs776746
38	<i>CYP2C19</i>	Варианты rs4244285, rs4986893
39	<i>CYP2C9</i>	Варианты <i>CYP2C*5</i> _rs28371686, <i>CYP2C9*6</i> _rs9332131, rs1799853, rs1057910
40	<i>CYP1A2</i>	Варианты rs35694136, rs2069526, rs12720461, rs762551
41	<i>CYP4F2</i>	Варианты с.1297G>A, rs2108622
42	<i>CYP2B6</i>	Все кодирующие регионы
43	<i>CYP2D6</i>	Все кодирующие регионы
44	<i>CYP3A4</i>	Варианты rs35599367, rs2740574
45	<i>ADRA2A</i>	Вариант rs1800544
46	<i>F2</i>	Вариант G20210A
47	<i>SLCO1B1</i>	Вариант rs4149056
48	<i>VKORC1</i> Инtron	Варианты с.-1639G>A, rs9923231, rs358440

#### 2.4.1 Пробоподготовка библиотеки для секвенирования

В основе метода лежит процесс обогащения мультиплексной библиотеки геномной ДНК (гДНК) с использованием зондов КАРА Target Enrichment Probes, а именно КАРА Hyper Choice (Roche Sequencing Solutions, Калифорния, США), и амплификации этих библиотек образцов с помощью ПЦР, опосредованной лигированием (рисунок 4), с использованием набора КАРА Hyper Plus Kit (Roche

Sequencing Solutions, Калифорния, США). Результатом являются обогащенные библиотеки гДНК, которые пригодны для секвенирования.

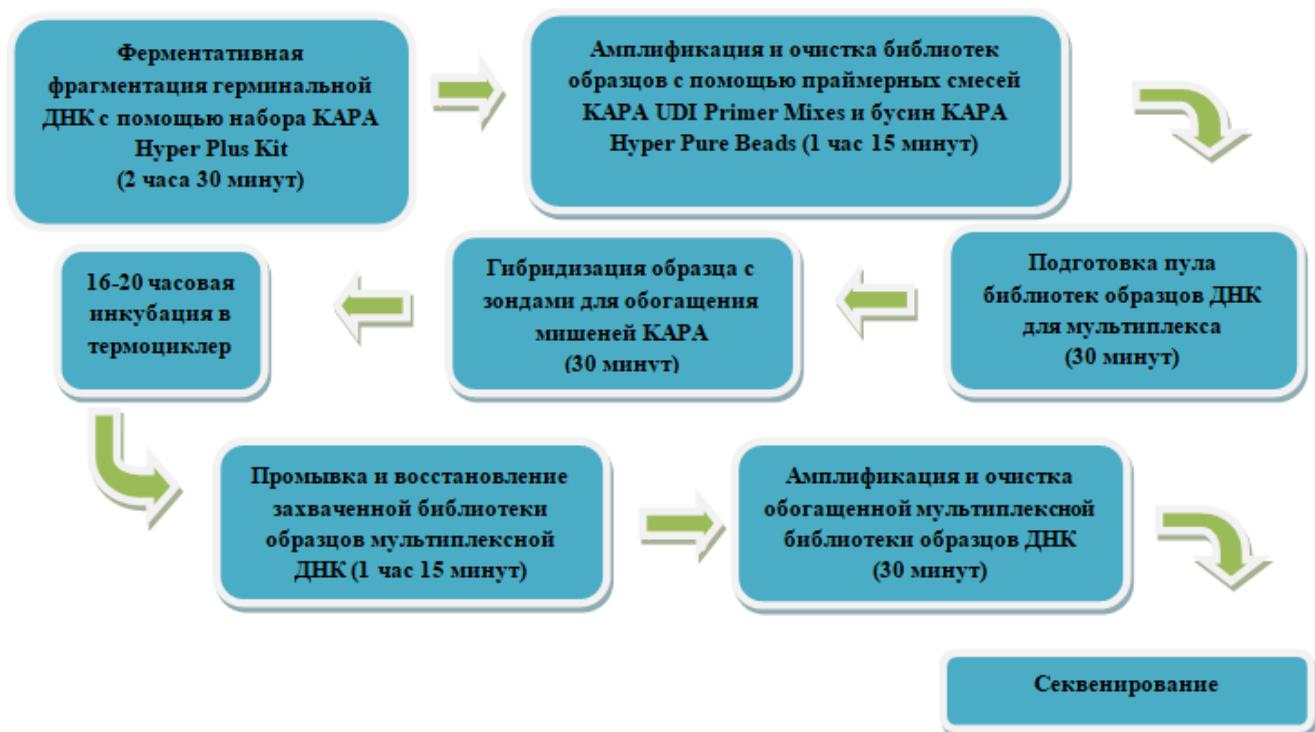


Рисунок 4 – Этапы рабочего процесса подготовки мультиплексных библиотек при помощи KAPA HyperCapWorkflow v3.0 (собственный дизайн)

На подготовительном этапе, с целью избежать многочисленных циклов размораживания или контаминации пула целевых зондов, прокручивали пробирку с целевыми зондами для обогащения КАРА при 10 000 x g в течение 30 секунд и добавляли буфер для ресусспензирования. Далее около минуты перемешивали пул на вортексе и центрифурировали при 10 000 x g в течение 30 секунд. Далее переносили аликвоты зондов для обогащения мишней КАРА по 4 мкл в одноразовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл и хранили при температуре от -15 до -25 °C до использования.

Кроме того, на подготовительном этапе исследования ресусспензировали смесь праймеров KAPA UDI Primer Mixes. Для этого планшет с праймерами доставали из холодильника и центрифугировали при 280 x g 1 минуту, чтобы содержимое упала на дне лунок. Осторожно снимали фольгу, убедившись, что лунка A1 расположена в верхнем правом углу, с помощью многоканального

дозатора одноразовыми наконечниками на дно каждой лунки добавляли по 10 мкл воды PCR Grade. Накрывали планшет новой фольгой, убедившись, что в каждую лунку попала вода, откручивали при 280 x g 30 секунд и хранили при температуре от -15 до -25 °C до использования.

Для ферментативной фрагментации гДНК использовали реагенты KAPA Hyper Plus Kit, с предварительным выравниванием концентрации каждого образца гДНК до 100 нг с использованием набора «Qubitds DNA HS Assay Kit» (Thermo Fisher Scientific, Массасусетс, США) и флуориметра «Qubit 2.0 Fluorometer» (Thermo Fisher Scientific, Массасусетс, США). Разбавляли 100 нг гДНК каждого образца водой PCR Grade до 35 мкл в микропробирки объемом 200 мкл и добавляли к ней по 5 мкл реактива KAPA Frag Buffer (10x) и 10 мкл KAPA Frag Enzyme (данная манипуляция должна проводиться на льду). После тщательного перемешивания сразу переносили стрипы в термоциклер, предварительно охлажденный до +4 °C, с установленной температурой крышки на +50 °C. Сама фрагментация проходила в приборе при +37 °C 25 минут с последующим охлаждением до 4 °C. Далее немедленно переносили образцы на лед и добавляли смесь из реагентов 7 мкл KAPA End Repair & A-Tailing Buffer и 3 мкл KAPA Hyper Plus End Repair & A-Tailing Enzyme Mix. После перемешивания быстро переносили стрипы в термоциклер с температурой крышки +85 °C, 30 минутном выдерживании при +65 °C и последующим охлаждением до 4 °C. Далее мы приступали к реакции лигирования адаптора, сначала добавив по 10 мкл KAPA Universal Adapter в каждый образец, а затем по 40 мкл смеси из 30 мкл KAPA Ligation Buffer и 10 мкл KAPA DNA Ligase. Перемешав, переносили образцы в термоциклер с температурой крышки +50 °C и температурой +20°C на 15 минут. Далее, для очистки образцов после реакции лигирования, добавляли по 88 мкл выдержанного при комнатной температуре реактива с бусинами KAPA Hyper Pure Beads, выдерживали 5 минут при комнатной температуре, чтобы ДНК связалась с бусинами. Далее перемещали образец на магниты, чтобы собрать бусины до прозрачности раствора, и удаляли супернатант. Удерживая образец на магните, добавляли в каждый образец по 200 мкл свежеприготовленного 80 % этанола,

инкубировали 30 секунд, осторожно удаляли этанол. Повторяли промывку бусин с ДНК 80 % спиртом. Далее просушивали бусины при комнатной температуре, не допуская их пересыхания, и добавляли 22 мкл воды PCR Grade в каждый образец, тщательно ресуспенсировав его.

На следующем этапе осуществляли амплификацию библиотеки образцов с использованием смесей праймеров KAPA UDI Primer Mixes. Праймеры предварительно размораживали и центрифугировали при 280 x g 30 секунд. Добавляли по 5 мкл смеси праймеров в каждую отдельную пробу и по 25 мкл реактива KAPA HiFi Hotstart Ready Mix. После тщательного перемешивания и сбрасывания образцы перемещали в термоциклер с температурой крышки 105 °C и запускали соответствующую программу амплификации (таблица 4).

Таблица 4. Программа Pre-Capture ПЦР

Шаг	Время (секунды)	Температура (°C)
1	45	+98
2	15	+98
3	30	+60
4	60	+72
5	Переходим к шагу 2 на 5 циклов (всего 6 циклов)	
6	60	+72
7	∞	+4

По завершении программы амплификации каждую библиотеку амплифицированных образцов промывали с использованием 70 мкл выдержанного при комнатной температуре реактива с бусинами KAPA Hyper Pure Beads 80 % процентным спиртом по аналогии с предыдущим разом дважды. После снятия с магнита ресуспенсировали в 32 мкл PCR Grade в каждый образец, около 2 минут инкубировали при комнатной температуре, переносили на магнит, и полученную прозрачную жидкость переносили в новую микропробирку.

Следующим важным этапом являлось определение концентрации, размера и качества библиотеки амплифицированных образцов: точное количественное определение очень важно при работе с образцами, которые будут гибридизованы (т.е. мультиплексированы перед захватом). Небольшие различия в массе каждого

образца объединенных в «пул библиотек мультиплексных образцов ДНК», приведут к вариациям в чтениях секвенирования, полученных для каждого образца в библиотечном пуле. Неразбавленная библиотека амплифицированных образцов должна содержать  $\geq 1000$  нг общей ДНК. Измерение концентрации проводили, соединив 2 мкл библиотеки с 18 мкл воды PCR Grade, и использовали 5 мкл смеси с использованием набора «Qubit dsDNA HS Assay Kit». Для определения длины фрагментов библиотек был использован 1,5% агарозный гель-электрофорез: библиотеки предварительного захвата должны иметь среднее распределение фрагментов по размеру  $\sim 320$  п.н. с диапазоном от 150 до 1000 п.н. Фрагменты менее 150 п.н. соответствуют неинкорпорированным праймерам, праймер-димерам или димерам переносимого адаптера и не мешают процессу захвата. Для получения пула библиотек образцов ДНК для мультиплексных образцов смешивали равные количества (по массе) каждой из библиотек образцов ДНК с уникальным индексом, чтобы получить 1,5 мкг, и доводили объем до 45 мкл водой PCR Grade. Добавляли 20 мкл человеческой ДНК СОТ (1 мг/мл) в пул библиотеки образцов ДНК, 130 мкл бусин КАРА Hyper Pure Beads, тщательно перемешивали смесь вихревым методом в течение 10 секунд и выполняли быстрый спин, инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут, чтобы библиотека образцов ДНК и ДНК человека СОТ связались с бусинами, помещали образец на магнит, чтобы собрать бусины, инкубировали до тех пор, пока жидкость не станет прозрачной, осторожно удаляли надосадочную жидкость. Далее проводили стандартную операцию по промывке 80 % этанолом и, после умеренного высушивания бусин при комнатной температуре, добавляли 13,4 мкл реактива Universal Enhancing Oligos в образец ДНК, связанный с бисером.

Далее готовили гибридизационную мастер-смесь для КАРА Target Enrichment с размером мишени захвата  $<40$  Mbp из 28 мкл реагента Hybridization Buffer, 12 мкл Hybridization Component H и 3 мкл PCR Grade. Добавляли мастер-смесь к смеси ДНК, связанной с бусинами, перемешивали, сбрасывали и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 минут. Помещали образец

на магнит, чтобы собрать бусинки, инкубировали жидкость до прозрачности, переносили 56,4 мкл элюата в новую пробирку, содержащую 4 мкл целевого зонда для обогащения КАРА Target Enrichment Probe. Проводили инкубацию гибридизации в термоцикльере по программе, при которой необходима температура крышки на +105°C, с первым шагом инкубации при +95°C в течение 5 минут, вторым шагом при +55°C в течение 16-20 часов. По окончании процесса образец оставался при температуре +55°C до тех пор, пока он не будет перенесен на реагент Capture Beads для промывки и восстановления захваченного образца мультиплексной ДНК.

Промывка и восстановление захваченной мультиплексной ДНК происходила при помощи промывочных буферов, которые необходимо было заранее разморозить, убедившись в том, что они не выпали в осадок и не помутнели, при необходимости их тщательно перемешивали вихревым методом и прогревали помутневшие буферы при 37°C, пока они не становились полностью прозрачными. Разбавляли 10-кратные промывочные буфера (I, II, III и Stringent) и 2,5-кратный Bead Wash Buffer, содержащиеся в наборе реагентов КАРА Hyper Capture Reagent, для создания 1X рабочих растворов. Указанные в таблице 5 объемы достаточны для одного захвата.

Таблица 5. Схема разбавления отмывочных буферов

Концентрированный буфер	Объем буфера (мкл)	Объем воды PCR Grade Water (мкл)	Общий объем 1X буфера (мкл)	Температура (°C)
10X Stringent Wash Buffer	40	360	400	+55
10X Wash Buffer I	10	90	100	+55
	20	180	200	Комната
10X Wash Buffer II	20	180	200	Комната
10X Wash Buffer III	20	180	200	Комната
2,5X Bead Wash Buffer	120	180	300	Комната

Перед использованием выдерживали Capture Beads при комнатной температуре около 15 минут. Перед непосредственным использованием вихревым

движением перемешивали бусины для захвата в течение 15 секунд для получения однородной массы. Аликвотировали 50 мкл бусин для каждой реакции захвата в пробирку объемом 0,2 мл (т.е. для одного захвата использовали 50 мкл бусин). Помещали образец на магнит, чтобы собрать бусины. Инкубировали до тех пор, пока жидкость не станет прозрачной. Удаляли и выбрасывали надосадочную жидкость, стараясь не повредить бусины. Держа пробирки на магните, добавляли 2Х первоначального объема бисера в 1X Bead Wash Buffer. Снимали пробирку с магнита и тщательно перемешивали вихревым методом и выполняли сбрасывание. Помешали пробу на магнит, чтобы собрать бусины. Инкубировали, пока жидкость не станет прозрачной. Далее удаляли и сбрасывали надосадочную жидкость, стараясь не повредить бусины. Держа пробирки на магните, выполняли вторую промывку, добавив 2Х первоначального объема бисера в 1X Bead Wash Buffer. Снимали пробирки с магнита и тщательно перемешивали вихревым методом и выполняли сбрасывание. Инкубировали, пока жидкость не станет прозрачной. Далее удаляли и сбрасывали надосадочную жидкость, стараясь не повредить бусины. Добавляли 1Х первоначального объема бисера в 1X Bead Wash Buffer (т.е. 50 мкл буфера на захват). Снимали пробирки с магнита и тщательно перемешивали вихрем в течение 10 секунд. Выполняли быстрый спин. Аликвотировали 50 мкл ресуспендированных бусин в новую пробирку. Помещали пробирки на магнит для сбора бусин. Инкубировали, пока жидкость не станет прозрачной. Осторожно удаляли супернатант и сбрасывали его. Захватывающие бусины в тот момент были готовы к связыванию гибридизированной ДНК. Важным этапом было не допустить высыхания бисера для захвата. Далее приступали к этапу связывания гибридизированной ДНК с захватывающими бусинами. Переносили гибридизационный образец в отдельную пробирку с подготовленными на предыдущем этапе Capture Beads. Тщательно перемешивали вихрем в течение 10 секунд и выполняли быстрый спин. Инкубировали реакцию гибридизации, поместив образец в термоциклер, установленный на +55°C, на 15 минут, при этом температура крышки термоцикlera должна была быть

установлена на +105°C. Связывание бусинок можно проводить в том же термоциклере, который использовался для гибридизации зонда инкубации.

Следующим ключевым этапом было промывание захваченных бусин, связанных с ДНК. Для этого добавляли в реакцию гибридизации 100 мкл предварительно подогретого 1X Wash Buffer I. Тщательно перемешивали смесь вихревым в течение 10 секунд, чтобы она стала однородной. Выполняли быстрый спин. Помещали образец на магнит для сбора бисера. Инкубировали до тех пор, пока жидкость не станет прозрачной. Удаляли надосадочную жидкость и сбрасывали ее, не потревожив бусинки. Добавляли 200 мкл предварительно подогретого 1X Stringent Wash Buffer к образцу. Снимали образец с магнита. Тщательно перемешивали вихревым движением в течение 10 секунд, чтобы смесь стала однородной. Выполняли быстрое вращение. Помещали образец в термоциклер, предварительно нагретый до +55°C, закрывали крышку, настроенную на +105°C, и инкубировали в течение 5 минут. После 5 минут инкубации извлекали образец из термоцикlera и помещали на магнит для сбора бусин. Инкубировали до тех пор, пока жидкость не была прозрачной. удаляли надосадочную жидкость и сбрасывали ее, стараясь не повредить бусины. Добавляли 200 мкл предварительно подогретого 1X Строгого Stringent Wash Buffer к образцу. Снимали образец с магнита. Тщательно перемешивали вихревым движением в течение 10 секунд, убедясь, что смесь однородна. Выполняли быстрое вращение. Помещали в термоциклер, предварительно нагретый до +55°C, закрывали крышку, которая была нагрета до +105°C, и инкубировали в течение 5 минут. После 5 минут инкубации извлекали образец из термоцикlera и помещали на магнит, чтобы собрать бусинки. Инкубировали, пока жидкость не станет прозрачной. Удаляли и сбрасывал надосадочную жидкость, стараясь не повредить бусины. Добавляли 200 мкл 1X Wash Buffer I комнатной температуры. Тщательно перемешивали вихрем в течение 10 секунд, чтобы смесь стала однородной. Выполняли быстрый отжим. Инкубировали при комнатной температуре в течение 1 минуты. Помещали образец на магнит, чтобы собрать бусинки. Инкубировали до тех пор, пока жидкость не станет прозрачной.

Сбрасывали надосадочную жидкость, стараясь не повредить бусины. Добавляли 200 мкл 1Х промывочного Wash Buffer II комнатной температуры. Тщательно перемешивали смесь вихревым методом в течение 10 секунд, убедитесь, что она однородна. Быстро сбрасывали и переносили содержимое в новую пробирку. Инкубировали при комнатной температуре в течение 1 минуты. Помещали образец на магнит, чтобы собрать бусинки. Инкубировали, пока жидкость не станет прозрачной.

Удаляли надосадочную жидкость и сбрасывали ее, стараясь не повредить бусины. Добавляли 200 мкл 1Х промывочного буфера Wash Buffer III комнатной температуры. Тщательно перемешивали вихрем в течение 10 секунд, чтобы смесь стала гомогенной. Выполняли быстрый спин. Инкубировали при комнатной температуре в течение 1 минуты. Помещали образец на магнит, чтобы собрать бусинки. Инкубировали, пока жидкость не станет прозрачной. Удаляли и сбрасывали надосадочную жидкость, стараясь не потревожить бусины. Снимали образец с магнита. Добавляли 20 мкл воды PCR Grade в пробирку и тщательно перемешивали, выполнив сбрасывание.

Далее выполняли амплификацию обогащенного мультиплексного образца ДНК. РесусPENDировали Post-Capture PCR Oligos, кратко прокручивали лиофилизированные постзахватные ПЦР-олигоны, содержащиеся в наборе реагентов KAPA Hyper Capture Reagent Kit, чтобы их содержимое осело на дно пробирки. Добавляли 480 мкл воды PCR Grade в пробирку с отцентрифужированными олиго, вортексом в течение не менее 10 секунд перемешивали ресусpendированные олиго, сбрасывали. Готовили мастер-смесь для ПЦР после захвата: к 25 мкл KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) добавляли 5 мкл Post-Capture PCR Oligos. Добавляли 30 мкл мастер-смеси для ПЦР Post-Capture в пробирку объемом 0,2 мл, брали связанную с бусинами ДНК и тщательно перемешивали вихревым методом в течение 10 секунд, после чего выполняли быстрый спин. Переносили 20 мкл связанной с бусинами ДНК в пробирку с 30 мкл мастер-смеси для ПЦР после захвата и перемешивали

пипетирия смесь около 10 раз. Далее переносили смесь в термоциклер, настроенный на программу, которая описана в таблице 6.

Таблица 6. Программа ПЦР-амплификации после захвата

Шаг	Время (секунды)	Температура (°C)
1	45	+98
2	15	+98
3	30	+60
4	60	+72
5	Переходим к шагу 2 на 15 циклов (всего 16 циклов)	
6	60	+72
7	$\infty$	+4

Далее было необходимо очистить амплифицированный обогащенный мультиплексный образец ДНК с помощью КАРА Hyper Pure Beads. Для этого мы помещали образец, содержащий амплифицированную обогащенную мультиплексную пробу ДНК, на магнит, чтобы собрать бусины. Затем переносили супернатант в новую пробирку. Добавляли 70 мкл бусин КАРА HyperPure Beads в 50 мкл амплифицированной обогащенной библиотеки мультиплексных образцов ДНК и проводили стандартную вышеописанную процедуру промывки 80 % спиртом. Далее, после высыхания бусин, снимали образец с магнита и ресуспендиравали гранулы бусин в 22 мкл воды PCR Grade. Вортексировали не менее 10 секунд, чтобы убедиться, что все бусинки ресуспендиированы. Выполняли сбрасывание и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 минут. Далее помещали образец обратно на магнит и прозрачную жидкость, представляющую из себя 20 мкл элюата, переносили в новую пробирку. Данный элюат представляет из себя амплифицированный обогащенный образец мультиплексной ДНК. Если его параметры, а именно выход амплифицированной обогащенной библиотеки мультиплексных образцов ДНК составлял  $\geq 100$  нг и среднее распределение фрагментов по размерам составляло  $\sim 320$  п.н., то такой образец считался пригодным для секвенирования.

## 2.4.2 Проведение NGS-анализа, первичная и вторичная обработка данных

В нашем исследовании мы использовали секвенатор MiSeq (Illumina, Калифорния, США) и набора реагентов MiSeq Reagent Kit v2 (300-циклов) (Illumina, Калифорния, США). Перед использованием секвенатора была выполнена стандартная процедура промывки прибора, а набор реагентов был предварительно разморожен. Для подготовки готовой амплифицированной обогащенной библиотеки мультиплексных образцов ее необходимо было сначала денатурировать и разбавить. Для этого образец доводили водой для ПЦР до 4нМ. К 5 мкл 4нМ образца добавляли 5 мкл 0,2N NaOH, перемешивали вихревым методом и центрифугировали 1 минуту при 280 x g. Инкубировали при комнатной температуре и добавляли 990 мкл предварительно охлажденного HT1, взятого из набора реагентов MiSeq Reagent Kit v2. Таким образом мы получали 20 пМ библиотеку. Далее, для получения библиотеки 12 пМ, разбавляли 360 мкл 20 пМ библиотеки 240 мкл предварительно охлажденного HT1. Данный образец готов к секвенированию.

Перед запуском прибора необходимо было загрузить индексы (штрих-коды) последовательности адаптеров и праймеров Roche, изменив установку IEM (Experiment Manager) файла по умолчанию. Для этого копировали пользовательские файлы KAPA UDI Adapters.txt и AVENIO Edge UDI Primer Mixes\_1 - 96.txt из папки IndexKits в папку C:\Program Files (x86)\Illumina\Illumina Experiment Manager\IndexKits. Далее запускали секвенатор по стандартному протоколу через Illumina Experiment Manager. Перед запуском мы добавляли в картридж 600 мкл готового денатурированного и разбавленного образца, предварительно промыв проточную ячейку.

Первичный анализ данных выполняется автоматически в системах секвенирования Illumina и параллельно во время выполнения секвенирования. Так показатель Q30 в нашем прогоне соответствовал  $\geq 92,8 \%$ . После завершения секвенирования мы получали файлы в формате FASTQ, в которых содержится информация о сырых данных, преобразованных в последовательности отдельно

по каждому образцу. Для более детальной оценки качества прочтений было также использовано приложение «FastQC» v0.12.1. [Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (дата обращения: 15.09.2023)]. После того, как мы убедились, что качество прочтений удовлетворительное, мы приступали к вторичной обработке данных.

Вторичный анализ полученных FASTQ-файлов производили отдельно по каждому образцу с использованием Bed-файла с геномными координатами и Manifest-файла (так же с координатами, но несколько в другом формате) в облачном сервисе по анализу данных Illumina BaseSpace в приложении «BWA Enrichment» (Illumina, Калифорния, США). В результате этого мы получили vsf-файлы, содержащие информацию о различиях последовательностей исследуемого ДНК в сравнении с референсным геномом, и проанализировали образцы при помощи базы данных «Variant Interpreter» (Illumina, Калифорния, США). Протоколы биоинформационической обработки были созданы на основе рекомендаций Illumina с использованием платформы компании для первичной обработки данных с последующим аннотированием выявленных вариантов для всех известных транскриптов каждого гена из базы данных RefSeq с использованием компьютерных алгоритмов, предсказывающих патогенность вариантов с учетом рекомендаций Американского колледжа медицинской генетики и геномики (ACMG) (Richards et al., 2015; Abou Tayoun et al., 2018). В результате такой обработки нами было получено 6 групп изменений нуклеотидной последовательности: доброачественные (B), вероятно доброачественные (LB), патогенные (P), вероятно патогенные (LP), варианты с неясным значением (VUS) и замены, о которых нет информации в используемой базе данных. Замены из категории B и LB были исключены из анализа, а оставшиеся замены были подвержены дальнейшему анализу.

### **2.4.3 Третичный анализ данных и предсказательные инструменты**

Последующая проверка и анализ клинической значимости найденных замен проводилась в базах данных «ClinVar» и «OncobRCA» с учетом клинической информации. В случае, если в базах данных замены трактовались как доброкачественные, они были исключены из анализа. Для того, чтобы сделать окончательные выводы о патогенном потенциале найденных изменений, мы пользовались поиском в базах данных, анализируя заболевания, с которыми были ассоциированы изменения. Критериями отбора была связь замен с онкологическими заболеваниями различных нозологий либо патогенное действие на важнейшие молекулярно-биологические пути.

Кроме того, ключевым критерием включения замен в категорию вероятно патогенных для РШМ была их распространенность в изучаемой популяции и общепопуляционной среди здоровых индивидов. Данные о распространности замен были получены с помощью интернет ресурсов «Ensemble» и «GnomAD» (v4.0.0.).

Функциональный анализ белковых продуктов осуществлялся с помощью ресурсов для построения пространственной модели белка и определения изменений в нем: SIFT, MutationAssessor, PolyPhen, MetaLR, CADD, «SWISS-MODEL» (Waterhouse et al., 2018), «DynaMut2» (Rodrigues et al., 2021), «UniProt» (The UniProt Consortium, UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025, Nucleic Acids Research, 2024), «AlphaFold» (Mihaly et al., 2024), PrimateAI-3D (Gao et al., 2023), SpliceAI (Jaganathan et al., 2019). «SWISS-MODEL» представляет собой полностью автоматизированный сервер моделирования гомологии белковых структур, доступный через веб-сервер ExPasy. Веб-сервер «DynaMut2» эффективно предсказывает эффект мутаций в контексте трехмерной структуры белка и позволяет точно предсказать молекулярные последствия одиночных мутаций для сворачивания белка, стабильности и динамики на основании прогнозирования изменений свободной энергии Гиббса ( $\Delta\Delta G$ ) и температуры плавления ( $\Delta T_m$ ), то есть в результате изменений вибрационной

энтропии. Для его использования загружали сгенерированный в «SWISS-MODEL» либо скаченный в «AlphaFold» файл в формате PDB, содержащий нормальную структуру белка, с указанием изменений в нем. В результате мы получали результат о стабильности белка. «UniProt» является базой данных, которая предоставляет пользователям всеобъемлющий, высококачественный и свободно доступный набор информации о последовательности белков, аннотированных функциональной информацией. «AlphaFold» – это система искусственного интеллекта, разработанная Google DeepMind (Google, Лондон, Великобритания), которая предсказывает трехмерную структуру белка по его аминокислотной последовательности. AlphaMissense – модель глубокого обучения, основанную на инструменте прогнозирования структуры белка AlphaFold2. Модель обучается на данных о популяционной частоте и использует последовательности и предсказанный структурный контекст, что вносит вклад в ее эффективность (Cheng et al., 2023). PrimateAI-3D – это трёхмерная сверточная нейронная сеть, которая использует структуру белков и множественное выравнивание последовательностей (MSA) для прогнозирования патогенности миссенс-вариантов у человека (Gao et al., 2023). SpliceAI точно предсказывает места сплайсинга на основе произвольной последовательности транскрипта премРНК, что позволяет точно предсказывать некодирующие генетические варианты, вызывающие криптический сплайсинг (Jaganathan et al., 2019).

## **2.5 Анализ ассоциаций между полиморфизмами генов и риском развития рака шейки матки**

Для полиморфных вариантов rs27069 гена *CLPTM1L*, rs10175462 гена *PAX8*, rs2268177 гена *CDC42*, rs1042522 гена *TP53*, rs1801133 и rs1801131 гена *MTHFR*, rs17879961 и rs1060502712 гена *CHEK2*, rs56391007 и rs34589476 гена *MET*, rs1058808 и rs1136201 гена *ERBB2*, rs1208 и rs1801280 гена *NAT2*, rs3822214 гена *KIT*, rs1799939 гена *RET*, rs144848 и rs4987117 гена *BRCA2*, rs1799950 и rs1799967 гена *BRCA1*, rs2229070 гена *ABL1*, rs1140475 гена *EGFR*, rs619203, rs529156 и rs529038 гена *ROS1*, rs1799971 гена *OPRM1*, rs4149056 гена *SLO1D1*, rs8192709

гена *CYP2B6*, rs6030, rs4524, rs1046712, rs6025, rs9332607 и rs6035 гена *F5* был проведен дополнительный ассоциативный анализ.

Полиморфные варианты rs1042522, rs1801133 и rs1801131 были проанализированы при помощи набора реагентов компании «Синтол» (Синтол, Москва, Россия), согласно инструкции производителя, с использованием детектирующего амплификатора «CFX96» (BioRad, Калифорния, США). Ключевым элементом наборов является пара аллель-специфичных зондов, позволяющих раздельно детектировать продукты ПЦР-РВ на двух каналах флуоресценции. Результаты реакции на двух каналах позволяют определить присутствие каждого из аллелей исследуемого полиморфизма. Для проведения анализа необходимо смешать реактивы для амплификации ДНК ( $2.5\times$  реакционная смесь,  $2.5\times$  разбавитель и Таq-полимераза) в нужном объеме непосредственно перед проведением исследования. Рассчитать необходимый объем компонентов, исходя из количества исследуемых образцов плюс 4 (три положительных контрольных и один отрицательный контрольный образец). При этом реакционной смеси и разбавителя необходимо внести по 10 мкл, а Таq-полимеразы по 0,5 на образец с последующим добавлением 1 мкл исследуемой ДНК. Программа амплификация для ПЦР-РВ представляла собой 1 цикл на  $+95\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течении 3 минут и 40 циклов, чередующихся из  $+95\text{ }^{\circ}\text{C}$  15 секунд,  $+63\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течении 40 секунд с измерением флуоресценции. В таблице 7 отображены нуклеотидные последовательности и каналы флуоресценции исследованных локусов.

Полиморфные варианты rs27069, rs10175462, rs2268177, rs17879961, rs1060502712, rs34589476, rs56391007, rs1058808, rs1136201, rs1208, rs1801280, rs3822214, rs1799939, rs144848, rs4987117, rs1799950, rs1799967, rs2229070, rs1140475, rs619203, rs529156, rs529038, rs1799971, rs4149056, rs8192709, rs6030, rs4524, rs1046712, rs6025, rs9332607 и rs6035 были генотипированы с использованием реактивов «ДНК-Синтез» (ДНК-Синтез, Москва, Россия), согласно протоколу фирмы производителя с помощью системы детекции продуктов ПЦР в реальном времени «ДТ-прайм» (ДНК-Технология, Москва,

Россия) и «CFX96» (BioRad, Калифорния, США). Принцип метода идентичен набору реактивов компании «Синтол». Мы использовали наборы, рассчитанные на 1000 реакций, состоящие из лиофильно высушенной смеси праймеров (F+R), флуоресцентно-меченых зондов TagMan с каналами флуоресценции FAM и VIC. Смесь праймеров растворяли в 250 мкл воды для ПЦР, зонды в 100 мкл. Далее готовили рабочие растворы, доведя их до концентрации 10 мкМ. Для постановки реакции использовали рабочие растворы, приготовленные в соответствии со схемой, отраженной в таблице 7.

**Таблица 7. Приготовление мастер-смеси для выполнения ПЦР-РВ**

	Компоненты смеси	Объем на 1 образец (мкл)
1	10Х буфер для TaqPol	2,5
2	(F+R) праймеры (10 мкМ)	2,5
3	Зонд FAM (10 мкМ)	1
4	Зонд VIC (10 мкМ)	1
5	Смесь dNTPs (10 мкМ)	1
6	TaqPol (5 ед/мкл)	0,5
7	Вода для ПЦР	До 25 мкл
8	ДНК (10 нг/мкл)	1

Программа амплификация для ПЦР-РВ представляла собой 1 цикл на +95 °C в течении 3 минут и 40 циклов, чередующихся из +95 °C 10 секунд, +55 °C в течении 30 секунд с измерением флуоресценции и +72 °C в течении 30 секунд.

## **2.6 Анализ состояния микросателлитной нестабильности в материале опухолей шейки матки**

Для проведения дополнительных исследований, направленных на определение микросателлитной нестабильности в соматической ДНК пациенток с вероятно патогенными мутациями в системе генов dMMR в герминальной ДНК, были использованы их гистологические блоки с фиксированной в формалине и пропитанной в парафине тканью злокачественной опухоли. Для выполнения иммуногистохимического анализа с опухолевой ткани делался срез толщиной 2–4 микрона и была проведена иммуногистохимическая реакция с помощью

автоматического иммуногистостейнера Ventana BenchMark ULTRA и антител к белкам системы репарации неспаренных оснований (MMR). Для анализа необходимы набор OptiView DAB IHC Detection Kit и моноклональные антитела MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2, с обязательным использованием для последнего усилителя сигнала OptiView Amplification Kit. В качестве альтернативного метода исследования dMMR было выполнено исследование MSI методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе 3500xL, в результате чего было исследовано 5 микросателлитных локусов (MSI): NR-21, BAT26, BAT-25, NR-24, NR-27. Данные исследования были выполнены с использованием коммерческих наборов.

## 2.7 Статистический анализ

Для статистической обработки данных был использован веб-ресурс Plink с набором инструментов для полногеномного анализа ассоциаций (<https://zzz.bwh.harvard.edu/plink/data.shtml>) с помощью частей операционной системы Microsoft Windows (Microsoft Corporation, Вашингтон, США), таких как Excel и Блокнот. В работе для поиска ассоциаций применен стандартный (базовый) ассоциативный тест «случай-контроль» по критерию Пирсона. Степень ассоциации оценивалась в значениях показателя отношения шансов odds ratio (ОШ) по формуле: ОШ=( $a*d/(b*c)$ ), где a – частота признака в выборке больных, b – частота признака в контрольной выборке, c – сумма частот остальных признаков в выборке больных, d - сумма частот остальных признаков в контрольной выборке. Тесты выполнялись для двустороннего уровня значимости, статистически значимыми считали различия при  $p<0,05$ . Так как в задачи исследования входило выявление самих ассоциаций, а также их тенденций, мы сочли достаточным применение сочетания двух подходов (базового ассоциативного теста и логистического регрессионного анализа) для достижения целей исследования. Логистический регрессионный анализ был проведен на базе программного обеспечения MedCalc (v. 22.016). Построение прогностических моделей, основанных на логистической регрессии, было произведено на базе программного обеспечения R-Studio (v. 2025.051+513).

## 2.8 Дизайн исследования

Исследование состояло из 3 основных направлений: проведение ВПЧ тестирования с оценкой распространенности и типов ВПЧ и выделение группы женщин с элиминацией ВПЧ, репликация некоторых полиморфных локусов, ассоциированных с РШМ в результате GWAS, и проведение NGS-исследования для женщин, больных РШМ, с последующим анализом клинической значимости герминальных замен. Заключительный этап исследования – анализ данных с оценкой прогностически значимых биомаркеров РШМ.



Рисунок 5 – Дизайн исследования

Работа была выполнена в следующей последовательности:

1. Проведение пилотного проекта по скринингу РШМ с применением ВПЧ-тестирования (Digene HPV Test, Hybrid Capture Technology, Qiagen, США) с участием 28 928 женщин.
2. Определение спектра и распространённости типов ВПЧ среди ВПЧ-положительных образцов, выявленных в результате скрининга ВПЧ.
3. Выделение группы женщин, у которых наблюдалась элиминация ВПЧ. Для этого через некоторое время на прием повторно было приглашено 70 ВПЧ положительных в рамках пилотного проекта пациенток, им было проведено

ВПЧ тестирование набором «АмплиПрайм ВПЧ ВКР 14 генотип», цитологическое исследование, при необходимости кольпоскопия, биопсия и гистологическое исследование. В результате у нас сформировалась выборка из 51 человека с зафиксированным фактом элиминации вируса.

4. Репликация ассоциированных с РШМ в результате GWAS полиморфных вариантов генов *CLPTM1L* (rs27069), *PAX8* (rs10175462) и *CDC42* (rs2268177).
5. Проведение NGS-анализа с использованием разработанной нами кастомной панели из 48 генов для женщин с клиническим диагнозом РШМ. Последующий первичный, вторичный и третичный анализы полученных данных, включающие в себя использование различных баз данных и предсказательных биоинформационических инструментов.
6. Выделение генов-кандидатов, влияющих на генетическую предрасположенность к персистентному вирусонаситству ВПЧ и ВПЧ-зависимому РШМ.
7. Оценка прогностической значимости выявленных генетических маркеров в риске развития рака шейки матки.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1 Вирус папилломы человека, как основной этиологический агент рака шейки матки

Так как персистентное вирусоносительство ВПЧ признано основным рисковым фактором развития РШМ, на первом этапе исследования нами была проведена работа по определению спектра и распространенности ВПЧ ВКР в Республике Башкортостан. Основной целью при этом была оценка вирусоносительства ВПЧ в регионе, а также выделение контрольной группы пациенток, не предрасположенных к длительному носительству ВПЧ, а значит и к ВПЧ-зависимому РШМ.

#### 3.1.1 Результаты pilotного проекта по скринингу ВПЧ-инфекции

Реализованный в 2019 году pilotный проект по ВПЧ-тестированию методом ВПЧ-digene теста являлся первым масштабным проектом в Республике Башкортостан по распространенности ВПЧ среди женщин из категории наиболее благоприятной для скрининга. В рамках pilotного исследования было обследовано 28 928 женщин. При этом основной возрастной диапазон составлял 30-39 лет, в него вошло 96,1% пациенток. Остальные участницы принадлежали другим возрастным группам и суммарно составили 4,9%. Общая частота ВПЧ-позитивных женщин среди всей выборки составила 10,6%. Наибольшая распространенность инфицирования регистрировалась среди женщин младше 30 лет и достигала 24,9%. В группе женщин 30-39 лет уровень ВПЧ высокого онкогенного риска составил 10,3%, тогда как в старшей возрастной группе он не превышал 8,1%. Эти результаты согласуются с данными литературных источников, где описано, что доля ВПЧ-позитивных пациенток в возрастной группе младше 25 лет значительно превышает таковую у женщин более старшего возраста: примерно 30%. В то время как среди женщин в возрасте 25-34 лет этот показатель составляет около 12%, в возрасте 35-44 лет – около 6%, а в диапазоне 45-65 лет – менее 5% (Минниахметов и др., 2020; Белокриницкая и др., 2017).

Средний уровень вирусной нагрузки составил 319,97 в общей выборке, что соответствует высокой вирусной нагрузке (более 3x10<sup>7</sup>), наиболее высокое значение – 361,1 выявлено в группе женщин более 39 лет, а самое низкое значение – 287,9 – в возрастной группе 30-39 лет. У 5,4% женщин с положительным ВПЧ-тестом была диагностирована патология шейки матки, среди которых у 21 женщины (0,69%) выявлен рак шейки матки на ранних стадиях (20 случаев cancer *in situ* и 1 случай cancer IA).

### **3.1.2 Анализ распространённости типов ВПЧ в Республике Башкортостан с выделением когорты пациенток с элиминацией ВПЧ и персистенции вириуса**

В 219 ВПЧ-положительных образцах, отобранных случайным образом с целью определения спектра и распространённости типов ВПЧ, выявлено 17 типов ВПЧ высокого онкогенного риска у инфицированных пациенток, при этом одновременно идентифицировались от 1 (17,6 %) до 11(0,5 %) типов вириуса (рисунок 6).



Рисунок 6 – Количество типов ВПЧ, одновременно детектированных у женщин из Республики Башкортостан

Установлено, что 56,6% ВПЧ-инфицированных женщин являются носителями как минимум трех типов вириуса. Лишь у 17,6% женщин детектирован единственный тип ВПЧ. Не было выявлено прямой зависимости между вирусной нагрузкой и количеством типов ВПЧ в образце. Так, вирусная нагрузка женщины носителя 11 типов вириусов составила 1 810,73 RLU/COV, в то время как в

выборке встречались женщины, инфицированные 1 типом ВПЧ с вирусной нагрузкой 2 197,56 и более. Женщины носители 10 типов ВПЧ имели вирусную нагрузку от 181,08 до 1 625,05 RLU/COV.

Таблица 8. Спектр и частоты распространённости типов вируса папилломы человека среди ВПЧ-положительных женщин из Республики Башкортостан

№ пп	Типы ВПЧ	Частоты, %	№ пп	Типы ВПЧ	Частоты, %
Высокого онкогенного риска					
1	VVV 16	59,8% (131)	10	35	22,3% (49)
2	51	40,1% (88)	11	66	17,3% (38)
3	56	38,8% (85)	12	68	14,6% (32)
4	V 31	32,8% (72)	13	V 45	13,2% (29)
5	39	30,6% (67)	14	V 52	13,2% (29)
6	V 58	27,8% (61)	15	73	7,3% (16)
7	V 33	27,4% (60)	16	53	6,4% (14)
8	59	26% (57)	17	82	2,3% (5)
9	VVV 18	23,7% (52)	18	26	0
Низкого онкогенного риска					
1	44	5,5% (12)	—	—	—
2	VV 6	2,7% (6)	—	—	—
3	VV 11	0	—	—	—

У 59,8% женщин выявлен ВПЧ 16 типа (131 пациентка из 219), что согласуется с литературными данными о высокой частоте распространённости данного типа высокого онкогенного вируса в мире и данном регионе (Ящук и др. 2019). При этом распространенный в мире 18 тип ВПЧ был выявлен только у 23,7% инфицированных женщин (52 женщины) из Республики Башкортостан. У 40,1 % пациенток встречался ВПЧ 51 типа (88 женщин), у 38,8% – ВПЧ 56 типа (85 женщин). Редкими (<10%) типами ВПЧ высокого онкогенного риска 53, 73 и 82, ВПЧ 26 не был обнаружен у обследованных женщин (таблица 8). ВПЧ 6 и 44 типа низкого онкогенного риска выявлен с частотой 2,7% и 5,5%, соответственно, 11 тип не идентифицирован в исследуемой выборке.

Согласно литературным данным структура генотипов ВПЧ не однородна между странами и регионами: в странах Северной и Западной Европы, Северной и Центральной Америках, Северной Африке, в Северо-Западной и Центральной

России и странах Прибалтики наиболее распространёнными являются 16-й и 18-й типы папилломавируса. В то же время в некоторых странах Азии после ВПЧ 16-го типа лидирующие позиции занимают не 18-й тип. Исследования, выполненные в соседних с Россией странах, таких как Япония, Казахстан, Турция и Китай, показывают высокую распространённость среди женщин типов 51-, 52-, 53- и 56-й, которые следуют за 16-м типом, а в некоторых случаях даже превышают его по распространённости (Ящук и др. 2019). Известно, что на сегодняшний день существует три рекомбинантные вакцины против ВПЧ: «Церварикс» (против ВПЧ 16 и 18), «Гардасил» (против ВПЧ 6, 11, 16 и 18 типов) и «Гардасил-9» (против ВПЧ 6, 11, 16, 18 типов, 31, 33, 45, 52 и 58) (Мусралиева и др., 2025). В таблице 9 цветовой схемой отмечены красным символом «V» типы ВПЧ, против которых эффективна вакцина «Церварикс», желтым «V» - «Гардасил», зеленым «V» - «Гардасил-9». Красной заливкой схематически выделены типы, против которых на сегодняшний день не разработано вакцин. Используя подсчет, основанный на учете абсолютного числа типов ВПЧ в выборке показано, что обнаружено 885 высокоонкогенных типов вируса в 219 пробах, вакцинация даже девятивалентной вакциной охватит только 49% онкогенных типов (434 из 885). Для низкоонкогенных типов этот показатель составил около 33% (6 из 18). При этом высокоонкогенные 51 и 58 типы ВПЧ, занимающие верхние строчки в таблице по распространённости не входят в типы, против которых разработаны вакцины. Эти данные еще раз подчеркивают необходимость внедрения новых комплексных предикторных инструментов по прогнозу течения ВПЧ инфекции, а также разработке вакцин против наиболее частых типов в нашей популяции.

Среди 70 женщин, с вирусной нагрузкой от 1,51 до 2 024,23 RLU/COV при скрининге 2019 г., у 51 – ВПЧ-инфекция элиминировалась, у 19 – обнаружена персистенция вируса. При этом вирусная нагрузка ранее в группе с элиминацией ВПЧ составляла в среднем 429,56 RLU/COV, тогда как в группе с персистенцией средним значением являлось 307,57 RLU/COV. Таким образом средняя вирусная нагрузка в группе с персистенцией ВПЧ на момент реализации пилотного проекта была ниже, чем с элиминацией. Это говорит о том, что вирусная

нагрузка не влияла напрямую на возможность элиминации вирусной инфекции. За 4-5 лет, прошедших после выполнения скрининга ВПЧ, у 72% женщин наблюдается элиминация вируса (51 из 70), что несколько ниже, чем по данным литературных источников. Согласно данным ВОЗ, у 80-90% ВПЧ-инфицированных женщин вирус способен спонтанно элиминироваться в среднем через 1-2 года и только у 10-20% пациенток вирус персистирует в организме более длительное время.

На данном этапе исследования всем приглашенным на прием женщинам повторно был проведен цитологический анализ цервикальных мазков с целью выявления атипии многослойного плоского неороговижащего эпителия. У 63 из 70 не было выявлено цитологических изменений, а у 7 пациенток в результате исследования были обнаружены атипичные клетки. Цитологическое заключение оценивалось в рамках классификации TSB. Все 7 женщин на момент обследования имели положительный результат анализа на ВПЧ. У 3 пациенток было цитологическое заключение ASCUS. Их вирусная нагрузка в 2019 году составляла от 28,15 до 528,82 RLU/COV. У одной пациентки с вирусной нагрузкой от 2019 года 1756,17 RLU/COV – LSIL. У одной женщины с вирусной нагрузкой от 2019 года 5,15 RLU/COV при помощи цитологического исследования была выявлена атипия неясного значения, но не исключена дисплазия тяжелой степени (ASC-H). Все 5 женщин нуждаются в дальнейшем наблюдении. У двух из 70 женщин был выявлен HSIL, один из которых подтвержден гистологическим методом исследования (CINI – умеренная дисплазия), у второй гистологически была выявлена дисплазия легкой степени. Таким образом, у 7 из 19 женщин (36,8%) из группы риска с персистентным типом вирусоносительства ВПЧ была цитологическим методом исследования обнаружена атипия клеток плоского эпителия шейки матки, но не было выявлено РШМ.

В группу из 70 женщин, повторно обследованных в 2024 году, были включены 13 пациенток, прототипированных нами на ВПЧ набором «HPV квант-21» в 2019 году. У четырех из них в 2019 году был выявлен один тип вируса. В

одном случае ВПЧ 58 типа персистировал и привел к тяжелой дисплазии, в то время как у трех произошла элиминация. У 2 женщин с 2 типами ВПЧ в образце в одном случае вирус элиминировался, а в другом привел к РШМ (ВПЧ 16 и 51 типа в 2019 году), было проведено лечение, но в 2024 на фоне нормальной цитологической картины был обнаружен ВПЧ 16 типа. У трех женщин с коинфицированием 4 типами ВПЧ и одной с 5 типами вирус элиминировался. У 1 пациентки из трех с 6 типами вируса была обнаружена персистенция ВПЧ и легкая дисплазия, в то время как у 2 наблюдалась спонтанная элиминация.

Таким образом, не было обнаружено прямой корреляции между количеством типов вируса в образце и вирусной нагрузкой. Проанализировав когорту женщин, повторно приглашенных на прием спустя 4-5 лет после положительного результата ВПЧ-тестирования в рамках пилотного проекта, также не была выявлена корреляция между вирусной нагрузкой и элиминацией ВПЧ. Полученные данные свидетельствуют о том, что для выбранного региона не целесообразно в качестве набора для скрининга ВПЧ использовать набор, направленный на определение двух типов ВПЧ16 и ВПЧ18. Так же мы сделали вывод о том, что ни один из широко использующихся сегодня методов диагностики не может стать надежным прогностическим маркером исхода заболевания до ярких клинических проявлений, а вакцинация не охватит весь спектр ВПЧ, оставляя большой пробел в профилактических мероприятиях.

В результате проведенного исследования нами была выделена группа из 51 женщины, у которых наблюдалась спонтанная элиминация ДНК ВПЧ в течении 2-4 лет. Все пациентки имели нормальные результаты цитологического исследования шейки матки (NILM), что подтверждает отсутствие патологических изменений. Подтверждено, что элиминация ВПЧ у этих пациенток произошла спонтанно, без проведения конусовидной экскизии или других хирургических вмешательств. Это важно для оценки естественного течения инфекции и эффективности иммунной системы в борьбе с ВПЧ.

### **3.2 Репликативное исследование локусов генов *CLPTM1L* (rs27069), *PAX8* (rs10175462) и *CDC42* (rs2268177), ассоциированных с РШМ в результате GWAS**

На территории России ранее не проводились репликативные исследования GWAS по выявлению генетической предрасположенности к ВПЧ-ассоциированному РШМ. Следовательно, идентификация прогностически значимых маркеров риска развития РШМ остается актуальной задачей, требующей дальнейших исследований. Для ее решения мы использовали выборку из 111 образцов ДНК женщин с клиническим диагнозом РШМ, выделенной из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. В качестве группы сравнения была использована ДНК 51 женщины с зафиксированной элиминацией ВПЧ. В случае выявления ассоциации или тенденции к ассоциации мы усиливали мощность исследования выборкой герминальной ДНК 333 условно- здоровых женщин.

В качестве наборов для детекции полиморфных вариантов были использованы наборы реагентов «ДНК-Синтез», согласно протоколу фирмы производителя, с помощью системы детекции продуктов ПЦР в реальном времени «ДТ-прайм» и «CFX96».

Все полиморфные варианты соответствовали равновесию Харди-Вайнберга (таблица 31 приложения). Результаты исследования выбранных полиморфных вариантов генов представлены в таблицах 9-14. В качестве группы сравнения для пациенток с РШМ была использована объединенная группа, включающая женщин с элиминацией ВПЧ-инфекции и условно здоровых женщин. Таким образом, исследование включает три группы сравнения: пациенток с РШМ ( $N=111$ ), женщин с элиминацией ВПЧ ( $N=51$ ) и условно здоровых женщин ( $N=333$ ). Выборка из 162 человек (группы с РШМ и женщин с элиминацией ВПЧ) обозначена как малая, а выборка из 495 человек (группа с РШМ и объединенная группа женщин с элиминацией ВПЧ и условно здоровых женщин) – как расширенная. На первом этапе ассоциативного анализа полиморфных вариантов *CLPTM1L* (rs27069), *PAX8* (rs10175462) и *CDC42* (rs2268177) были выявлены

различные тенденции к ассоциации между группами сравнения в исследуемой популяции. Эти результаты не противоречат данным, полученным в зарубежных исследованиях. Для повышения достоверности результатов мы решили расширить контрольную группу, добавив 333 женщины без клинического диагноза рака шейки матки.

При первичной обработке данных не было выявлено ассоциаций для локуса rs27069 гена *CLTP1L* с аллелем A ( $p=0,765$ ) и с генотипом AA ( $p=0,067$ ). При применении логистического регрессионного анализа была выявлена тенденция к ассоциации для генотипа AG ( $p=0,043$ ) (таблица 9).

Таблица 9. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs27069 гена *CLTP1L* между пациентками с РШМ и малой группой сравнения

Аллеи										
SNP	Вероят- ный аллель риска	Часто- та аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ		$\chi^2$	ОШ	95% ДИ	P		
rs27069	G	0,703	0,686		0,089	1,081	0,650- 1,795	0,765		
Генотипы										
rs27069	N	Число генотипов			Частоты генотипов		$\chi^2$ , р			
Генотипы	162	AA	AG	GG	AA	AG	GG	$\chi^2=5,409$ $p=0,067$		
РШМ	111	9	48	54	0,081	0,432	0,486			
Элиминация ВПЧ	51	9	14	28	0,176	0,275	0,549			
Логистическая регрессия для малой выборки (N=162)										
Локус			Коэффициент регрессии		Остатки отклонений			P		
rs27069 – <i>CLPTM1L</i> – A/G			1,262		-1,678 – 1,235			0,043		
rs27069 – <i>CLPTM1L</i> – G/G			0,848					0,141		

Для локуса rs10175462 гена *PAX8* была выявлена тенденция к ассоциации аллеля G ( $p=0,056$ , ОШ=1,58,  $\chi^2=3,663$ ), что подтвердилось и при помощи логистического регрессионного анализа для гомозиготного генотипа GG ( $p=0,028$ ) (таблица 10).

Таблица 10. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs10175462 гена *PAX8* между пациентками с РШМ и малой группой сравнения

Аллели								
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ	$\chi^2$	ОШ	95% ДИ	p	
rs10175462	G	0,603	0,490	3,663	1,584	0,987-2,540	0,056	
Генотипы								
rs10175462	N	Число генотипов			Частоты генотипов			$\chi^2$ , p
Генотипы	162	GG	GA	AA	GG	GA	AA	$\chi^2=4,514$ $p=0,105$
РШМ	111	40	54	17	0,360	0,486	0,153	
Элиминация ВПЧ	51	14	22	15	0,275	0,431	0,294	
Логистическая регрессия для малой выборки (N=162)								
Локус			Коэффициент регрессии			Остатки отклонений		p
rs10175462 – <i>PAX8</i> – A/G			0,7242			-1,7272- 1,1483		0,118
rs10175462 – <i>PAX8</i> – G/G			1,16777					0,028

При сравнительном анализе частот аллелей и генотипов локуса rs2268177 гена *CDC42* была выявлена тенденция к ассоциации для рискового аллеля Т ( $p=0,054$ , ОШ=1,659,  $\chi^2=3,714$ ). При применении логистического регрессионного анализа также выявлена тенденция к значимости модели ( $p=0,057$ ).

Таблица 11. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs2268177 гена *CDC42* между пациентками с РШМ и малой группой сравнения

Аллели										
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ		$\chi^2$	ОШ	95% ДИ	p		
rs2268177	T	0,374	0,265		3,714	1,659	0,989-2,782	0,054		
Генотипы										
rs2268177	N	Число генотипов			Частоты генотипов			$\chi^2$ , p		
Генотипы	162	TT	ТА	AA	TT	ТА	AA	$\chi^2=3,41$ p=0,18		
РШМ	111	18	47	46	0,162	0,423	0,414			
Элиминация ВПЧ	51	4	19	28	0,078	0,373	0,549			
Логистическая регрессия для малой выборки (N=162)										
Локус		Коэффициент регрессии			Остатки отклонений		p			
rs2268177– <i>CDC42</i> – A/T		0,5857			-1,6651- 1,0051		0,147			
rs2268177– <i>CDC42</i> – T/T		0,6788					0,286			

Таким образом нами были получены данные, свидетельствующие о том, что для каждого из выбранных полиморфных вариантов наблюдаются тенденции к ассоциации с РШМ, что, вероятно связано с малочисленностью выборки.

Поэтому было принято решение расширить выборку на ДНК 333 здоровых женщин, в результате чего мы показали следующее: в ходе сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов между группами сравнения в расширенной выборке было обнаружено, что аллель G полиморфного локуса

rs27069 гена *CLTP1L* ассоциирован с риском развития РШМ ( $\chi^2=4,098$ , ОШ=1,395, ДИ=1,01-1,926,  $p=0,043$ ), однако не было выявлено ассоциации с генотипом GG ( $p=0,124$ ) (таблица 12); при расширении выборки не было выявлено ассоциации ни для аллеля G ( $p=0,217$ ), ни для гомозиготного генотипа GG ( $p=0,463$ ) гена *PAX8* (таблица 13); при сравнительном анализе частот аллелей и генотипов локуса rs2268177 гена *CDC42* на расширенной выборке была выявлена статистически значимая ассоциация для рискового аллеля T ( $\chi^2=16,99$ , ОШ=1,945, ДИ=1,413-2,676,  $p=3,751e-005$ ) и с генотипом TT ( $\chi^2=17,35$ ,  $p=0,0002$ ) (таблица 14).

Таблица 12. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs27069 гена *CLTP1L* между пациентками с РШМ и расширенной группой сравнения

Аллели								
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ			$\chi^2$	ОШ	95% ДИ
rs27069	G	0,703	0,629			4,098	1,395	1,01 -1,929
Генотипы								
rs27069	N	Число генотипов			Частоты генотипов			Ассоциация
Генотипы	495	GG	AG	AA	GG	AG	AA	$\chi^2=4,172$ $p=0,124$
РШМ	111	54	48	9	0,486	0,432	0,081	
Элиминация ВПЧ	384	154	175	55	0,401	0,455	0,143	

Таким образом, в результате исследования полиморфных вариантов, ассоциированных в результате GWAS исследования с риском развития РШМ, были реплицированы статистически значимые ассоциации с рисковым аллелем G полиморфного локуса rs27069 гена *CLTP1L* и с рисковым аллелем Т и генотипом ТТ локуса rs2268177 гена *CDC42*, однако не было выявлено ассоциации с полиморфизмом rs10175462 гена *PAX8*.

Таблица 13. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs10175462 гена *PAX8* между пациентками с РШМ и расширенной группой сравнения

Аллели										
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ		$\chi^2$	ОШ	95% ДИ	P		
rs10175462	G	0,603	0,557		1,526	1,212	0,893-1,643	0,217		
Генотипы										
rs10175462	N	Число генотипов			Частоты генотипов		Ассоциация			
Генотипы	489	GG	AG	AA	GG	AG	AA	$\chi^2=1,54$ p= 0,463		
РШМ	111	40	54	17	0,360	0,486	0,153			
Элиминация ВПЧ	378	117	187	74	0,309	0,495	0,196			

Таблица 14. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs2268177 гена *CDC42* между пациентками с РШМ и расширенной группой сравнения

Аллели										
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ		$\chi^2$	ОШ	95% ДИ	P		
rs2268177	T	0,374	0,235		16,99	1,945	1,413-2,676	3,751e-005		
Генотипы										
rs2268177	N	Число генотипов			Частоты генотипов		Ассоциация			
Генотипы	492	TT	AT	AA	TT	AT	AA	$\chi^2=17,35$ p= 0,0002		
РШМ	111	18	47	46	0,162	0,423	0,414			
Элиминация ВПЧ	381	22	135	224	0,058	0,354	0,558			

За последние годы было проведено несколько исследований с целью выявления генетических маркеров РШМ. Интерес представляет сравнение результатов зарубежных данных с полученными результатами в рамках настоящего исследования. По результатам исследования Рашкина с коллегами полиморфный локус rs10175462 гена *PAX8* стал первой однонуклеотидной заменой с полногеномной значимой ассоциацией с риском развития РШМ, выявленной за пределами региона генов *HLA* в европейской популяции (Rashkin et al., 2020). Несмотря на то, что в расширенной выборке пациенток, включающей условно здоровых женщин и пациенток с РШМ, значимых ассоциаций выявлено не было, нами была обнаружена тенденция к ассоциации в группе женщин с подтвержденной элиминацией ВПЧ для аллеля G и генотипа GG локуса rs10175462 гена *PAX8*. По нашему мнению, данная когорта не предрасположена к персистенции вируса, следовательно, и к ВПЧ-ассоцииированному РШМ. Таким образом, полученные результаты согласуются с данными исследований групп Рамачандран и Рашкина, где аллель G рассматривается как рисковый вариант. Мы полагаем, что полученные результаты могут свидетельствовать о том, что некоторые рисковые полиморфные варианты, выявленные в рамках GWAS (например, rs10175462 гена *PAX8*), могут по-разному проявляться в различных этнических группах и популяциях. Наши данные указывают на важность воспроизведения результатов GWAS в популяциях, не входящих в оригинальное исследование, как на необходимый этап для подтверждения ассоциаций и изучения рисковых однонуклеотидных замен.

Следует отметить, что результаты нашего исследования согласуются с данными Боудена и соавторов, которые провели GWAS-исследование с участием 273 377 женщин европейского происхождения в возрасте 40–69 лет, включая 4 769 пациенток с цервикальной интрапителиальной неоплазией 3-й степени или инвазивным РШМ. Полногеномный анализ ассоциаций, охватывающий 9 миллионов полиморфных вариантов, показал, что аллель Т локуса rs27069 гена *CLPTM1L* ( $p=2,51\times 10^{-9}$ , ОШ=0,88, ДИ 95% = 0,84–0,92) снижает риск развития РШМ, в то время как частая аллель оказалась рисковой, что согласуется с нашими

результатами (Bowden et al., 2021). Коэль и соавторы провели мета-анализ GWAS, охарактеризовав генетическую архитектуру фенотипов шейки матки на основе данных 9 229 пациентов с РШМ и 490 304 контрольных образцов в европейской и смешанной популяции (Meta-analysis of UK, FinnGen, Japanese RIKEN and Estonian biobanks). В результате было показано, что локус rs27069 гена *CLPTM1L* ассоциирован с РШМ ( $p=1,3\times10^{-14}$ ). В нашем исследовании аллель G этого локуса достиг статистически значимой ассоциации с РШМ ( $p=0.043$ , ОШ=1.395, ДИ 95% =1,01–1,926), что подтверждает данные, полученные Коэлем и соавторами. Кроме того, группа Коэля обнаружила, что аллель Т локуса rs2268177, находящийся в инtronе гена *CDC42*, ассоциирован с РШМ ( $p=3,8\times10^{-8}$ , ОШ=1,12, ДИ 95% =1,07–1,16). В нашем исследовании для этого локуса также была выявлена ассоциация как с рисковым аллелем Т ( $p=3,751\times10^{-5}$ , ОШ=1,945, ДИ 95% =1,413–2,676), так и с генотипом TT ( $p=0,0002$ ,  $\chi^2=17,35$ ) (Koel et al., 2023).

### **3.3 Результаты анализа замен, выявленных в результате секвенирования нового поколения у женщин с клиническим диагнозом рак шейки матки из Республики Башкортостан**

В результате проведенного исследования в когорте 108 женщин с клиническим диагнозом РШМ было выявлено 10 004 нуклеотидные замены, среди которых SNVs составили 9 652, инсерции 145 и делеции 207 замен. В среднем, на один образец герминальной ДНК приходилось по 92 замены в исследуемых регионах.

#### **3.3.1. Патогенные и вероятно патогенные герминальные замены, обнаруженные в результате секвенирования нового поколения у женщин с клиническим диагнозом рак шейки матки из Республики Башкортостан**

На этапе обработки данных ресурсом «Variant Interpreter» (Illumina, Калифорния, США) лишь 148 замен нуклеотидной последовательности генов (1,48%), непосредственно участвующих в опухолеобразовании, были отнесены в категорию замен с недоброкачественным значением (то есть категории VUS, LP, P) (таблица 15). При этом при дальнейшей обработке данных в других ресурсах

было показано, что 35 из них (23,6%) являются доброкачественными согласно литературным источникам и базам данных, 105 (70,9%) относятся к категории VUS и их клиническую значимость еще предстоит раскрыть. Наибольшее число выявленных замен (22 из 26), значение которых остается неизвестным, приходится на целевые области гена *ROS1*, что мы связываем с включением в таргетную панель его инtronных областей.

Таблица 15. Распределение герминальных замен, выявленных у женщин с клиническим диагнозом РШМ, по генам и соответствующим сигнальным путям

Путь	Ген	Общее число мутаций	Патогенные или вероятно патогенные (P/LP)	Неясное значения (VUS)
Контрольные точки клеточного цикла	<i>APC</i>	11 (7,4%)	1	6
	<i>TP53</i>	7 (4.7%)	0	7
	<i>CHEK2</i>	6 (4.0%)	1	5
	<i>TERT</i>	1 (0,6%)	0	1
	<i>BRCA2</i>	11 (7,4%)	1	4
	<i>BRCA1</i>	5 (3,3%)	0	3
Регуляторы клеточной пролиферации, миграции и дифференцировки	<i>RET</i>	13 (8,7%)	0	7
	<i>MET</i>	11 (7,4%)	0	8
	<i>KIT</i>	7 (4,7%)	0	5
	<i>ALK</i>	7 (4,7%)	0	7
	<i>PIK3CA</i>	2(1,3%)	0	1
	<i>PDGFRA</i>	3 (2,0%)	0	2
	<i>ROS1</i>	26 (17,5%)	0	26
	<i>EGFR</i>	8 (5,4%)	0	6
	<i>BRAF</i>	1 (0,6%)	1	0
	<i>ERBB2</i>	5 (3,3%)	0	3
Микросателлитная нестабильность (dMMR)	<i>ALB1</i>	5 (3,3%)	0	2
	<i>MSH2</i>	3 (2,0%)	2	0
	<i>MSH6</i>	5 (3,3%)	1	4
	<i>MLH1</i>	2 (1,3%)	0	0
Предиктор ответа на терапию	<i>PMS2</i>	7 (4,7%)	0	7
	<i>IDH2</i>	1 (0,6%)	0	1
	<i>CD274</i>	1 (0,6%)	0	1

Семь замен (4,7 %) являются патогенными или вероятно патогенными, а полиморфный вариант rs1042522 в гене *TP53* ассоциирован в ряде исследований с риском развития РШМ (0,6%) (таблица 16).

Таблица 16. Спектр и частоты патогенных и вероятно патогенных замен вprotoонкогенах и генах онко-супрессоров

Ген	Вариант	Позиция (GRCh37)	Частота гетерозигот (%)	Значимость варианта
<i>CHEK2</i>	c.470T>C p.Ile157Thr	chr22:29121087	0,027	Вероятно патогенная
<i>APC</i>	c.2507C>G p.Ser836Ter	chr5:112173798	0,009	Патогенная
<i>BRCA2</i>	c.9154C>T p.Arg3052Trp	chr13:32954180	0,009	Патогенная
<i>BRAF</i>	c.1592G>T p.Trp531Leu	chr7:140476814	0,009	Вероятно патогенная
<i>MSH2</i>	c.350G>A p.Trp117Ter	chr2:47635679	0,009	Патогенная
<i>MSH2</i>	c.2116delG p.Asp706GlyfsTer11	chr2:47703614	0,009	Патогенная
<i>MSH6</i>	c.3261dupC p.Phe1088LeufsTer5	chr2:48030639	0,009	Патогенная

*Полиморфный вариант Pro72Arg гена TP53 и ее влияние на  
предрасположенность к раку шейки матки*

Нуклеотидные замены в гене *TP53* составили 4,72% выявленных замен среди опухолевых генов женщин с РШМ. 6 из 7 замен относятся к категории VUS и только вокруг одной из них уже много лет ведутся споры – это замена пролина на аргенин в 72 положении. У 87,03% пациенток (94/108) была выявлена миссенс замена в кодоне 72 гена *TP53* (c.215C>G , p.Pro72Arg, rs1042522, chr17:7579472) 44 из них в гомозиготном, 50 - в гетерозиготном состоянии.

В нашем исследовании не выявлено ассоциаций аллелей и генотипов локуса rs1042522 гена *TP53* с РМШ (таблица 17). У 97% женщин РШМ манифестирувал в конце 2020-2021 году и мы можем сделать анализ только трехлетней выживаемости пациенток. Для 71 пациентки из 106 (66,98%) комбинированная

химиолучевая терапия прошла успешно, у 35 (33,01%) не наблюдался достаточный терапевтический эффект, но не выявлены корреляции между генотипами и ответом на терапию. Однако, при анализе группы пациенток мы определили, что медиана возраста манифеста РШМ для больных, носителей генотипа CC составила 53,5 года, CG – 52,3 года, GG – 47,6 лет. Таким образом, разница в медиане возраста манифестации заболевания для пациенток с генотипом GG составила до 5,9 лет, что предполагает более раннее начало заболевания для носителей гомозиготного варианта p.53Arg/Arg. Полученные результаты позволяют предположить, что фармакогеномный профиль, основанный на генетическом профиле пациентов, включая анализ генотипов *TP53*, может индивидуализировать лечение и помочь в выборе методов терапии, которые могут улучшить клинический результат и снизить токсичность для пациентов.

Таблица 17. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs1042522 гена *TP53* между пациентками с РШМ и малой группой сравнения

Аллели										
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ		$\chi^2$	ОШ	95% ДИ	P		
rs1042522	G	0,639	0,627		0,04	1,05	0,64-1,71	0,84		
Генотипы										
rs1042522	N	Число генотипов			Частоты генотипов			$\chi^2$ , p		
Генотипы	159	CC	CG	GG	CC	CG	GG	$\chi^2=0,04$ p=0,98		
РШМ	108	14	50	44	0,130	0,463	0,407			
Элиминация ВПЧ	51	7	24	20	0,137	0,471	0,392			

*Совместное носительство мутаций в генах APC и BRAF у пациентки с  
плоскоклеточным раком шейки матки*

Вариант c.2507C>G, p.Ser836Ter в гене *APC* (rs1580623270 chr5:112173798) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщин (0,92%). Данная замена считается патогенной, так как создает терминирующий кодон и, по прогнозам, приводит к преждевременной остановке синтеза белка. Согласно базе данных «Uniprot», мутации в данном гене ассоциированы с такими заболеваниями как семейный аденоматозный полиоз 1, наследственная десмоидная болезнь, медуллобластома, рак желудка, гепатоцеллюлярная карцинома, аденокарцинома желудка и проксимальный полипоз желудка.

Замены в киназах, выявленные в результате исследования, представляют 45,27 % идентифицированных замен в опухолевых генах (67 из 148). В данной структуре на мутации и полиморфизмы в гене *BRAF* приходится всего 1 мутация, которая считается патогенной.

Миссенс вариант замены c.1592G>T, p.Trp531Leu в гене *BRAF* (rs397507478, chr7:140476814) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины (0,92%). Согласно базе данных ClinVar, данная замена считается патогенной, однако нет информации о функциональном анализе этого варианта. С использованием нормальной структуры белка, построенной с помощью «SWISS-MODEL», воспользовавшись «DynaMut2», мы выяснили, что замена триптофана на лейцин в 531 положении белка *BRAF* дикого типа является дестабилизирующей с показателем -2,42 kcal/mol( $\Delta\Delta G^{\text{Stability}}$ ). Тем не менее эффект замены кодона TGG на TTG согласно 5 предсказательным программам является доброкачественной (SIFT, PolyPhen-2, CADD, REVEL, REVEL, MetaLR, MutationAssesor). Однако с учетом того, что замена p.Trp531Leu приходится на протеинкиназный домен и в той же геномной позиции находится патогенный вариант, приводящий к образованию преждевременного терминирующего кодона, необходимо провести функциональные исследования для точного определения ее клинической значимости. С выявлением активирующих мутаций в гене *BRAF* при широком спектре злокачественных новообразований появились эффективные ингибиторы,

нацеленные на BRAF (вемурафениб (зелбораф) и дабрафениб) (Poulikakos et al., 2022). Хотя среди мутаций гена *BRAF* чаще всего выявляется мутация V600E, с появлением секвенирования следующего поколения, спектр мутаций в гене *BRAF* постоянно расширяется (Yaeger et al., 2019).

Обнаружены две миссенс замены в сочетанном состоянии – c.2507C>G в гене *APC* и c.1592G>T в гене *BRAF* у пациентки 1959 года рождения, обратившейся за медицинской помощью в 2021 году по поводу рецидива РШМ. Впервые диагноз был установлен в 2020 году и звучал как РШМ ст4 гр4 с метастазами в подвздошные лимфоузлы и метастазами по брюшине (T4N1M1) (по МКБ-10: C53.8). Пациентка скончалась в ноябре 2021 года, заболевание протекало достаточно агрессивно и стремительно. Такое сочетанное носительство двух мутаций в генах супрессора опухоли и серин/треониновых протеинкиназ не описано ранее в литературе.

#### *Миссенс вариант Ile157Thr в гене CHEK2 и его влияние на предрасположенность к раку шейки матки*

Герминальные мутации в генах, кодирующих белки, регулирующих репарацию ДНК и ответ на двухцепочные разрывы ДНК, были признаны патогенными факторами наследственной предрасположенности к раку. Было доказано, что группа генов *ATM-CHEK2-p53* инициируют основную ответную реакцию на повреждение ДНК и предположительно являются барьером для возникновения рака. Патогенные герминалные мутации в гене *CHEK2* входят в число наиболее частых изменений при различных опухолях, их роль была подтверждена при таких гендерспецифичных опухолях, как рак молочной железы и рак простаты (Stolarova et al., 2020).

В структуре выявленных генетических вариантов на замены в гене *CHEK2* приходится 6 из 148 (4,0%). При этом 5 из них относят к категории VUS, а одна является патогенной. Миссенс вариант c.470A>G, p.Ile157Thr в гене *CHEK2* (rs17879961, chr22:29121087) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 3 женщин (2,7%). У пациентки с сочетанием АК шейки матки (T3bN0M0) и раком молочной железы. Манифестация рака шейки матки произошла в возрасте 73 лет с

летальным исходом в течении года. У пациенток с плоскоклеточным РШМ манифестация заболевания произошла в 49 лет (T2bN1M0) и 62 года (T2aN0M0). Несмотря на то, что 6 предиктивных программ *in silico* интерпретируют данную замену как доброкачественную (CADD, REVEL, SpliceAI, Pangolin, PolyPhen, phyloP), ее также расценивают как вероятно патогенную при раке молочной железы (Cybulski et al., 2011), патогенную для предрасполагающего к раку синдрому (Han et al., 2013) и патогенной для синдрома Ли-Фраумени (Boonen et al., 2022). По данным «oncoBRCA» данный вариант патогенен или вероятно патогенен для нескольких видов рака. Согласно базе данных «GnomAD» (v4.0.0.) частота минорного аллеля составляет 0,003. Согласно базе данных «UniProt» замена изолейцина на треонин в 157 положении белка CHEK2 приходится на домен FHA, который функционально значим. С использованием нормальной структуры белка, построенной с помощью «SWISS-MODEL», воспользовавшись «DynaMut2», мы выяснили, что данная замена является дестабилизирующей с показателем  $-1,2 \text{ kcal/mol}(\Delta\Delta G^{\text{Stability}})$ . В качестве дополнительного исследования мы решили попробовать изучить частоту данной замены в группе сравнения, которая представляла собой здоровых женщин, в анамнезе которых была зафиксирована спонтанная элиминация ВПЧ, на основании чего мы пришли к выводу, что они не предрасположены к персистентному типу вирусоносительства, а как следствие к РШМ. В результате, нами были получены данные о том, что 3 (5,88%) из 51 женщины из группы сравнения являлись носителем варианта p.Ile157Thr в гене *CHEK2* в гетерозиготном состоянии. На основании того, что частота встречаемости патогенного варианта выше в группе сравнения (5,88%), чем в группе пациенток с РШМ (2,7%), мы сделали вывод, что данная мутация доброкачественна для РШМ и не ассоциирована с риском его развития (таблица 18). Однако на сегодняшний день еще рано делать выводы, влияет ли эта замена на течение заболевания.

Таблица 18. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs17879961 гена *CHEK2* между пациентками с РШМ и малой группой сравнения (с использованием поправки Холдейна–Энскомба)

Аллели								
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ		Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ	$\chi^2$	ОШ	95% ДИ	P
rs17879961	G	0,014		0,029	1,31	0,47	0,12-1,77	0,25
Генотипы								
rs17879961	N	Число генотипов			Частоты генотипов			$\chi^2$ , p
Генотипы	159	AA	AG	GG	AA	AG	GG	$\chi^2=1,19$ p=0,55
РШМ	108	105	3	0	0,486	0,028	0,0	
Элиминация ВПЧ	51	48	3	0	0,470	0,059	0,0	

*Миссенс вариант Arg3052Trp в гене BRCA2 и его влияние на предрасположенность к раку шейки матки*

Белки *BRCA1* и *BRCA2* играют ключевую роль в регуляции репарации ДНК и поддержании целостности генома (Shiloh et al., 2001). В нашем исследовании было выявлено 16 (10,81%) замен в данных генах, одна из которых являлась патогенной. Миссенс вариант замены c.9154C>T, p.Arg3052Trp в гене *BRCA2* (rs45580035, chr13:32954180) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщин (0,92%). Согласно всем использованным базам данных данная замена патогенна для предрасполагающего к раку синдрому, наследственным формам рака молочной железы и раку яичников. Данная замена выявлена у пациентки с манифестацией плоскоклеточного РШМ (T3N1M0) в возрасте 58 лет с летальным исходом в течении 2 лет.

## *Патогенные и вероятно патогенные замены в генах репарации ошибочного спаривания оснований*

Мутации в генах репарации ошибочного спаривания (MMR), такие как *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* и *PMS2*, ассоциированы с наследственным неполипозным колоректальным раком (Синдром Линча). Система MMR распознает и исправляет ошибки ДНК из-за несовпадающих нуклеотидов, при этом белки MSH играют ключевую роль в распознавании и инициировании процесса восстановления MMR (Bertelsen et al., 2019). 17 из 148 замен (11,4%) выявленных в результате нашего исследования были обнаружены в данных генах. При этом 3 из 17 замен оказались патогенными и вероятно патогенными.

Вариант c.350G>A , p.Trp117Ter в гене *MSH2* (rs786202083, chr2:47635679) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщин (0,92%). Замена представляет собой нонсенс-вариант, заменяющий триптофан на преждевременный стоп-кодон (TGG>TAG). Ожидается, что это приводит к потере нормальной функции белка ввиду его усечения, либо ввиду нонсенс-опосредованного распада мРНК. Данная мутация обнаружена у женщины 48 лет с сочетанием РШМ и рака тела матки. У пациентки по результатам иммуногистохимического исследования опухоли тела матки установлена микросателлитная нестабильность и на сегодняшний день она получает 9 линию иммунотерапии с удовлетворительным терапевтическим ответом.

Микроделеция c.2116delG, p.Asp706GlyfsTer11 со сдвигом рамки считывания в гене *MSH2* в геномной координате chr2:47703614 была обнаружена у женщины 1963 года рождения, у которой в 2015 году был диагностирован плоскоклеточный РШМ ст 3Б гр 2, тогда же она получила радикальный курс химио-лучевой терапии (ХЛТ). В 2021 году на фоне рецидива заболевания прошла еще курс ХЛТ, за которым последовали осложнения. Пациентка скончалась в январе 2022 года. На момент исследования данная мутация классифицировалась как вероятно патогенная и её эффект был расскрыт недостаточно, но мы обладали надежными морфологическими и молекулярно-генетическими методами диагностики микросателлитной нестабильности в ткани,

мы решили провести дополнительные исследования для пациентки с данной заменой. На диагностическом биопсийном материале первичной опухоли из парафинового гистологического блока 2015 года мы провели исследование на микросателлитную нестабильность (dMMR) иммуногисохимическим методом и не выявили утрату экспрессии MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 в жизнеспособных опухолевых клетках. Кроме того, методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе 3500xL проведено исследование 5 микросателлитных локусов (MSI): NR-21, BAT26, BAT-25, NR-24, NR-27 (рисунки 7-8). В результате проведенного исследования обнаружена 1 аллельная вариация исследуемых локусов, что свидетельствует об отсутствии микросателлитной нестабильности. Ранее такие результаты интерпретировались как MSI-low, однако в 2018 году на консенсусе ESMO по диагностике дефицита MMR было принято решение считать несуществующим статус MSI-low (Тряпкин и др., 2019). Таким образом, мы можем сделать вывод, что герминальная замена p.Asp706GlyfsTer11 не оказала патогенного влияния на опухоль и не является клинически значимой. Не смотря на это данная микроделеция, согласно ClinVar, реклассифирирована как патогенный вариант.

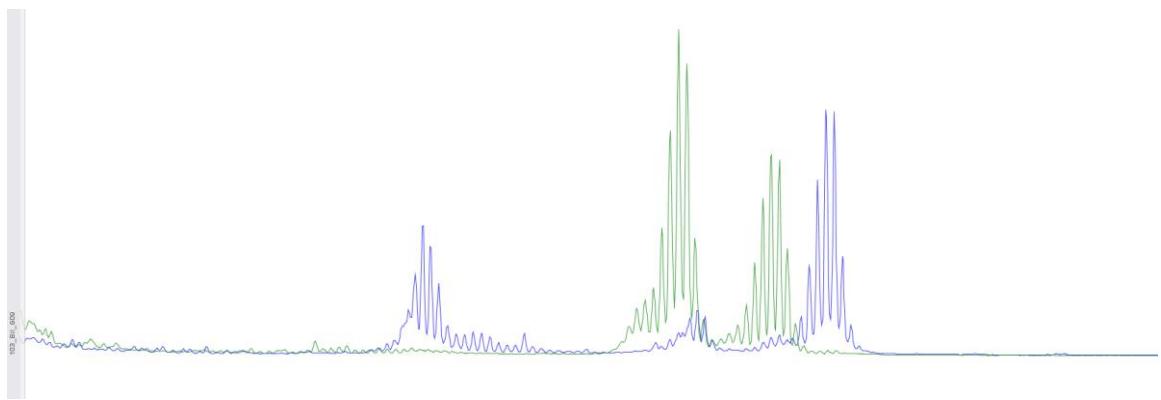


Рисунок 7 – Методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе 3500xL проведено исследование 5 микросателлитных локусов (MSI): NR-21 BAT-26 BAT-25 NR-24 NR-27. В результате проведённого исследования микросателлитная нестабильность не выявлена

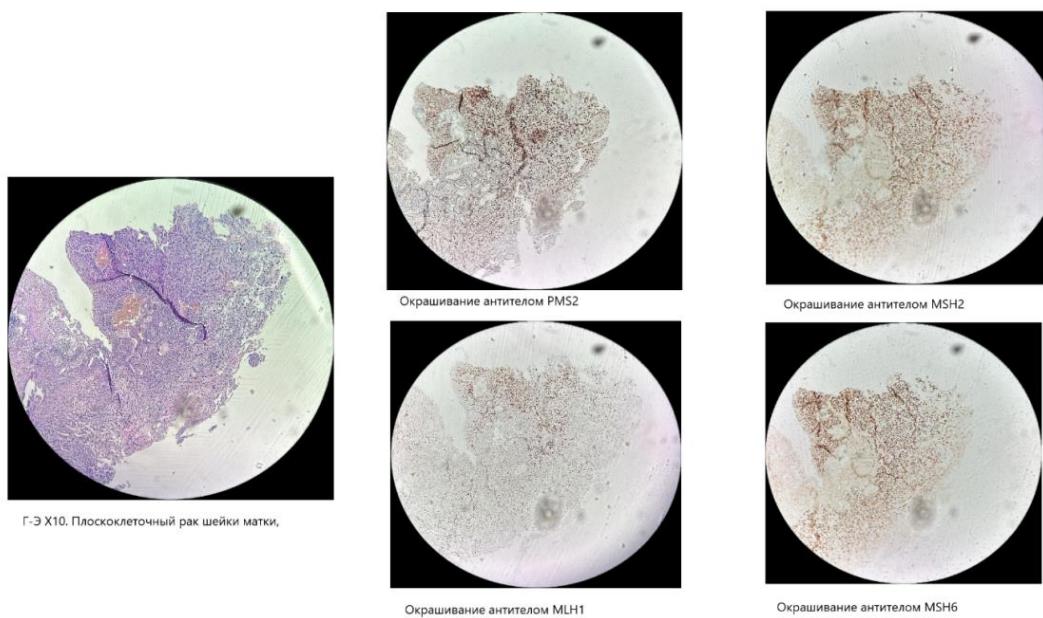


Рисунок 8 – Иммуногистохимическое окрашивание препарата рака шейки матки панелью dMMR. (Примечание: т.к. блок с тканью был приготовлен в 2015 году, мы наблюдаем некоторые дефекты окрашивания ввиду достаточно долгого срока хранения материала для иммуногистохимического исследования, однако, несмотря на некоторую гетерогенность окрашивания, в жизнеспособных опухолевых клетках сохранна экспрессия белков reparации неспаренных оснований ДНК)

Вариант c.3261dupC, p.Phe1088LeufsTer5 со сдвигом рамки считывания в гене *MSH6* в геномной координате chr2:48030639 был выявлен у пациентки 1962 года рождения с умеренно-дифференцированным инвазивным плоскоклеточным РШМ (ст. IIb T2bN1M1nod гр. IV), манифестирующим в ноябре 2021 года. В феврале 2022 года была дообследована и получила курс ХЛТ. Летом 2023 года заболевание прогрессировало. Пациентка скончалась осенью 2023 года. На момент исследования данный генетический вариант был классифицирован как вероятно патогенный, поэтому было принято решение о проведении дополнительного исследования. На диагностическом биопсийном материале первичной опухоли из парафинового гистологического блока 2022 года было проведено иммуногистохимическое исследование, демонстрирующее сохранность

экспрессии белков MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 в жизнеспособных опухолевых клетках. Кроме того, методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе 3500xL проведено исследование 5 микросателлитных локусов (MSI): NR-21, BAT26, BAT-25, NR-24, NR-27. В результате проведенного исследования обнаружены 2 аллельные вариации исследуемых локусов, что указывает на присутствие признаков микросателлитной нестабильности MSI-High (рисунки 9-10). Таким образом, мы можем сделать вывод, что герминальная замена p.Phe1088LeufsTer5 патогенна и оказала влияние на течение заболевания. Данный случай выявления микросателлитной нестабильности демонстрирует противоречивые результаты между двумя методиками выявления MSI. В литературе имеются данные, что в отдельных ситуациях ИГХ тест может оказаться ложноотрицательным в случаях некоторых миссенс мутаций или метилирования промотора гена *MLH1* (Luchini et al., 2019). Судя по всему, в нашем случае следует брать во внимание также герминальную мутацию в гене *MSH6*, обусловленную сдвигом рамки считывания. В настоящее время замену классифицируют, как патогенную. Эта замена характерна для пациентов с синдромом Линча, в том числе для колоректального рака и рака эндометрия (Zhang et al., 2024).

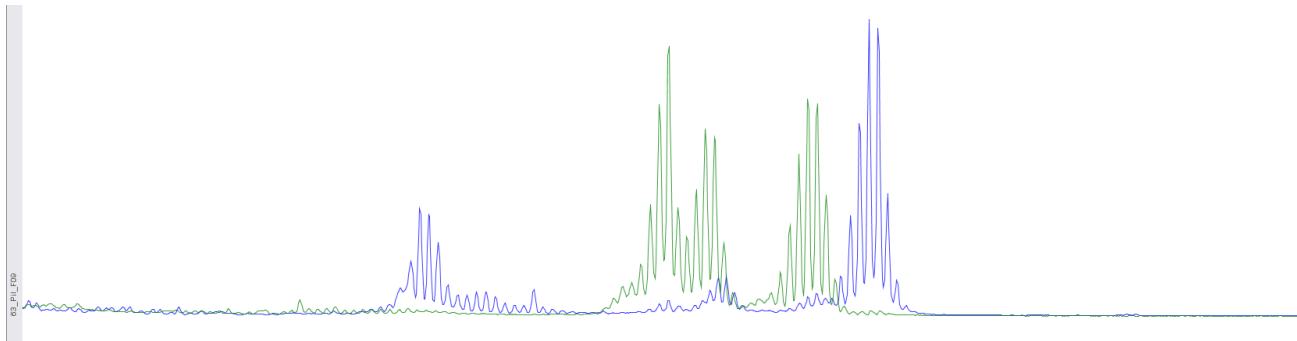


Рисунок 9 - Методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе 3500xL проведено исследование 5 микросателлитных локусов (MSI): NR-21 BAT-26 BAT-25 NR-24 NR-27. В результате проведённого исследования обнаружены аллельные вариации исследуемых локусов, что указывает на присутствие признаков микросателлитной нестабильности MSI-High

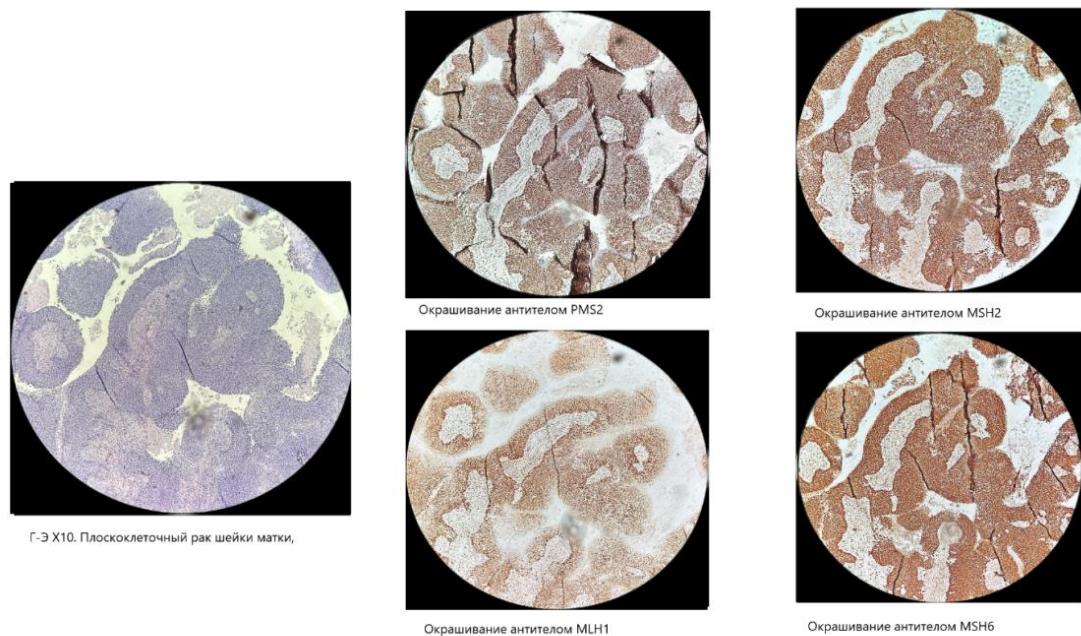


Рисунок 10 - Иммуногистохимическое окрашивание препарата рака шейки матки панелью dMMR. (Примечание: наблюдается сохранность экспрессии белков репарации неспаренных оснований)

Исходя из полученных результатов, целесообразно использовать молекулярно-генетический метод поиска микросателлитной нестабильности в качестве основного для пациентов с РШМ.

Мы имеем основания, опираясь на клиническую картину пациенток, считать, что патогенные мутации зародышевой линии существенно влияют на течение и исход заболевания, значительно утяжеляя его. Дальнейшее изучение данного вопроса может существенно повлиять на коррекцию лечения пациентов с онкологическим профилем заболевания, в том числе с РШМ.

### 3.3.2 Редкие замены (менее 5%) неясной клинической значимости в онкогенах и генах супрессорах опухоли, выявленные у пациенток с клиническим диагнозом рак шейки матки

После исключения замен с неопределенной клинической значимостью, расположенных в инtronных областях, было отобрано 54 редких варианта (частота встречаемости <5%) в опухолевых генах. Согласно ресурсу «Variant Interpreter», данные замены были классифицированы как VUS, LP или P, однако в других базах данных они могут аннотироваться как VUS, LB или B. Отобранные варианты были подвергнуты *in silico* анализу с использованием биоинформационических инструментов. Замены в ассоциированных с раком генах были условно разделены на три группы: гены клеточного цикла, гены-регуляторы клеточной пролиферации, миграции и дифференцировки (преимущественно протеиназы) и гены системы репарации неспаренных состояний.

#### *Редкие замены неясной клинической значимости в генах клеточного цикла*

Высококонсервативные пути репарации ДНК и контрольных точек клеточного цикла позволяют клеткам справляться как с эндогенными, так и с экзогенными источниками повреждения ДНК. То, насколько человек подвергается воздействию этих агентов, и то, как его клетки реагируют на повреждение ДНК, являются критическими факторами, определяющими, заболеет ли этот человек раком (Kastan, Bartek, 2004).

При использовании Variant Interpreter было выделено 6 миссенс и 1 синонимичная замена неясной клинической значимости в гене *APC*, 4 миссенс-замен в гене *BRCA2*, 3 замены в гене *BRCA1*, одна из которых является синонимичной, 3 миссенс и одна синонимичная замена в гене *CHEK2* (таблица 19).

Таблица 19. Редкие замены неясной клинической значимости в генах клеточного цикла

Ген	Вариант	Позиция (GRCh37)	Частота гетерозигот (%)	Частота по базе данных GnomAD
<i>APC</i>	c.3176A>T p.Glu1059Val	chr5:112174467	0,009	0,000003
	c.c.3949G>C p.Glu1317Gln	chr5:112175240	0,009	0,007
	c.7862C>G p.Ser2621Cys	chr5:112179153	0,018	0,005
	c.8162G>A p.Arg2721His	chr5:112179453	0,009	0,00002
	c.6497G>A p.Arg2166Gln	chr5:112177788	0,009	0,00002
	c.6019T>C p.Tyr2007His	chr5:112177310	0,009	0,00004
	c.7392T>C p.Ser2464=)	chr5:112178683	0,009	6,195e-7
<i>BRCA2</i>	c.10234A>G p.Ile3412Val	chr13:32972884	0,037	0,01
	c.5070A>C p.Lys1690Asn	chr13:32913562	0,009	0,0002
	c.5479A>G p.Ile1827Val	chr13:32913971	0,009	0,000002
	c.7544C > T p.Thr2515Ile	chr13:32930673	0,009	0,005
<i>BRCA1</i>	c.3466C > T p.Asp1156Asn	chr17:41244082	0,009	6,195e-7
	c.3230C>T p.Gly1077Glu	chr17:41244318	0,009	6,197e-7
	c.2697C>G p.Val899=)	chr17:41244851	0,009	Нет данных
<i>CHEK2</i>	c.972C>G p.Cys324Trp	chr22:29095862	0,009	0,000002
	c.1312C>A p.Asp438Tyr	chr22:29091178	0,009	0,0004

<i>CHEK2</i>	c.1117T>C p.Lys373Glu	chr22:29091840.	0,009	0,0006
	c.1116C>T p.Ser372=)	chr22:29091841	0,009	0,0006

Опухолевый супрессор *APC* доказано вовлечен в канцерогенез шейки матки. При РШМ часто наблюдается подавление экспрессии *APC* путем гиперметилирования его промотора (Song et al., 2009). Мутации или эпигенетическая инактивация *APC*, действующие как важные онкогенные механизмы при ряде типов рака, часто связаны с aberrантной активацией пути Wnt/β-катенина. Согласно этим наблюдениям, была выдвинута гипотеза, что изменение *APC* может привести к дезрегуляции β-катенина и аномальной экспрессии прямых мишней пути Wnt в инфицированных ВПЧ клетках РШМ (Ayala-Calvillo et al., 2018). Замены p.Glu1317Gln, p.Ser2621Cys и p.Ser2464=) гена *APC* имеют согласно «ClinVar» доброкачественный характер и их распространенность в выборке больных близка в общемировой, на основании чего они были исключены из дальнейшего анализа. Замены p.Glu1059Val, p.Arg2721His, p.Arg2166Gln и p.Tyr2007His были интерпретированы нами как замены с неизвестной значимостью даже после применения различных *in silico* инструментов.

Замена c.3176A>T, p.Glu1059Val в гене *APC* (rs1765352701, chr5:112174467) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестацией ПР в 62 года (T3bN1M0). Согласно «ClinVar» замена имеет неопределенную значимость. Частота данной замены отличается от общемировой и составляет 0,005 против 0,000003. Вариант E1059V, расположенный в кодирующем 15 экзоне гена *APC*, представляет собой замену полярной глутаминовой кислоты неполярным валином, то есть аминокислотой с противоположными свойствами. Кроме того, предикторы *in silico* для этой замены не позволяют точно предсказать патогенность. Предсказательные программы противоречивы (PolyPhen, MetaLR – P; SIFT – VUS; CADD, MutationAssessor – B). Согласно AlphaMissense замена скорее доброкачественна (LB 0,403). В результате анализа DynaMut2 замена

добропачественна (LB 0,39). Согласно SpliceAI не влияет на сплайсинг белка. Данный вариант не описан в литературе и существующих данных мало, чтобы однозначно сделать выводы о его значимости.

Замены с.8162G>A, p.Arg2721His в гене *APC* (rs587780606, chr5: 112179453) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщин с ПР, манифестирувшим в 58 лет (T3bN1M1). Согласно ClinVar она носит противоречивый характер. Замена является крайне редкой и не описана в литературе. Изменение представляет собой замену аргинина, который является основным и полярным, на гистидин, который так же является основным и полярным. Предсказательные программы говорят скорее о ее доброкачественности (PolyPhen, SIFT – VUS; MetaLR, CADD, MutationAssessor – B), но в результате анализа DynaMut2 замена патогенна (LP -0,3). Согласно AlphaMissense замена доброкачественна (LB 0,07). По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. В совокупности данных мы можем заключить, что замена имеет неопределенную значимость.

Замены с.6497G>A, p.Arg2166Gln в гене *APC* (rs752091655, chr5: 112177788) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщин с ПР, манифестирувшим в 29 лет (T2bN1M1). Аргинин и глутамин являются аминокислотами с похожими свойствами. Согласно ClinVar замена носит противоречивый характер. Замена является крайне редкой и не описана в литературе. Предсказательные программы скорее говорят о ее доброкачественности (MetaLR – P; SIFT – VUS; CADD, PolyPhen, MutationAssessor – B). в результате анализа DynaMut2 замена патогенна (LP – 0,17). Согласно AlphaMissense замена доброкачественна (LB 0,256). По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. В совокупности данных замена скорее противоречива.

Замена с.6019T>C, p.Tyr2007His в гене *APC* (rs745811356, chr5: 112177310) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщин с ПР, манифестирувшим в 51 лет (T2bN1M1). Замена тирозина на гистидин в 2007 положении приводит к консервативной замене аминокислот в кодируемой

последовательности белка. Замена не описана в литературе, и согласно ClinVar носит противоречивый характер. 3 из 6 предсказательных программ говорят о ее патогенности (PolyPhen, Revel, MetaLR – P; SIFT, MutationAssessor – VUS; CADD – B), в результате анализа DynaMut2 замена доброкачественна (LB 0,87). Однако согласно AlphaMissense замена патогенна (LP 0,805). Кроме этого, замена имеет высокий бал патогенности согласно PrimateAI-3D. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. В совокупности данных замена вызывает неоднозначные впечатления и относится к категории VUS.

Риск возникновения РШМ значительно повышен у женщин из семей с патогенными вариантами в генах *BRCA1* и *BRCA2* (Rhiem et al., 2007). Замены p.Ile3412Val, p.Lys1690Asn и p.Thr2515Ile в гене *BRCA2* и замена p.Val899=) в гене *BRCA1* имеют согласно «ClinVar» доброкачественный характер, на основании чего они были исключены из дальнейшего анализа.

Замена c.5479A>G, p.Ile1827Val в гене *BRCA2* (rs80358770, chr13:32913971) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестирувшим ПР в 64 год (T2aN0M0). Изменение приводит к консервативной замене аминокислот в кодируемой последовательности белка. Согласно ClinVar она носит противоречивый характер: 4 источника относят ее к категории VUS, 4 к LB. Имеет крайне редкую частоту, имеет одно описание в литературе в контексте замены, попавшей в базу данных замен генов предрасположенности к раку молочной железы (Szabo et al., 2000). Все предсказательные инструменты интерпретируют ее как доброкачественную. Таким образом, данная замена вероятно является доброкачественной и не внесла свой вклад в развитие РШМ у пациентки.

Замена c.3466C>T, p.Asp1156Asn в гене *BRCA1* (rs1064793302, chr17:41244082) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестирувшим ПР в 37 лет (T2aN0M0). Вследствии данной замены аспарагиновая кислота в 1156 кодоне заменена аспарагином, аминокислотой с очень схожими свойствами. Согласно ClinVar замена носит противоречивый характер: 5 источников относят ее к категории VUS, 1 к LB. Имеет крайне редкую

частоту, не описана в литературе. Предсказательные программы противоречивы, однако нет данных о ее патогенном эффекте (PolyPhen, MutationAssessor – VUS; Revel, MetaLR, SIFT, MutationAssessor, CADD – B). В результате анализа DynaMut2 замена добропачественна (LB 0,28). Согласно AlphaMissense замена добропачественна (LB 0,081). В результате анализа DynaMut2 замена добропачественна (LB 0,39). Согласно SpliceAI не влияет на сплайсинг белка. Проанализировав данные, мы можем заключить, что замена добропачественна и не имеет влияния на предрасположенность к ВПЧ-зависимому РШМ.

Замена c.3230C>T, p.Gly1077Glu в гене *BRCA1* (rs1567792424, chr17: 41244318) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины из выборки с манифестирувшим ПР в 44 года (T2aN0M0). В результате данной замены глицин в 1077 кодоне замещается глутаминовой кислотой, аминокислотой со схожими свойствами. Согласно ClinVar она носит противоречивый характер: 5 источников относят ее к категории VUS, 1 к LB. Имеет крайне редкую частоту, не описана в литературе. Предсказательные программы противоречивы (MetaLR – P; PolyPhen, MutationAssessor, Revel, SIFT, MutationAssessor, CADD - B). В результате анализа DynaMut2 замена добропачественна (LB 0,28). Согласно AlphaMissense замена добропачественна (LB 0,111). В результате анализа DynaMut2 замена добропачественна (LP -0,47). Согласно SpliceAI не влияет на сплайсинг белка. Данных об этой замене немного, чтобы сделать достоверные выводы о ее значимости.

Патогенные герминалные мутации в гене *CHEK2* входят в число наиболее частых изменений при различных опухолях. Их ассоциация была подтверждена для таких гендерно-специфичных опухолей, как рак молочной железы и рак простаты (Stolarova et al., 2020). В гене *CHEK2* выявлено 4 однонуклеотидных полиморфных варианта, все они описаны ранее в литературе либо о них имеются упоминания в базах данных. Синонимический вариант p.Ser372=) согласно базе данных «ClinVar» обладают добропачественным значением. К категории вариантов с неизвестной клинической значимостью (VUS) относятся замены p.Cys324Trp, p.Asp438Tyr и p.Lys373Glu.

Неоднозначный согласно «ClinVar» миссенс вариант c.972C>G, p.Cys324Trp в гене *CHEK2* (rs1060502712, chr22:29095862) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с манифестирувшим плоскоклеточного РШМ (T3b1N1M0) в 52 года. Это изменение последовательности заменяет цистеин, который нейтрален и слабополярен, на триптофан, который нейтрален и слабополярен, в кодоне 324 белка CHEK2. Вариант не описан в литературе. Предсказательные компьютерные алгоритмы при *in silico* анализе показали противоречивые данные (PolyPhen, SIFT – P; Revel, MetaLR, MutationAssessor, MutationAssessor, CADD – B). Согласно SpliceAI не влияет на сплайсинг белка. Согласно DynaMut2 данная замена приводит к дестабилизации белка CHEK2 с показателем -1,5 kcal/mol ( $\Delta\Delta G^{\text{Stability}}$ ). При этом последовательность аминокислот 321-340 (EATCKLYFYQMLLAVQYLHE) приходится на Helix-структуру в белке, что говорит о ее функциональной значимости. Согласно базе данных структур белков «AlphaFold» замена цистеина в 324 положении белка дикого типа CHEK2 вероятно патогенна (средний показатель патогенности AlphaMissense: 0,993). Кроме этого, замена имеет высокий бал патогенности согласно PrimateAI-3D (0,82 при ген-специфическом пороге 0,67). Кроме того, была выявлена значительная разница в частоте встречаемости замены между нашей выборкой и общемировой: 0,005 против 0,000002, что говорит в пользу ее патогенности. Для аллеля С локуса rs1060502712 гена *CHEK2*, несмотря на его редкую встречаемость, при использовании поправки Холдейна–Энскомба продемонстрирована ассоциация с риском развития РМШ ( $p=0,05$ ) (таблица 20). В связи с крайней редкостью этого варианта трудно сделать выводы о его вкладе в патогенез РШМ, опираясь исключительно на результаты ассоциативного анализа. Однако, если учитывать область белка, на которую приходится эффект замены, данные DynaMut2, AlphaMissense, PrimateAI-3D и выявленную ассоциацию с аллелем С, замена (p.Cys324Trp) гена CHEK2 может обладать патогенным потенциалом.

Таблица 20. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs1060502712 гена CHEK2

rs1060502712	N	Частота вероятно-го аллеля риска	$\chi^2$ , p, ОШ, (95%ДИ) с использованием поправки Холдейна–Энскомба	Число генотипов		
				CC	CG	GG
РШМ	492	C	$\chi^2=3,8$ p=0,05 ОШ = 5,92 (0,78 – 45,1)	0 (0,0)	1 (0,009)	107 (0,991)
	108	1 (0,005)		0 (0,0)	0 (0,0)	384 (1,0)
Контроль	384	0				

Миссенс вариант c.1312C>A, p.Asp438Tyr в гене CHEK2 (rs200050883, chr22: 29091178) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с манифестирувшим ПР шейки матки (T3bN0M0) в 45 лет. Предсказательные компьютерные алгоритмы при *in silico* анализе показали противоречивые данные (SIFT, PolyPhen – P; CADD, MetaLR, MutationAssessor – В). Опираясь на анализ DynaMut2, мы выяснили, что данная замена приводит к дестабилизации белка CHEK2 с показателем -0,5 kcal/mol ( $\Delta\Delta G^{\text{Stability}}$ ). Согласно базе данных структур белков «AlphaFold» замена цистеина в 324 положении белка дикого типа CHEK2 с неопределенной значимостью (средний показатель патогенности AlphaMissense: 0,256). Согласно SpliceAI не влияет на спlicing белка. При этом последовательность аминокислот приходится на протеинкиназный домен в белке, что говорит о ее функциональной значимости. Данная замена хорошо описана в литературе. Несмотря на то, что ранее данный вариант был ассоциирован с раком молочной железы и простаты (Baloch et al., 2014; Seppälä et al., 2003), последние данные свидетельствуют о том, что носители замены p.Asp438Tyr в гене CHEK2 не имеют повышенного риска развития рака молочной железы, а классификацию варианта CHEK2 p.Asp438Tug можно изменить с варианта неопределенной значимости (VUS) на вероятно доброкачественный для рака молочной железы.

(Kumpula et al., 2023). Однако трудно сделать однозначных выводов относительно роли данной замены в наследственной предрасположенности к РШМ. Таким образом, мы определяем данную замену как с неопределенной значимостью.

Миссенс вариант c.1117T>C, p.Lys373Glu в гене *CHEK2* (rs74751600, chr22:29091840) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с плоскоклеточным РШМ. Данная замена расположена в 10 экзоне гена *CHEK2*, и влечет за собой замену лизина на глутаминовую кислоту в 373 кодоне. Данные аминокислоты обладают схожими свойствами. Предсказательные компьютерные алгоритмы при *in silico* анализе показали противоречивые данные (SIFT, PolyPhen – P; CADD, MetaLR, MutationAssessor – B). Согласно DynaMut2 данная замена не приводит к дестабилизации белка *CHEK2* с показателем 1,0 kcal/mol ( $\Delta\Delta G^{\text{Stability}}$ ). При этом последовательность аминокислот на Т-петле, активирующий фосфорилирование, говорит о ее функциональной значимости. Согласно базе данных структур белков «AlphaFold» замена цистеина в 324 положении белка дикого типа *CHEK2* вероятно патогенна (средний показатель патогенности AlphaMissense: 0,962). Кроме этого, замена имеет высокий бал патогенности согласно PrimateAI-3D (0,76 при ген-специфическом пороге 0,67). По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Таким образом, ни смотря на примененные алгоритмы анализа, мы не можем сделать выводы о ее значимости.

Таким образом можно заключить, что из 18 редких замен неясной клинической значимости в генах регуляции клеточного цикла нами была выделена 1 замена, которая продемонстрировала ассоциацию с предрасположенностью к РШМ для аллеля С локуса rs1060502712 гена *CHEK2*, несмотря на его редкую встречаемость, при использовании поправки Холдейна-Энскомба продемонстрирована ассоциация с риском развития РМШ ( $p=0,05$ ).

*Редкие замены неясной клинической значимости в генах-регуляторах клеточной пролиферации, миграции и дифференцировки*

Протеинкиназы – это суперсемейство белков, участвующих в важнейших клеточных процессах, таких как регуляция клеточного цикла и передача сигнала. Соответственно, они играют важную роль в биологии рака (Izarzugaza et al., 2011). В данном разделе мы проанализировали патогенность 28 замен в генах протеинкиназ, таких как *ALK*, *Pik3CA*, *PDGFRA*, *ABL1*, *ERBB2*, *EGFR*, *KIT*, *ROS1*, *MET*, *RET* (таблица 21).

Таблица 21. Редкие замены неясной клинической значимости в генах-регуляторах клеточной пролиферации, миграции и дифференцировки

Ген	Вариант	Позиция (GRCh37)	Частота гетерозигот (%)	Частота по базе данных GnomAD
<i>ALK</i>	c.871G > A p.Arg291Cys	chr2:29917797	0,009	0,00002
<i>Pik3CA</i>	c.2886A > G p.Ile962Met	chr3:178948114	0,009	Нет данных
<i>PDGFRA</i>	c.599C>G p.Thr200Ser	chr4:55130065	0,009	0,0006
	c.1325T>C p.Leu442Pro	chr4:55138648	0,009	0,0009
<i>ABL1</i>	c.3061C>T p.Arg1040Trp	chr9:133760738	0,009	0,00001
<i>ERBB2</i>	c.989G>A p.Arg330Gln	chr17:37868268	0,009	0,00002
<i>EGFR</i>	c.2039G>A p.Arg680Gln	chr7:55240795	0,009	0,00005
	c.2543C>T p.Pro848Leu	chr7:55259485	0,009	0,0004
	c.754C>T p.Arg252Cys	chr7:55221710	0,009	0,000

<i>KIT</i>	c.221C>T p.Thr74Met	chr4:55561831	0,009	0,00001
	c.200C>G p.Thr67Ser	chr4:55561810	0,009	0,0003
	c.601A>G p.Ile201Val	chr4:55564713	0,009	0,000002
	c.2542T>G p.Phe848Val	chr4:55602721	0,009	0
<i>ROS1</i>	c.6733C>T p.Gly2245Ser	chr6:117622137	0,018	0,0007
<i>MET</i>	c.2962C>T p.Arg988Cys	chr7:116411923	0,027	0,005
	c.2975C>T p.Thr1010Ile	chr7:116411990	0,027	0,012
	c.818C>A p.Thr273Asn	chr7:116339956	0,009	0,0004
	<i>MET</i> c.406G>A p.Val136Ile	chr7:116339544	0,009	0,0003
	c.1063G>A p.Glu355Lys	chr7:116340201	0,009	0,00004
<i>RET</i>	c.3895G>C p.Gly1299Arg	chr7:116435805	0,009	6,195e-7
	c.4142C>T p.Thr1381Ile	chr7:116436147	0,009	0,000002
	c.200 G>A p.Arg67His	chr10:43596033	0,009	0,0004
	c.2944C>T p.Arg982Cys	chr10:43620335	0,027	0,016
	c.874G>A p.Val292Met	chr10:43601830	0,009	0,0002
	c.2372A>T p.Tyr791Phe	chr10:43613908	0,009	0,001
	c.1946C>T p.Ser649Leu	chr10:43609994	0,009	0,0004
	c.3112A>G p.Thr1038Ala	chr10:43622095	0,018	0,005

<i>RET</i>	c.937C>T p.Arg313Trp	chr10:43601893	0,009	0,000004
------------	-------------------------	----------------	-------	----------

Замена с.871G>A, p.Arg291Cys в гене *ALK* (rs748854412, chr2:29917797) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестирувшимся РР шейки матки в 52 года (T3bN0M1). Это изменение нуклеотидной последовательности в 3 экзоне гена *ALK* приводит к замене аргинина, который является основным и полярным, на цистein, который является нейтральным и слабополярным, в кодоне 291 белка *ALK*. Частота данной замены составила 0,005, в то время как в общемировой популяции она составляет крайне редкие 0,00002. Данные предсказательных программ показали противоречивые результаты (SIFT, CADD – P; MetaLR – VUS; MutationAssessor, PolyPhen - B). Согласно AlphaMissense (LB 0,360) замена имеет неопределенное значение, а DynaMut2 (LB 0,62) замена скорее доброкачественная, нежели патогенная. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Таким образом, мы считаем, что замена скорее носит доброкачественный характер. В то же время по современным литературным данным аномалии в гене *ALK* могут быть важным фактором прогрессирования предраковых поражений шейки матки. Амплификация гена *ALK* может привести к повышению уровня экспрессии, кодируемого им белка *ALK*, что, в свою очередь, способствует аномальной пролиферации и выживанию клеток путем активации нисходящих сигнальных путей, таких как PI3K/Akt/NF - к B и MAPK/ERK. Эти аномальные активации являются ключевыми этапами в развитии и прогрессировании опухоли (Qi D. et al., 2024.).

Как было отмечено выше, ген *Pik3CA* играет ведущую роль в патогенезе РШМ. Замена с.2886A>G, p.Ile962Met в гене *Pik3CA* (rs2108425197, chr3:178948114) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестирувшимся РШМ в 58 лет. Заболевание протекало достаточно агрессивно и привело к летальному исходу в течении двух лет. На сегодняшний день нет данных популяционной генетики о распространенности этой замены,

кроме того, что аллель G была обнаружена с частотой 0,00001 японской популяции (1/774444). По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. На основании того, что предсказательные программы характеризуют замену как доброкачественную (PolyPhen – VUS; SIFT, CADD, MetaLR, MutationAssessor – B), AlphaMissense как сомнительную (VUS 0,561), DynaMut2 (LP-0,42) и PrimateAI-3D (0,65 при ген-специфическом пороге 0,23) как вероятно патогенную замена имеет неопределенную значимость.

Мутации в гене *PDGFRA* встречаются примерно в 10-15% гастроинтестинальных стромальных опухолей (Sun et al., 2022). В гене *PDGFRA* замена c.599C>G, p.Thr200Ser (rs149951350, chr4:55130065) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестирувшим плоскоклеточным РШМ в 42 года (T2aN0M0). Заболевание привело к летальному исходу в течении трех лет. По данным ClinVar замена имеет противоречия к классификации патогенности с большим количеством данных за доброкачественность. Имеется некая разница в распространенности замены между нашей выборкой и общемировой. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. На основании того, что предсказательные программы характеризуют замену как доброкачественную (SIFT, MutationAssessor, PolyPhen, MetaLR, CADD – B), AlphaMissense (LB 0,130) и PrimateAI-3D (0,17 при ген-специфическом пороге 0,71) как доброкачественную, и лишь DynaMut2 как вероятно патогенную (LP-0,68) замена скорее доброкачественная, нежели патогенная.

В гене *PDGFRA* замена c.1325T>C, p.Leu442Pro (rs139236922, chr4: 55138648) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестирувшим плоскоклеточным РШМ в 27 лет (T2bN0M0). Заболевание привело к летальному исходу в течении трех лет. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. На основании того, что предсказательные программы характеризуют замену как доброкачественную (PolyPhen – VUS; SIFT, MutationAssessor, MetaLR, CADD – B), AlphaMissense (LB 0,09) и PrimateAI-3D (0,46 при ген-специфическом пороге 0,71) как вероятно доброкачественную, а

DynaMut2 как вероятно патогенную, но с крайне низкими показателями (LP-0,02) замена скорее доброкачественная, нежели патогенная.

Тирозинкиназа Абелльсона (ABL1) является важным компонентом нерецепторных тирозинкиназ и связана с многочисленными клеточными процессами, включая дифференциацию и пролиферацию (Irgit et al., 2025). В гене *ABL1* замена c.3061C>T, p.Arg1040Trp (rs776649059, chr9:133760738) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестом плоскоклеточного РШМ в 30 лет (T3N1M0). Это изменение последовательности заменяет аргинин, который является основным и полярным, на триптофан, который является нейтральным и слабополярным, в кодоне 1040 белка ABL1. Данный вариант не описан в литературе. Заболевание привело к летальному исходу в течении двух лет. Имеется некая разница в распространенности замены между нашей выборкой и общемировой. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. На основании того, что предсказательные программы характеризуют замену как неоднозначную (SIFT – VUS; PolyPhen, MetaLR – P; MutationAssessor, CADD – B), AlphaMissense как неоднозначную (VUS 0,274), а DynaMut2 (LP-0,32) и PrimateAI-3D (0,76 при ген-специфическом пороге 0,73) как вероятно патогенную, трудно сделать выводы о вкладе данной замены в патогенез РШМ. Однако с учетом раннего манифеста заболевания и того, что больше *in silico* инструментов свидетельствуют о патогенности замены, мы считаем ее вероятно патогенной для РШМ.

Онкогенная роль рецепторной тирозинкиназы Erb-B2 2 (ERBB2) была выявлена в нескольких типах рака, но меньше известно об ее функции и механизме действия в клетках РШМ. (Liu et al., 2021). В гене *ERBB2* замена c.989G>A, p.Arg330Gln (rs768206712, chr17:37868268) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестом плоскоклеточного РШМ в 60 лет (T2bN0M0). Заболевание привело к летальному исходу в течении двух лет. Замена крайне редкая и не описана в литературе. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. На основании того, что предсказательные программы характеризуют замену как неоднозначную, но скорее

добропачественную (SIFT – P; PolyPhen, MetaLR, MutationAssessor, CADD – B), AlphaMissense (LB 0,083) и PrimateAI-3D (0,20 при ген-специфическом пороге 0,70) как добропачественную, а DynaMut2 как патогенную (LP-0,84), трудно сделать выводы о вкладе данной замены в патогенез РШМ.

*EGFR* может быть критическим геном в развитии и прогнозировании РШМ вместе с инфекцией ВПЧ. Существует выраженная корреляция между инфекцией ВПЧ и повышением регуляции каскада сигналов рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*) во время инициации, поддержания и прогрессирования РШМ. Поэтому *EGFR* часто является целью лечения РШМ с использованием ингибиторов тирозинкиназы (TKI) и моноклональных антител (mAB) (Muthusami et al., 2022). В гене *EGFR* нами было идентифицировано три потенциально патогенные замены из категории VUS.

Замена с.2039G>A, p.Arg680Gln (rs373336251, chr7:55240795) гена *EGFR* была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестирувшим плоскоклеточного РШМ IIБ стадии в 54 года (T2aN0M0). В результате однонуклеотидной замены в 17 экзоне гена *EGFR*, происходит замена аргинина на глутамин, аминокислоту с очень схожими свойствами, в 680 кодоне. Имеется некая разница в распространенности замены между нашей выборкой и общемировой. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Предсказательные программы характеризуют вариант скорее патогенным (SIFT, MutationAssessor – VUS; PolyPhen, MetaLR, CADD – P), AlphaMissense неопределенным (VUS 0,551), а DynaMut2 (LP-0,58) и PrimateAI-3D (0,77 при ген-специфическом пороге 0,71) вероятнее всего патогенным. Таким образом мы имеем основания предположить патогенность данной замены и то, что она внесла свой вклад в развитие РШМ у пациентки. Кроме того, данная замена описана как найденная у пациентов с раком молочной железы, подозрительных на наследственные опухолевые синдромы (Penkert et al., 2018).

Замена с.2543C>T, p.Pro848Leu (rs148934350, chr7:55259485) гена *EGFR* была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестирувшим плоскоклеточного РШМ IIIБ стадии в 54 года (T3BN1M0).

Чаще всего патогенные мутации в данном гене сконцентрированы в области, кодирующей киназный домен *EGFR* (экзоны 18–24 и фланкирующие инtronные области). Замена с.2543C>T непосредственно приходится на эту область, а именно на 21 экзон (Lecia et al., 2007). Имеется некая разница в распространенности замены между нашей выборкой и общемировой. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. На основании того, что предсказательные программы противоречивы (SIFT – VUS; PolyPhen- P; MetaLR, MutationAssessor, CADD – B), AlphaMissense демонстрирует неопределенные показатели патогенности (VUS 0,740), а DynaMut2 (LP-0,27) и PrimateAI-3D (0,86 при ген-специфическом пороге 0,71) патогенные, на сегодняшний день тяжело сделать выводы о патогенности замены.

Замена с.754C>T, p.Arg252Cys (rs775252718, chr7:55221710) гена *EGFR* была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестирувшимся плоскоклеточным РШМ в 37 лет (T2NxM0). Это изменение последовательности заменяет аргинин, который является основным и полярным, на цистеин, который является нейтральным и слабополярным, в кодоне 252 белка EGFR. Замена имеет крайне редкую частоту и не описана в литературе. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. На основании того, что предсказательные программы противоречивы с преобладанием данных за патогенную природу замены (SIFT, MutationAssessor – VUS; PolyPhen, MetaLR, CADD – P), AlphaMissense (VUS 0,721) и PrimateAI-3D (0,58 при ген-специфическом пороге 0,71) относит ее в неопределенную категорию, а DynaMut2 в патогенную (LP-0,86), трудно сделать однозначные выводы о природе данной замены.

Замена с.221C>T, p.Thr74Met (rs147943899, chr4:55561831) гена *KIT* была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестиацией плоскоклеточного РШМ в 70 лет (T2bN1M0). Это изменение последовательности заменяет треонин, который является нейтральным и полярным, на метионин, который является нейтральным и неполярным, в 74 кодоне белка KIT. Вариант достаточно редкий и не описан в литературе. Все *in silico* инструменты

интерпретируют замену как доброкачественную. Таким образом она не внесла свой вклад в предрасположенность РШМ у пациентки.

Замена с.200C>G, p.Thr67Ser (rs144933028, chr4:55561810) гена *KIT* была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестом плоскоклеточного РШМ в 40 лет (T2aN0M0). По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. На основании того, что предсказательные программы противоречивы (SIFT, PolyPhen, MetaLR, CADD – B; MutationAssessor – VUS), AlphaMissense (LB 0,113), PrimateAI-3D (0,20 при ген-специфическом пороге 0,73) доброкачественна, а DynaMut2 патогенна (LP -1,29) интерпретация замены затруднительна.

Замена с.601A>G, p.Ile201Val (rs1019588542, chr4: 55564713) гена *KIT* была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестацией плоскоклеточного РШМ в 62 года (T2aN0M0). Замена расположена в кодирующем экзоне 3 гена *KIT*. Изолейцин в кодоне 201 заменяется валином, аминокислотой с очень схожими свойствами. Все используемые инструменты свидетельствуют о доброкачественной природе данной замены, и лишь DynaMut2 определяет ее патогенной (LP -0,35). Таким образом, окончательная интерпретация замены затруднительна.

Замена с.2542T>G, p.Phe848Val (rs2109811323, chr4:55602721) гена *KIT* была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 1 женщины с манифестом плоскоклеточного РШМ в 60 года. Замена приходится на 18 кодирующий экзон гена *KIT* и является результатом замены тимина на гуанин в 2542 позиции. Фенилаланин в кодоне 848 заменяется валином, аминокислотой с очень схожими свойствами. Замена крайне редкая и не описана в литературе. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Данные предсказательных инструментов противоречивы: SIFT и PolyPhen – патогенно, MutationAssessor, MetaLR, CADD – доброкачественно, AlphaMissense – неоднозначно (VUS 0,526), DynaMut2 – патогенно (LP -0,94), PrimateAI-3D (0,67 при ген-специфическом пороге 0,73) – доброкачественна. Таким образом на сегодняшний день трудно сделать выводы о патогенности данного варианта.

Замена с.6733C>T, p.Gly2245Ser (rs142264513, chr6:117622137) гена *ROS1* была обнаружена в гетерозиготном состоянии у 2 женщин с манифестацией плоскоклеточного РШМ в 27 и 37 лет, что безусловно можно считать ранним началом заболевания. Данный вариант был обнаружен у пациенток с наследственным раком молочной железы (Isidori et al., 2020; Torrezan et al., 2018). Данная замена добропачественна согласно предикторным программам (SIFT, PolyPhen, MutationAssessor, MetaLR, CADD – B), AlphaMissense (LB 0,087). Однако, согласно SpliceAI данный вариант относится к вариантам сплайсинга (потеря акцептора 0,44/потеря донора 0,52), что предполагает его патогенность.

На ген *MET* пришлось 7 миссенс-замен, наибольшее внимание из которых привлекают относительно частые среди редких замен p.Arg988Cys и p.Thr1010Ile. Данные близлежащие замены, суммарная частота которых в выборке составляет 0,055 %, приходятся на 14 экзон гена *MET*. Согласно литературным данным, изменения в нем и амплификация гена *MET* играют решающую роль в возникновении рака (Mo et al., 2017).

Миссенс-вариант с.2962C>T, p.Arg988Cys в гене *MET* (rs34589476, chr7:116411923) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 3 (2,7 %) женщин русской этнической принадлежности с плоскоклеточным РШМ. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Несмотря на то, что данные ClinVar указывают на добропачественный характер замены, а предсказательные программы противоречивы (SIFT – P; PolyPhen, MutationAssessor, MetaLR, CADD – B; AlphaMissense LB 0,112; DynaMut2 LP -0,12; PrimateAI-3D (0,57 при ген-специфическом пороге 0,72) - B), в связи с высокой частотой данного варианта в когорте пациенток с РШМ (0,028) и отличается от таковой в базах данных (0,005), мы проанализировали его ассоциацию с РШМ с использованием расширенной группы контроля. Выявлены статистически значимые различия в распространенности аллеля Т ( $p=0,002$ ;  $\chi^2 = 9,8$ ) между группами сравнения, что позволяет сделать вывод о значимости данного варианта в развитии РШМ (таблица 22).

Таблица 22. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs34589476 гена *MET*

rs34589476	N	Частота вероятного аллеля риска	$\chi^2$ , p, ОШ, (95%ДИ) с использованием поправки Холдейна–Энскомба	Число генотипов		
				TT	TC	CC
	492	T	$\chi^2=9,8$ p=0,002 ОШ = 10,76 (1,69 – 68,73)	0 (0,0)	3 (0,028)	105 (0,972)
РШМ	108	3 (0,014)				
Контроль	384	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)	384 (1,0)

Миссенс-вариант c.2975C>T, p.Thr1010Ile в гене *MET* (rs56391007, chr7:116411990) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 2 женщин с плоскоклеточным и 1 с аденосквамозным РШМ. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Для данного варианта были получены противоречивые интерпретации патогенности (SIFT, PolyPhen – P; MutationAssessor – LP; CADD, MetaLR – B; AlphaMissense VUS 0,662; DynaMut2 LP -0,57; PrimateAI-3D (0,66 при ген-специфическом пороге 0,72) – B). Для прояснения данных по этому варианту мы провели ассоциативный анализ, но частота варианта составила 0,072 в контрольной выборке (таблица 26 Приложения), что более чем в 2 раза выше, нежели в группе больных. Эти данные безусловно говорят в пользу доброкачественности данной замены, да и общепопуляционная частота находится на достаточно высоком уровне. Однако мы обратили внимание, что у носителей замены p.Arg988Cys заболевание протекает менее агрессивно. Такие пациентки достигли трехлетней выживаемости и находятся до сих пор под наблюдением. Выживаемость же носителей варианта p.Thr1010Ile составила от 8 до 24 мес. Эти данные наталкивают нас на мысль, что данная замена, не влияя на предрасположенность к РШМ, может оказывать влияние на его агрессивность. Некласон с соавторами, исследуя мутационный ландшафт при колоректальном раке, предположили модель, в которой мутация T1010I функционирует как

фактор прогрессирования, а не как фактор инициации. В частности, аденома инициируется через соматические мутации в каноническом пути APC, а затем приобретает другие пролиферативные мутации и при наличии базовой мутации *MET* T1010I преобретает агрессивность и способна прорастать за пределы слизистой оболочки, становясь инвазивным раком толстой кишки (Neklason et al., 2011).

Согласно данным Тайнер и соавторов, варианты R970C и T992I гена *MET*, также обозначаемые как R988C и T1010I, могут быть факторами предрасположенности к раку при их сочетании с онкогеном, который управляет клеточной пролиферацией, но не влияют напрямую на онкотрансформацию (Tyner et al., 2010). Таким образом, с учетом патогенеза РШМ эти замены могут быть заменами предрасположенности к РШМ и усиливать онкогенный эффект ВПЧ. Вариант c.2962C>T (R988C) в гене *MET* был обнаружен в клетках плоскоклеточной карциномы легкого (Guyard et al., 2017) и у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями (MTjin et al., 2006). Функциональные исследования этого варианта продемонстрировали, что замена p.Arg988Cys при введении в зависимую от интерлейкина-3 (IL-3) клеточную линию мелкоклеточного рака легкого регулировала пролиферацию клеток, что приводило к небольшой, но значимой независимости от факторов роста (Ma et al., 2003). Кроме этого, показано, что мутация p.Arg988Cys усиливает онкогенез, а именно предает повышенную *in vitro* туморогенность, а также восприимчивость к опухолям легких у мышей. Это указывает на то, что замена p.Arg988Cys является мутацией с усилением функции белка (MTjin et al., 2006). Кроме того, эффект замен p.Arg988Cys и p.Thr1010Ie приходится на юкстамембранный домен *MET* (рисунок 11), который регулирует лиганд-зависимую интернализацию белка МЕТ как следствие фосфорилирования Y1003 в ответ на связывание HGF (фактора роста гепатоцитов), что приводит к убиквитинированию и деградации МЕТ. Предполагается, что мутации в юкстамембранным домене приводят к накоплению МЕТ на поверхности клетки и постоянной сигнализации, ведущей к опухолеобразующей активности (Liu et al., 2015).

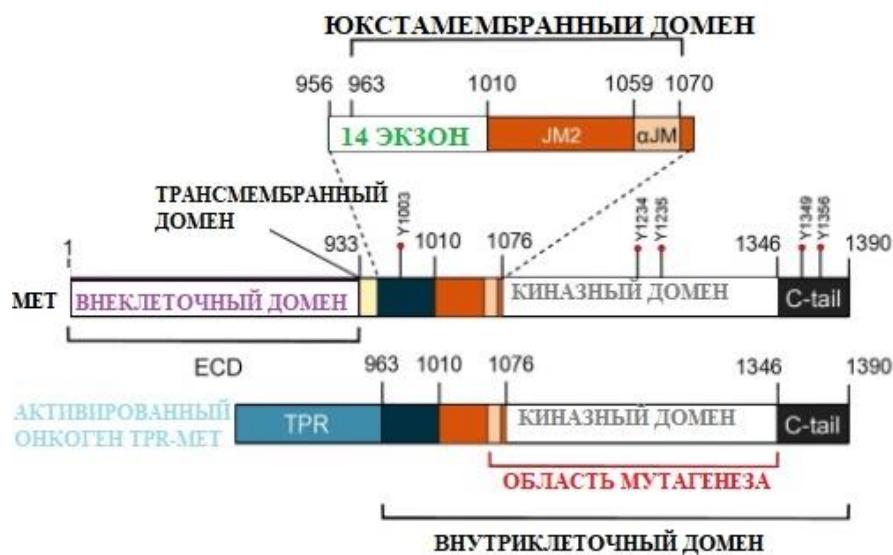


Рисунок 11 – Границы доменов гена *MET* (с изменениями Estevam et al., 2024) [60]

Миссенс-вариант c.818C>A, p.Thr273Asn в гене *MET* (rs368144654, chr7:116339956) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с плоскоклеточным РШМ с манифестацией в 52 года (T3b1N1M0). Это изменение последовательности заменяет нейтральный и полярный треонин, на аспарагин, который так же нейтрален и полярен. Данные ClinVar противоречивы, а предсказательные программы скорее свидетельствуют о доброкачественном характере замены (PolyPhen – P; SIFT, MetaLR, CADD, MutationAssessor – B), согласно AlphaMissense (LB 0,07) и PrimateAI-3D (0,49 при ген-специфическом пороге 0,72) она доброкачественна, а DynaMut2 патогенна (LP -0,82). По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. В совокупности сложно на сегодняшний день сделать выводы о характере данной замены, однако мы считаем ее скорее доброкачественной.

Миссенс-вариант c.406G>A, p.Val136Ile в гене *MET* (rs199701987, chr7:116339544) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с плоскоклеточным РШМ с манифестацией в 49 лет (T2bN1M0). Данные ClinVar противоречивы, а предсказательные программы свидетельствуют о доброкачественном характере замены (PolyPhen, SIFT, MetaLR, CADD, MutationAssessor – B), согласно AlphaMissense (LB 0,081) и PrimateAI-3D (0,18

при ген-специфическом пороге 0,72) она доброкачественна, а DynaMut2 патогенна (LP -0,1). По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. В совокупности сложно на сегодняшний день сделать выводы о характере данной замены, однако мы считаем, что она скорее доброкачественна.

Миссенс-вариант c.1063G>A, p.Glu355Lys в гене *MET* (rs561295443, chr7:116340201) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с плоскоклеточным РШМ с манифестацией в 44 года (T3bN1M0). Заболевание привело к летальному исходу в течении двух лет. Данные ClinVar противоречивы, как и предсказательные программы (PolyPhen – P; SIFT, MetaLR, CADD, MutationAssessor – B), согласно AlphaMissense она доброкачественна (LB 0,293), DynaMut2 (LB 0,34) и PrimateAI-3D (0,54 при ген-специфическом пороге 0,72) замена доброкачественна. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. В совокупности замена вероятно доброкачественна.

Миссенс-вариант c.3895G>C, p.Gly1299Arg в гене *MET* (rs2117108658, chr7:116435805) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с плоскоклеточным РШМ с манифестацией в 67 лет (T2aN0M0). Это изменение последовательности заменяет глицин, который является нейтральным и неполярным, на аргинин, который является основным и полярным. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Данные ClinVar противоречивы, а предсказательные программы свидетельствуют скорее о патогенном характере замены (SIFT, PolyPhen, MetaLR – P; MutationAssessor – LP; CADD – B), согласно AlphaMissense (LP 0,995), DynaMut2 (LP -0,85) и PrimateAI-3D (0,91 при ген-специфическом пороге 0,72) так же патогенна. В совокупности замена вероятно патогенна.

Миссенс-вариант c.4142C>T, p.Thr1381Ile в гене *MET* (rs2117113682, chr7:116436147) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с плоскоклеточным РШМ с манифестацией в 54 года (T2bN0M0). Это изменение последовательности заменяет треонин, который является нейтральным и полярным, на изолейцин, который является нейтральным и неполярным. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Данные ClinVar

противоречивы, как и данные предсказательных программ (SIFT – VUS; PolyPhen, MetaLR – P; CADD, MutationAssessor – B), согласно AlphaMissense (LB 0,091) и PrimateAI-3D (0,38 при ген-специфическом пороге 0,72) она доброкачественна, согласно DynaMut2 патогенна (LP -0,25). Имеющихся данных недостаточно, для того чтобы сделать однозначные выводы о характере замены.

Ген рецепторной тирозинкиназы *RET* был впервые идентифицирован более тридцати лет назад как новый трансформирующий ген. С момента его открытия и последующей характеристики пути изменения *RET* были выявлены во многих типах рака и наиболее распространены в карциномах щитовидной железы и немелкоклеточном раке легких (НМРЛ). В других типах опухолей, таких как рак молочной железы и карциномы слюнных желез, изменения *RET* могут быть обнаружены с более низкой частотой (Regua et al., 2022). Новые данные свидетельствуют о том, что здоровые ткани шейки матки экспрессируют белок *RET*, в тоже время в образцах с дисплазией или РШМ экспрессия отсутствует. И хотя по этим данным клетки РШМ не демонстрируют точечных мутаций *RET* для экзонов 10 и 16, отсутствие экспрессии *RET* может коррелировать с метилированным промотором в трансформированных эпителиальных клетках шейки матки. Эти результаты могут указывать на то, что ген *RET* действует как ген-супрессор опухолей при РШМ (Martínez-Castillo et al., 2025). Мы идентифицировали 7 вариантов неясной клинической значимости этого гена в герминальной ДНК пациенток с РШМ, при этом 5 замен из них «Variant Interpreter» интерпретировал в качестве патогенных.

Патогенный по данным «Variant Interpreter» миссенс-вариант c.200G>A, p.Arg67His в гене *RET* (rs192489011, chr10:43596033) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с плоскоклеточным РШМ с манифестацией в 34 года (T3bN1M0). Заболевание привело к летальному исходу в течении 1 года. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Данные ClinVar говорят о доброкачественности замены, как и данные предсказательных программ (SIFT, PolyPhen, MetaLR, CADD, MutationAssessor – B), согласно AlphaMissense (LB 0,067) и PrimateAI-3D (0,06 при ген-специфическом пороге 0,67) она

добропачественна, согласно DynaMut2 патогенна (LP -1,33). В совокупности данных замена вероятнее всего добропачественна.

Патогенный по данным «Variant Interpreter» миссенс-вариант с.2944C>T, p.Arg982Cys в гене *RET* (rs17158558, chr10:43620335) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 3 женщин с плоскоклеточным РШМ. Данные ClinVar говорят о доброкачественности замены, данные предсказательных программ противоречивы (SIFT, PolyPhen – P, MetaLR, CADD, MutationAssessor – B), согласно AlphaMissense (LB 0,124), DynaMut2 (LB 0,51) и PrimateAI-3D (0,23 при ген-специфическом пороге 0,67) она добропачественна. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. С учетом того, что в общемировом масштабе распространенность сравнима с той, что в нашей выборке и в совокупности данных замена вероятнее всего добропачественна.

Патогенный по данным «Variant Interpreter» миссенс-вариант с.874G>A, p.Val292Met в гене *RET* (rs34682185, chr10: 43601830) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с плоскоклеточным РШМ. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Данные ClinVar говорят о противоречивости интерпретации замены, данные предсказательных программ противоречивы, но с перевесом в сторону патогенности (SIFT, PolyPhen, MetaLR – P, MutationAssessor–VUS; CADD, REVEL– B), согласно AlphaMissense (LB 0,124) и PrimateAI-3D (0,44 при ген-специфическом пороге 0,67) она добропачественна, согласно DynaMut2 патогенна (LP -0,95). В литературе описано, что локализованная в 5 экзоне, замена ведущая за собой замену V292M в белке RET ранее была обнаружена у 44-летнего пациента с односторонней феохромацитомой и медуллярным раком щитовидной железы. Замена влияет на третий кадгерин-подобный домен RET, который обычно не включается в скрининг *RET*. Ци с коллегами заключили, что данное изменение является изменением с усилением функции с более слабой патогенностью (Qi et al., 2011). Различные предикторные методики противоречат друг другу, однако данная замена интересна тем, что она встретилась у женщины с сочетанным носительством трех замен в гене *RET*.

Замены p.Arg67His, p.Arg982Cys и p.Val292Met были идентифицированы у пациентки 1987 года рождения татарской этнической принадлежности с плоскоклеточным раком шейки матки G2 IIIc1 стадии заболевания (T3bN1M0). Все выявленные замены были ранее описаны в литературе при различных формах онкологических заболеваний, однако их клиническая значимость до конца не определена, а сочетание трех вариантов у пациентки с РШМ представляет научно-практический интерес. Заболевание выявлено в 34 года, протекало крайне агрессивно и в возрасте 35 лет привело к фатальному исходу. В литературе описан семейный случай медуллярного рака щитовидной железы (МРЩЖ), где было показано, что сочетание p.V292M/R67H/R982C демонстрировало относительно более мягкую патогенность по отношению к МРЩЖ в сравнении с сочетанием p.C634Y/V292M/R67H/R982C, но вероятно предрасполагало к наследственному МРЩЖ (Qi et al., 2011). Кроме того, была описана ассоциация RET-транс-комплекса C634Y/V292M с множественной эндокринной неоплазией типа 2А, где комбинированная мутация p.C634Y/V292M приводила к более агрессивному фенотипу, чем точечные варианты C634Y или V292M (Yang et al., 2020). Мы предположили, что сочетанное носительство трех мутаций могло повлиять на негативный исход заболевания пациентки с РШМ с сочетанным носительством p.V292M/R67H/R982C. Для проверки данной гипотезы мы решили использовать предсказательные биоинформационические инструменты для оценки активности белка. Мы воспользовались ресурсом «DynaMut2» для выявления сочетанного эффекта мутаций. Согласно полученным данным такое сочетание замен в аминокислотной последовательности белка возможно с химической и физической стороны (сумма  $\Delta G$  (стабильность) -1,76 (энергия Гибса)). Тем не менее несмотря на то, что замена p.Arg67His является дестабилизирующей (Predicted Stability Chengan -1,3 kcal/mol), замена p.Val292Met также дестабилизирующая (Predicted Stability Chengan -0,95 kcal/mol), а замена p.Arg982Cys стабилизирующая (Predicted Stability Chengan 0,51 kcal/mol), в целом, сочетание 3 вышеописанных аминокислотных замен в белке RET несет доброкачественный характер (Predicted Stability Chengan 0,26 kcal/mol). Таким

образом, вероятнее всего мутации в гене *RET* не могли внести весомый вклад в исход заболевания. Возможно, алгоритмы «Variant Interpreter» причислили три данных замены в категорию патогенных именно потому, что были идентифицированы у одной женщины.

Патогенный по данным «Variant Interpreter» миссенс-вариант с.2372A>T, p.Tyr791Phe в гене *RET* (rs77724903, chr10: 43613908) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с плоскоклеточным РШМ с манифестацией заболевания в 45 лет (T3bN0M0). По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Данные ClinVar противоречивы, но говорят скорее о доброкачественности замены, данные предсказательных программ противоречивы (MetaLR, REVEL – P; PolyPhen – VUS; CADD, SIFT, MutationAssessor – B), согласно AlphaMissense (LP 0,111) и PrimateAI-3D (0,33 при ген-специфическом пороге 0,67) она доброкачественна, согласно DynaMut2 патогенна (LP -0,7). Несмотря на то, что вариант некоторое время считался патогенным, национальное когортное исследование всех носителей *RET* p.Tyr791Phe в Дании подтверждает, что вариант не является патогенным (Høxbroe Michaelsen et al., 2019). С учетом того, что в общемировом масштабе распространенность сравнима с той, что обнаружена в нашей выборке и в совокупности данных замена вероятнее всего доброкачественная.

Патогенный по данным «Variant Interpreter» миссенс-вариант с.1946C>T, p.Ser649Leu в гене *RET* (rs148935214, chr10: 43609994) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с плоскоклеточным РШМ с манифестацией заболевания в 60 лет (T3bN0M0). Заболевание привело к фатальному исходу в течении года. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Данные ClinVar противоречивы, но говорят скорее о доброкачественности замены, данные предсказательных программ свидетельствуют о том, что замена скорее патогенна (SIFT, PolyPhen, MetaLR, REVEL – P; MutationAssessor – VUS; CADD – B), согласно AlphaMissense (LB 0,480) и PrimateAI-3D (0,51 при ген-специфическом пороге 0,67) она доброкачественна, согласно DynaMut2 патогенна (LP -0,48). С учетом того, что в данном триплете существует замена, представляющая собой

нонсенс-вариант, заменяющий серин на преждевременный стоп-кодон (TCG>TAG), мы можем предположить ее значимость, однозначно сделать выводы о его патогенности трудно.

Миссенс-вариант c.3112A>G, p.Thr1038Ala в гене *RET* (rs201740483, chr10: 43622095) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 2 женщин с плоскоклеточным РШМ. Замена аденина на гуанин в позиции 3112 гена *RET* приводит к неконсервативной замене аминокислот в кодируемой белковой последовательности. Данные ClinVar противоречивы, но говорят скорее о доброкачественности замены, данные предсказательных программ склоняются в пользу того, что замена скорее доброкачественна (SIFT, PolyPhen – VUS; MetaLR, REVEL, MutationAssessor – VUS; CADD – B), согласно AlphaMissense (LB 0,145) и PrimateAI-3D (0,54 при ген-специфическом пороге 0,67) она доброкачественна, согласно DynaMut2 патогенна (LP -0,24). По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Распространенность замены среди пациентов в нашем исследовании близка к общемировой. Согласно совокупности данных, замена доброкачественна.

Миссенс-вариант c.937C>T, p.Arg313Trp в гене *RET* (rs1057521089, chr10:43601893) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с манифестацией плоскоклеточного РШМ в 65 лет (T2aN0M0). Вариант, расположенный в 5 кодирующим экзоне гена *RET*, является результатом замены цитозина на тимин в 937 нуклеотидной позиции и приводит к замене в 313 кодоне аргинина на триптофан, аминокислоту с противоположными свойствами. По данным SpliceAI не оказывает влияния на сплайсинг. Согласно ClinVar замена имеет неопределенную значимость, а данные предсказательных противоречивы (SIFT, MetaLR – P; PolyPhen, MutationAssessor – VUS; REVEL, CADD – B), согласно AlphaMissense она противоречива (VUS 0,232), согласно PrimateAI-3D (0,63 при ген-специфическом пороге 0,67) она доброкачественна, согласно DynaMut2 патогенна (LP -0,65). На сегодняшний день сложно сделать выводы о патогенности замены.

Таким образом, проанализировав 28 замен неясной клинической значимости вprotoонкогенах и генах опухолевых супрессорах, нами была показана ассоциация с риском развития РШМ для аллеля T rs34589476 гена *MET* ( $p=0,002$ ;  $\chi^2=9,8$ ). А в совокупности с тем, что эффект замены приходится на функционально-значимую область белка, и сама замена представляет собой замену с усилением функции, мы имеем основания считать данную замену патогенной в отношении РШМ.

Кроме этого, согласно литературным источникам, базам данных и инструментам *in silico*, было выделено 4 вероятно патогенные замены в данной группе генов. Замены c.3061C>T, p.Arg1040Trp гена *ABL1*, c.2039G>A, p.Arg680Gln гена *EGFR*, c.6733C>T, p.Gly2245Ser гена *ROS1* и c.3895G>C, p.Gly1299Arg в гене *MET* вероятно патогенные в виду того, что наибольшее количество биоинформационических инструментов говорят о том, что замены являются патогенными.

#### *Редкие замены неясной клинической значимости в генах репарации ошибочного спаривания оснований*

Изменение микросателлитных повторов является результатом проскальзывания из-за смещения нитей во время репликации ДНК и называется микросателлитной нестабильностью (MSI) (Chung et al., 2001). На сегодняшний день идентифицировано не менее семи генов (*MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, *PMS1*, *MSH6*, *MSH3* и *MLH3*), участвующих в пострепликативной репарации несоответствий ДНК, и широко распространенная MSI может возникнуть, когда нарушается функция любого из этих белков. Отказ системы MMR также ускоряет накопление мутаций отдельных нуклеотидов и приводит к развитию опухоли. Связь мутации зародышевой линии одного из генов репарации несоответствий ДНК, в основном генов *MSH2* или *MLH1* была установлена еще в 1993 году (Wong et al., 2003). Достоверно известно, что гены dMMR могут быть одним из важных механизмов цервикального канцерогенеза. MMR часто приводит к MSI, которая, кроме того, является важным прогностическим биомаркером терапевтической эффективности иммунотерапии рака, в том числе РШМ (Guo et al., 2024). В данном разделе мы

предугадали патогенность 8 замен в генах системы dMMR, а именно *MLH1*, *MSH6*, *MSH2*, *PMS2*, и роль этих замен в предрасположенности к РШМ (таблица 23).

Таблица 23. Редкие замены неясной клинической значимости в генах репарации ошибочного спаривания оснований

Ген	Вариант	Позиция (GRCh37)	Частота гетерозигот (%)	Частота по базе данных GnomAD
<i>MLH1</i>	c.803A>G p.Glu268Gly	chr3:37059009	0,009	0,0001
<i>MSH6</i>	c.1196C>T p.Pro399Leu	chr2:48026318	0,009	0,000001
	c.1857A>C p.Glu619Asp	chr2:48026979	0,009	0,00003
<i>PMS2</i>	c.2104C>A p.Ala702Ser	chr7:6022525	0,009	0,000002
	c.1567A>T p.Ser523Thr	chr7:6026829	0,009	0,00017
	c.89C>G p.Gly29Ala	chr7:6045600	0,018	0,0005
	c.2430A>G p.Arg810=)	chr7:6017234	0,009	Не описано
<i>MSH2</i>	c.2154A>G p.Gln718=)	chr2:47703654	0,009	0,0003

Редкие синонимические замены p.Arg810=) в гене *PMS2* и p.Gln718=) в гене *MSH2* согласно ClinVar и SpliceAI являются доброкачественными.

Так же доброкачественна в отношении синдрома Линча и замена c.803A>G, p.Glu268Gly гена *MLH1* (rs63750650, chr3:37059009), обнаруженная у женщины с adenокарциномой, манифестирующей в 44 года (T3bN0M0). По данным SpliceAI замена не оказывает влияния на сплайсинг. Несмотря на то, что согласно 4 предикторным программам замена патогенна (SIFT, MutationAssessor, PolyPhen, MetaLR – P; PolyPhen – VUS; CADD – B), согласно DynaMut2 (LP -1,31) и PrimateAI-3D (0,77 при ген-специфическом пороге 0,70) так же патогенна, а

AlphaMissense спорна (VUS 0,623), замена все-таки считается доброкачественной, т.к. данный факт был заключен экспертной группой Международного общества наследственных опухолей желудочно-кишечного тракта. Тем не менее, неизвестно, имеет ли данный вариант патогенный подтекст в отношении РШМ. Ввиду явных противоречий в интерпретации замены мы решили провести поиск микросателлитной нестабильности в соматической ДНК пациентки. Методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе 3500xL проведено исследование 5 микросателлитных локусов (MSI): NR-21, BAT26, BAT-25, NR-24, NR-27. В результате проведенного исследования не обнаружено ни одной аллельной вариации исследуемых локусов, что свидетельствует об отсутствии микросателлитной нестабильности и о доброкачественности варианта. еще раз подчеркивает доброкачественность варианта.

Миссенс-вариант c.1196C>T, p.Pro399Leu в гене *MSH6* (rs878853701, chr2:48026318) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с манифестацией плоскоклеточного РШМ в 29 лет (T3N1M0). В результате замены, которая приходится на 4 экзон гена, пролин в кодоне 399 заменен лейцином, аминокислотой со схожими свойствами. Данные ClinVar неопределенные, данные предсказательных программ скорее говорят в пользу патогенности варианта (SIFT, MetaLR, PolyPhen, MutationAssessor – P; CADD, REVEL – B), согласно AlphaMissense (LP 0,923) и DynaMut2 (LP -0,5) замена патогенна, согласно PrimateAI-3D (0,77 при ген-специфическом пороге 0,90) доброкачественна. Замена не описана в литературе, но исходя из общих данных и раннего манифеста заболевания мы считаем замену вероятно патогенной.

Миссенс-вариант c.1857A>C, p.Glu619Asp в гене *MSH6* (rs63751121, chr2:48026979) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с манифестацией плоскоклеточного РШМ в 52 года (T2bN0M0). Этот миссенс-вариант заменяет глутаминовую кислоту на аспарагиновую в кодоне 619 белка MSH6. По данным SpliceAI замена не оказывает влияния на сплайсинг. Данные ClinVar неопределенные, данные предсказательных программ скорее говорят в пользу доброкачественности варианта (MetaLR – P; MutationAssessor – VUS; SIFT,

CADD, REVEL – B), согласно AlphaMissense (VUS 0,231) неопределенна, PrimateAI-3D (0,45 при ген-специфическом пороге 0,90) доброкачественна и DynaMut2 (LP -0,67) замена патогенна. На сегодняшний день недостаточно данных, чтобы достоверно сделать выводы о значимости замены.

Миссенс-вариант c.2104C>A, p.Ala702Ser в гене *PMS2* (rs1554295821, chr7:6022525) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с манифестацией плоскоклеточного РШМ в 45 года (T3bN0M0). Замена приходится на 12 экзон гена, и приводит к замене аланина в 702 кодоне серином, аминокислотой со схожими свойствами. По данным SpliceAI замена не оказывает влияния на сплайсинг. Замена не описана в литературе. Данные ClinVar неопределенные, данные предсказательных программ скорее говорят в пользу патогенности варианта (SIFT, REVEL, MetaLR – P; MutationAssessor – VUS; CADD – B), согласно AlphaMissense (VUS 0,751) и PrimateAI-3D (0,60 при ген-специфическом пороге 0,75) спорная, и DynaMut2 (LP -1,34) замена патогенна. Замена показалась нам интересной, и мы провели анализ микросателлитной нестабильности в герминальной ДНК пациентки. Методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе 3500xL проведено исследование 5 микросателлитных локусов (MSI): NR-21, BAT26, BAT-25, NR-24, NR-27, и в результате проведенного исследования не обнаружено ни одной аллельной вариации исследуемых локусов, что свидетельствует об отсутствии микросателлитной нестабильности.

Миссенс-вариант c.1567A>T, p.Ser523Thr в гене *PMS2* (rs63751132, chr7:6026829) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины с манифестацией плоскоклеточного РШМ в 30 лет (T2aN0M0). По данным SpliceAI замена не оказывает влияния на сплайсинг. Данные ClinVar неопределенные и противоречивые, данные предсказательных программ скорее говорят в пользу доброкачественности варианта (PolyPhen, SIFT, REVEL, MetaLR, MutationAssessor, CADD – B), согласно AlphaMissense (B 0,074) и PrimateAI-3D (0,16 при ген-специфическом пороге 0,75) доброкачественна, а DynaMut2

патогенна (LP -0,11), но данный показатель крайне низок. В совокупности данных вариант вероятнее всего доброкачественен.

Миссенс-вариант c.86C>G, p.Gly29Ala в гене *PMS2* (rs146176004, chr7:6045600) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 2 женщин с РШМ. Замена приводит к неконсервативной замене аминокислот, расположенной в семействе белков репарации несоответствий ДНК, N-концевой части кодируемой белковой последовательности. По данным SpliceAI замена не оказывает влияния на сплайсинг. Данные ClinVar неопределенные и противоречивые, данные предсказательных программ скорее говорят в пользу патогенности варианта (SIFT, MetaLR, REVEL, PolyPhen – P; MutationAssessor – VUS; CADD – B), согласно AlphaMissense (VUS 0,698) неоднозначна, согласно DynaMut2 (LP -0,23) и PrimateAI-3D (0,81 при ген-специфическом пороге 0,75) патогенна. На сегодняшний день нет возможности сделать убедительные выводы о значимости данного варианта.

Таким образом, проведя анализ по поиску микросателлитной нестабильности в опухолевой ткани пациенток с заменами p.Glu268Gly гена *MLH1* и p.Ala702Ser в гене *PMS2*, мы показали, что у женщин не обнаружено MSI, что позволяет нам сделать выводы о том, что данные замены являются доброкачественными. К сожалению, нам недоступна соматическая ДНК опухолевой ткани пациентки с заменой p.Pro399Leu в гене *MSH6*, но ввиду раннего манифеста РШМ и данных *in silico*, мы считаем данную замену патогенной.

### **3.3.3 Частые замены (более 5%), выявленные у пациенток с клиническим диагнозом рак шейки матки**

Принимая во внимание генетическую основу заболеваний, можно выделить два типа генов: причинные и гены восприимчивости. Причинные гены – это те, которые, если присутствуют в измененной форме (т. е. мутации), развиваются в связанную патологию. Так обстоит дело, например, с некоторыми семейными формами деменции болезни Альцгеймера, где только 5% случаев связаны с мутациями известных генов, поэтому наличие мутированного аллеля необходимо и достаточно для развития патологического состояния. В случае генов восприимчивости наличие дефектного «аллельного варианта» гена не означает, что у человека обязательно разовьется заболевание, но вероятность его развития выше, чем у других людей, у которых его нет. Очевидно, что другие факторы, такие как генетика и окружающая среда, будут способствовать тому, что у некоторых людей разовьется заболевание, а у других – нет (Chiarella et al., 2023). Различные исследования продемонстрировали связь между простыми нуклеотидными полиморфизмами (SNP) как генетическим фактором, который может оказывать влияние на экспрессию генов или функцию белков, в итоге приводящих к канцерогенезу шейки матки (Li et al., 2024).

В нашем исследовании мы выделили группу частых SNP (5% и более), разделив их на группу замен, выявленных в генах, ответственных за опухолеобразование и «неопухолевых» генах. В результате такого подхода мы проанализировали 13 полиморфных вариантов в опухолевых генах и 15 в неопухолевых (таблицы 26-29 в Приложениях). Кроме того, нами был проведен ассоциативный анализ полиморфных вариантов p.Ala222Val и p.Glu429Ala гена *MTHFR*, связанных в ряде исследованием с риском возникновения РШМ.

*Частые замены (более 5%) в онкогенах и генах супрессорах опухоли,  
выявленные у пациенток с клиническим диагнозом рак шейки матки*

В результате исследования нами были рассмотрены SNP 8 генов, напрямую связанных с опухолеобразованием: *ERBB2*, *KIT*, *RET*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ABL1*, *EGFR* и *ROS1*. Для 7 генов ассоциаций найдено не было (таблицы 32-33 Приложения).

В результате проведения ассоциативного исследования нами была выявлена новая ассоциация с риском развития РШМ (таблица 24). Полиморфизм c.3508C>G, p.Pro1170Ala гена *ERBB2* (rs1058808, chr17:37884037) был обнаружен в гомозиготном состоянии у 57 женщин и в гетерозиготном у 41.

Таблица 24. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs1058808 гена *ERBB2* между пациентками с РШМ и группой условно- здоровых женщин

Аллели							
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ	$\chi^2$	ОШ	95% ДИ	P
rs1058808	G	0,718	0,625	3,97	1,52	1,01 – 2,31	0,046
Генотипы							
rs1058808	N	Число генотипов		Частоты генотипов		$\chi^2$ , p	
Генотипы	204	CC	CG	GG	CC	CG	GG
РШМ	108	10	41	57	0,092	0,380	0,528
Здоровые	96	11	50	35	0,114	0,521	0,364

Таким образом была обнаружена ассоциация риска развития РШМ с мажорным аллелем G p=0,046 ( $\chi^2=3,97$ , ОШ=1,52). При применении метода расчета Аддитивной модели наследования (тест Кохрана-Армитаджа) была обнаружена так же ассоциация с генотипом GG p=0,045 ( $\chi^2=4,03$ , ОШ=1,95). А при расчете рецессивной модели наследования (тест хи-квадрат, df = 1) ассоциация с генотипом GG составила p=0,02 ( $\chi^2=5,47$ , ОШ=1,95).

Несмотря на то, что согласно ClinVar данный вариант доброкачественен, а предикторные программы противоречивы, данный вариант был ассоциирован в исследованиях с некоторыми видами онкологических заболеваний, а именно солидных опухолей.

Генотип GG P1170A показал статистически значимые различия в подгруппах женщин, некурящих и непьющих ( $p<0,05$ ) для риска рака легких в корейском популяции (Jo et al., 2008). Кроме этого, аллель G был ассоциирован с повышенным риском остеосаркомы (Xin et al., 2015), раком желудка (Vázquez-Ibarra et al., 2015), колоректальным раком у женщин (Alanazi et al., 2015), риском развития рака яичников (Chen et al., 2021).

Кроме этого, было показано, что полиморфизм p.Pro1170Ala в *ERBB2* связан с риском кардиотоксичности трастузумаба (Stanton et al., 2015). В когорте пациентов с астмой лица, несущие генотип «GG» rs1058808, имели более низкое фосфорилирование белков ERK1/2 в сигнальном каскаде MAPK, при этом общая экспрессия мРНК *ERBB2* и уровни фосфорилирования EGFR остались неизменными (Sio et al., 2023). Эти данные, несомненно, свидетельствуют о функциональной значимости данного варианта, как в развитии ряда онкологических заболеваний, так и о важности данного полиморфизма в других молекулярно-биологических путях.

Кроме того, Гао И. с соавторами показали, что хоть в исследовании случай-контроль не было значительной разницы между пациентами и контрольной группой для полиморфного варианта rs1058808 *ERBB2* для РШМ. Однако при объединении этого полиморфизма с вариантом rs1136201 продемонстрирован значительный эффект для РШМ ( $p=0,012$ ). Кроме того, количество вариантов также оказалось влияние ( $p=0,002$ ). При анализе выживаемости доминантная модель rs1136201 и кодоминантная модель rs1058808 были значительно связаны с выживаемостью ( $p=0,037$  и  $p=0,028$ ). Сочетание rs1136201 и rs1058808 также отрицательно влияло на выживаемость пациенток с РШМ ( $p=0,009$ ). Регрессия Кокса далее выявила значимость комбинации полиморфизмов ( $\beta=0,38$ ,  $p=0,025$ , HR=1,47, 95% ДИ = 1,05-2,05). Функциональный анализ этих полиморфизмов

показал, что аллель G rs1058808 был связан с более сильной экспрессией гена *ERBB2* (Gao et al., 2019). Опираясь на эту публикацию, мы провели ассоциативный анализ rs1136201, однако, ассоциации обнаружено не было (таблицы 32-33 Приложения).

*Частые замены (более 5%) в генах, не ответственных напрямую за опухолеобразование, выявленные у пациенток с клиническим диагнозом рак шейки матки*

В результате исследования нами были рассмотрены SNP 7 генов, не связанных с опухолеобразованием: *F5*, *OPRM1*, *SLO1D1*, *NAT2*, *CYP2B6*, *MTHFR*. Для полиморфных вариантов 3 генов ассоциаций найдено не было (таблицы 34-35 Приложения, таблицы 34-35).

В результате проведения ассоциативного исследования нами были выявлены ассоциации с риском развития РШМ (таблицы 25-26) для полиморфных вариантов гена *NAT2*.

Полиморфный вариант c.803G>A, p.Arg268Lys гена *NAT2* (rs1208, chr8:18258316). Частота аллеля А в нашей выборке несколько выше общепопуляционной (0,639 против 0,592, согласно GnomAD 4.1). Для данного варианта был проведен ассоциативный анализ, группой сравнения в котором выступила когорта условно-здоровых пациенток. Была обнаружена ассоциация риска развития РШМ у женщин с генотипом AA  $p=0,02$  ( $\chi^2=7,88$ ). А при расчете доминантной модели наследования (тест хи-квадрат,  $df = 1$ ) ассоциация с генотипом AA составила  $p=0,01$  ( $\chi^2=6,08$ ).

Изоферменты N-ацетилтрансферазы (NAT), NAT1 и NAT2, являются полиморфными и катализируют как N-ацетилирование, так и O-ацетилирование ароматических и гетероциклических аминных канцерогенов. Генетические полиморфизмы связаны с рядом ферментов, участвующих в метаболизме канцерогенов, важных для индукции HNC. Было высказано предположение, что такие полиморфизмы могут быть связаны с восприимчивостью к раку (Khelifi et al., 2013). Показано, что происхождение популяции в значительной степени влияет на

генетическую изменчивость ферментов ХМЕ. Так тунисцы демонстрируют характерную картину.

Таблица 25. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs1208 гена *NAT2* между пациентками с РШМ и группой условно- здоровых индивидов

Аллели										
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ		$\chi^2$	ОШ	95% ДИ	P		
rs1208	A	0,639	0,589		1,09	1,24	0,83-1,84	0,3		
Генотипы										
rs1208	N	Число генотипов			Частоты генотипов			$\chi^2$ , p		
Генотипы	204	AA	AG	GG	AA	AG	GG	$\chi^2=7,88$ p= 0,02		
РШМ	108	41	56	11	0,380	0,518	0,102			
Здоровые	96	39	35	22	0,406	0,364	0,229			

Прогнозы *in silico* показали пагубное влияние замены p.Arg268Lys гена *NAT2* на функцию CYP2D6, результаты подтвердили ее ключевую роль в восприимчивости к раку. Эти данные показывают, что структуры генов детоксикации зависят от изучаемой популяции. Это говорит о том, что этнические различия влияют на риск заболевания или реакцию на лекарства и, следовательно, должны учитываться в исследованиях генетических ассоциаций, сосредоточенных на ферментах ХМЕ (Khelifi et al., 2014). Полиморфный вариант rs1208 был так же ассоциирован с раком полости рта в Пакистанской популяции (Imam et al., 2021). Medina-Sanson M. с соавторами предоставили доказательства связи между полиморфизмами *NAT2*, в том числе rs1208, взаимодействием генов и окружающей среды и риском острого лимфобластного лейкоза у детей в Мексике (Medina-Sanson et al., 2020).

Полиморфный вариант с.341T>C, p.Ile114Thr гена NAT2 (rs1801280, chr8:18257854). Частота аллеля Т в нашей выборке несколько выше общепопуляционной (0,630 против 0,579 согласно GnomAD 4.1). Ранее было установлено, что полиморфный вариант гена NAT2 (341T>C; rs1801280) является протективным фактором для возникновения плоскоклеточного рака пищевода в Африканской популяции (Simba et al., 2019). Была обнаружена ассоциация риска развития РШМ с генотипом TT  $p=0,02$  ( $\chi^2=8,15$ ). А при расчете доминантной модели наследования (тест хи-квадрат,  $df = 1$ ) ассоциация с генотипом TT составила  $p=0,01$  ( $\chi^2=6,08$ ).

Таблица 26. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs1801280 гена NAT2 между пациентками с РШМ и группой условно- здоровых индивидов

Аллеи							
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ	$\chi^2$	ОШ	95% ДИ	P
rs1801280	T	0,630	0,583	0,91	1,21	0,82-1,81	0,34
Генотипы							
rs1801280	N	Число генотипов			Частоты генотипов		
Генотипы	204	TT	TC	CC	TT	TC	CC
РШМ	108	39	58	11	0,361	0,537	0,102
Здоровые	96	38	36	22	0,396	0,375	0,229

$\chi^2=8,15$   
 $p=0,02$

### *Анализ полиморфных вариантов в гене MTHFR*

Полиморфные варианты гена *MTHFR*, включая C677T (rs1801133) и A1298C (rs1801131), приводят к снижению активности фермента метилентетрагидрофолатредуктазы, который играет решающую роль в метаболическом пути фолата, синтезе и метилировании ДНК (Hajiesmaeil et al., 2016). Проведенный Yi K. и соавторами мета-анализ показал, что вариант C677T гена *MTHFR* не ассоциирован с риском развития РШМ, но полиморфизм A1298C гена *MTHFR* может быть фактором риска (Yi et al., 2016). Более поздний мета-анализ предполагает, что варианты C677T и A1298C гена *MTHFR* коррелируют с риском распространенных гинекологических раковых заболеваний, в том числе с РШМ (Wang et al., 2021).

Полиморфный вариант c.677C>T, p.Ala222Val гена *MTHFR* (rs1801133, chr1:11856378) был оценен в базе данных «Variant Interpreter» (Illumina, Калифорния, США) как патогенный, а вариант c.1298A>C, p.Glu429Ala (rs1801131, chr1:11854476) - как вероятно патогенный. Сравнительный анализ частот вариантов данного полиморфизма между выборками женщин с РШМ и женщинами с элиминацией ВПЧ не выявил статистически значимых различий для аллеля T ( $p=0,96$ ) и генотипа TT ( $p=0,75$ ) локуса rs1801133 гена *MTHFR* (таблица 27), аллеля C ( $p=0,475$ ) и генотипа CC ( $p=0,655$ ) локуса rs1801131 гена *MTHFR* (таблица 28). Вероятно, патогенность вариантов гена *MTHFR* в первую очередь связана с метаболизмом фолатов, но не с развитием РШМ. Ввиду того, что не обнаружено тенденций к ассоциации, мы посчитали нецелесообразным расширение выборки контрольных образцов.

Но несмотря на то, что не было выявлено ассоциации с предрасположенностью к риску развития РШМ, нами было установлено, что аллель Т полиморфного варианта rs1801133 гена *MTHFR* ассоциирован с переходом порога трехлетней выживаемости и предполагает более мягкое течение болезни:  $p=0,05$  ( $\chi^2=3,83$ ) (таблица 36 Приложения). А при расчете аддитивной модели наследования (тест Кохрана-Армитаджа) ассоциация лучшей

выживаемости с генотипом TT составила  $p=0,04$  ( $\chi^2=4,19$ ). Однако после применения поправки Холдейна–Энскомба ассоциации не наблюдаются.

Таблица 27. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs1801133 гена *MTHFR* между пациентками с РШМ и группой женщин с зафиксированной элиминацией ВПЧ

Аллели										
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ		$\chi^2$	ОШ	95% ДИ	P		
rs1801133	T	0,287	0,284		0,003	1,207	0,720-2,022	0,96		
Генотипы										
rs1801133	N	Число генотипов			Частоты генотипов			$\chi^2$ , p		
Генотипы	159	TT	TC	CC	TT	TC	CC	$\chi^2=0,59$ $p=0,75$		
РШМ	108	7	48	53	0,065	0,444	0,491			
Здоровые	51	2	25	24	0,039	0,490	0,471			

В то же время нами показано, что для rs1801131 гена *MTHFR* выявлена ассоциация с тяжелым течением болезни для аллеля C  $p=0,004$  ( $\chi^2=8,37$ ) и генотипа CC  $p=0,01$  ( $\chi^2=8,69$ ) (таблица 36 Приложения), что подтверждает влияние данного полиморфного варианта на течение заболевания.

Оба полиморфных варианта не показали какой-либо корреляции между генотипами и возрастом манифеста заболевания. Средний возраст манифеста РШМ для всех генотипов rs1801133 и rs1801131 гена *MTHFR* составил 49,8 лет. Для rs1801133 он составил 50,2 года (49,2-50,8), для rs1801131 49,5 лет (47,8-51,4).

Таблица 28. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs1801131 гена *MTHFR* между пациентками с РШМ и группой женщин с зафиксированной элиминацией ВПЧ

Аллели										
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ		$\chi^2$	ОШ	95% ДИ	P		
rs1801131	C	0,324	0,284		0,511	1,013	0,602-1,707	0,475		
Генотипы										
rs1801131	N	Число генотипов			Частоты генотипов			$\chi^2$ , p		
Генотипы	159	CC	CA	AA	CC	CA	AA	$\chi^2=0,845$ p= 0,65		
РШМ	108	11	48	49	0,102	0,444	0,454			
Здоровые	51	5	19	27	0,098	0,373	0,529			

#### 4.1 Оценка прогностической роли выявленных маркеров в риске развития рака шейки матки

Заключительным этапом нашего исследования стала оценка прогностической роли выявленных маркеров в развитие рака шейки матки на основе полиморфных вариантов, связанных с риском возникновения ВПЧ-обусловленного рака шейки матки. Для оптимизации параметров классификации был проведён ROC-анализ и выбран оптимальный порог отсечения, обеспечивающий необходимый баланс между чувствительностью и специфичностью модели. Качество классификации оценивалось с помощью площади под ROC-кривой (AUC), а также путём определения чувствительности и специфичности при выбранном пороге. Нами были отобраны полиморфные варианты rs1058808, rs1208, rs1801280, rs27069 и rs2268177 на основании того, что для них были продемонстрированы те или иные ассоциации с риском развития исследуемого заболевания. Так же в модель был

включен SNP rs10175462, так как на малой малой группе сравнения для него была показана тенденция к ассоциации. В результате этого нами была получена модель, значимый эффект в которой обнаружен только для генотипа АТ rs2268177 ( $p=0,0145$ ) (рисунок 12, таблица 29).

Таблица 29. Оценка прогностической роли rs1058808, rs1208, rs1801280, rs27069, rs2268177 и rs10175462 в развитии рака шейки матки

Coefficients				
	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	-1,60876	1,49529	-1,076	0,2820
rs1058808CG	-0,21589	0,61518	-0,351	0,7256
rs1058808GG	-0,06876	0,60753	-0,113	0,9099
rs1208GA	0,18198	0,60222	0,302	0,7625
rs1208GG	-0,58336	1,16898	-0,499	0,6178
rs1801280TC	0,62270	1,18011	0,528	0,5977
rs1801280TT	0,83222	1,19485	0,697	0,4861
rs27069AG	0,31690	0,59257	0,535	0,5928
rs27069GG	0,90243	0,61289	1,472	0,1409
rs10175462GA	0,30110	0,51091	0,589	0,5556
rs10175462GG	0,24056	0,51371	0,468	0,6396
rs2268177AT	0,92829	0,37959	2,445	0,0145 *
rs2268177TT	17,70689	1103,17245	0,016	0,9872

Коэффициент 0,92829 означает, что этот генотип увеличивает логарифм шансов положительного исхода. Для остальных генотипов р-значения значительно выше 0,05, что говорит об отсутствии статистически значимого влияния. Однако коэффициент для генотипа rs2268177 очень большой (17,7) с огромной стандартной ошибкой (1103), что указывает на нестабильность оценки. Это вероятнее всего связано с тем, что этот генотип не встречается в группе здоровых индивидов, из-за чего модель не может адекватно оценить его эффект. Для генотипа АТ rs2268177 ОШ= $e^{0,92829} \approx 2,53$ . Это значит, что наличие генотипа АТ увеличивает шансы положительного исхода, то есть риска развития РШМ, примерно в 2,5 раза по сравнению с референсным генотипом АА.

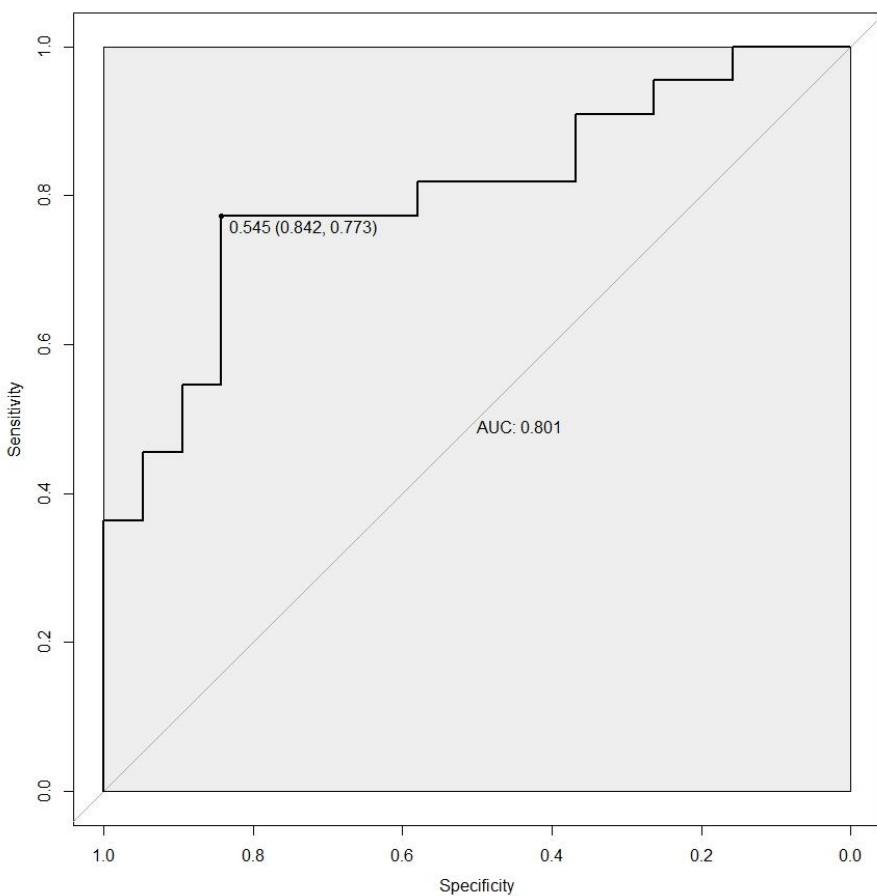


Рисунок 12 – Оценка прогностической роли rs1058808, rs1208, rs1801280, rs27069, rs2268177 и rs10175462 в развитии рака шейки матки

Далее с целью подтверждения полученных данных и оценки прогностической роли выявленных маркеров в персистенции ВПЧ мы отобрали полиморфные варианты rs2268177, rs27069 и rs10175462. В качестве группы сравнения в данной модели использовались данные генотипирования группы условно-здоровых женщин с элиминацией ВПЧ. В результате этого нами была получена модель, в которой интерсепт, то есть константа или логарифм шансов при всех предикторах, равных нулю составил -2,1011, что в терминах логистической регрессии означает, что при всех предикторах, равных нулю, логарифм шансов положительного исхода равен -2,1011. При преобразовании логарифма шансов в вероятность мы получаем, что при нулевых значениях всех предикторов вероятность положительного исхода, то есть персистенции ВПЧ, около 10,9%. Малое р-значение говорит о том, что этот интерсепт статистически

значим, и его включение в модель оправдано. Коэффициенты для генотипов АТ и ТТ для rs22681772 значимо увеличивают логарифм шансов положительного исхода. Особенно ТТ – с большим коэффициентом (1,2560), что говорит о более сильном эффекте (рисунок 13, таблица 30).

Таблица 30. Оценка прогностической роли rs27069, rs2268177 и rs10175462 в персистенции ВПЧ-инфекции

Coefficients				
	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	-2,1011	0,4850	-4,332	1,48e-05 ***
rs27069AG	0,2683	0,4185	0,641	0,52148
rs27069GG	0,4232	0,4213	1,004	0,31516
rs10175462AG	0,2594	0,3520	0,737	0,46109
rs10175462GG	0,2800	0,3697	0,757	0,44878
rs22681772AT	0,6175	0,2631	2,347	0,01893 *
rs22681772TT	1,2560	0,4141	3,033	0,00242 **

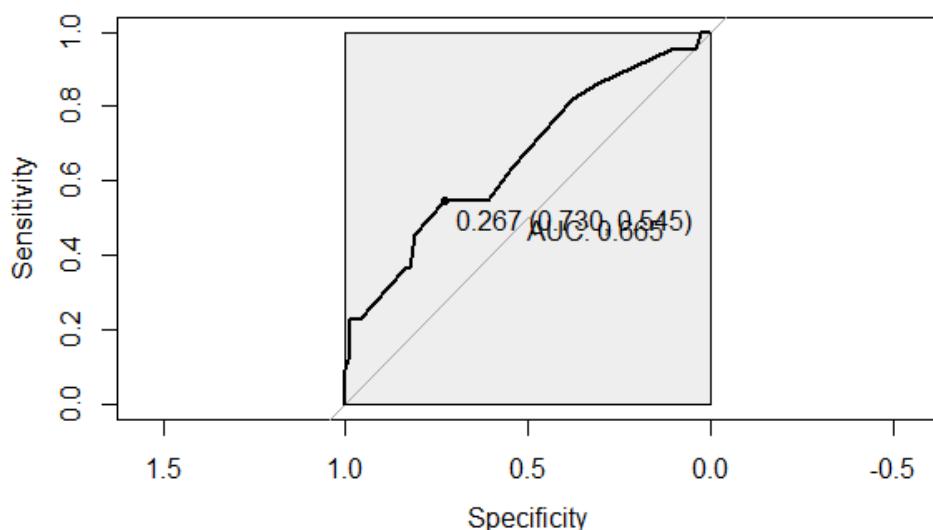


Рисунок 13 – Оценка прогностической роли rs27069, rs2268177 и rs10175462 в персистенции ВПЧ-инфекции

Анализ коэффициентов для rs27069 и rs10175462 демонстрирует, что все p-значения >0,05, значит, эти генотипы не оказывают статистически значимого влияния на вероятность события в вашей модели, что согласуется с данными,

полученными в предыдущей прогностической модели. Анализ для генотипа TT rs22681772 показал, что коэффициент изменения логорифма шансов составил 1,2560. Чтобы получить отношение шансов (ОШ, odds ratio, OR), нужно взять экспоненту:  $ОШ=e^{1,2560} \approx 3,51$ . Это значит, что наличие генотипа TT увеличивает шансы положительного исхода примерно в 3,5 раза по сравнению с референсом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак шейки матки представляет собой значительную проблему для здравоохранения во всем мире. Данная патология занимает 4 место в структуре онкологических заболеваний у женщин, уступая только раку молочной железы, колоректальному раку и раку легких (Srinivasan et al., 2024). Подавляющее число случаев рака шейки матки связаны с папилломовирусной инфекцией. И уже около 40 лет, с того момента как была доказана роль ВПЧ в развитии РШМ, основной фокус внимания в борьбе с цервикальным раком был обращен на профилактику ВПЧ при помощи скрининга и вакцинации или на изучение механизмов канцерогенеза, запускаемых онкогенным вирусом. Однако, несмотря на рациональный подход к изучению РШМ, на некоторое время было упущено то, что данное онкологическое заболевание, согласно исследованиям в семьях с зафиксированными случаями РШМ, имеет достаточно высокий наследственный компонент, близкий к таковому для рака молочной железы. На это указывает и то, что более 90 процентов случаев ВПЧ-носительства заканчиваются спонтанной элиминацией вируса уже в течении 2 лет, а РШМ развивается в минимальном количестве случаев при повсеместной распространенности ВПЧ. Эти данные предполагают, что в случае выявления патогенных мутаций или полиморфных вариантов предрасположенности к РШМ, появится возможность создания генетического тестирования на предрасположенность к РШМ, который поможет корректировать скрининговые программы и выделить группу риска.

Применение генетического тестирования особенно значимо в свете того, что, согласно нашему исследованию, сами по себе высокие показатели вирусной нагрузки, которые наряду с онкогенностью вируса часто используются для прогноза течения ВПЧ-инфекции, далеко не всегда предполагают онкотрансформацию в будущем. Именно персистенция ВПЧ, которая безусловно контролируется иммунным ответом и генетическим компонентом, является ключом к пониманию драйверных механизмов возникновения РШМ. В то же время согласно нашему исследованию более 50% женщин, протипированных на

ВПЧ, даже в случае вакцинации 9-ти валентной вакциной остаются в группе риска, так как у них обнаружены онкогенные типы, вакцинация против которых не разработана на сегодняшний день.

В настоящее время выявлен ряд генов, причастных к предрасположенности к РШМ. Ранние исследования были состредоточены на применении ген-кандидатного анализа в некоторых этнических группах. В результате этих исследований, например, в ряде работ, о которых описано выше, были выявлены ассоциации полиморфных вариантов p.Pro72Arg гена *TP53* и p.Glu429Ala гена *MTHFR*. Не смотря на отсутствие ассоциации с генетической предрасположенностью к развитию РШМ в исследуемой нами популяции, нами было показано, что для генотипа GG полиморфизма p.Pro72Arg гена *TP53* характерен более ранний манифест заболевания, а полиморфизм p.Glu429Ala гена *MTHFR* ассоциирован с меньшей выживаемостью пациенток. Ассоциация rs1801131 гена *MTHFR* с более тяжелым течением болезни для аллеля C p=0,004 ( $\chi^2=8,37$ ) и генотипа CC p=0,01 ( $\chi^2=8,69$ ) предполагает, что полиморфный вариант p.Glu429Ala гена *MTHFR* может быть использован для прогноза течения заболевания у пациенток с РШМ.

На смену ген-кандидатному анализу пришел проект по GWAS-исследованию герминальной составляющей РШМ, в итоге чего были подтверждены данные о вкладе в предрасположенность к РШМ полиморфных вариантов в генах *HLA* и *PAX8*, а также выявлены новые ассоциации для генов *LINC00339*, *CDC42*, *CLPTM1L*, *GSDMB*. Нами были выбраны три полиморфные варианта для анализа ассоциации к предрасположенности к РШМ в популяции из Республики Башкортостан, в результате чего для гена *PAX8* ассоциации выявлено не было, но были показаны ассоциации с рисковым аллелем G полиморфного локуса rs27069 гена *CLTP1L* и с рисковым аллелем Т и генотипом ТТ локуса rs2268177 гена *CDC42*. Таким образом rs27069 гена *CLTP1L* и rs2268177 гена *CDC42* являются кандидатами для включения в предикторную панель для прогнозирования риска развития РШМ для исследуемой популяции.

Применение секвенирования нового поколения в качестве нового метода исследования генетической предрасположенности продемонстрировало гетерогенность как соматического, так и герминального ландшафта замен у пациенток с РШМ. Для исследования предрасположенности к РШМ мы использовали разработанную нами кастомную NGS панель, состоящую из 48 генов, 28 из которых являются онкогенами. В среднем, в зависимости от панели генов, используемой для анализа, среднее количество герминальных патогенных замен, согласно литературным данным, составляет около 5%. В нашем исследовании было выявлено 4,7% патогенных и вероятно патогенных замен вprotoонкогенах и генах супрессорах опухолей: c.470T>C, p.Ile157Thr гена *CHEK2*, c.2507C>G, p.Ser836Ter гена *APC*, c.9154C>T, p.Arg3052Trp гена *BRCA2*, c.1592G>T, p.Trp531Leu гена *BRAF*, c.350G>A, p.Trp117Ter гена *MSH2*, c.2116delG, p.Asp706GlyfsTer11 гена *MSH2*, c.3261dupC, p.Phe1088LeufsTer5 гена *MSH6*. При этом нами было показано с использованием ассоциативного исследования, что полиморфизм p.Ile157Thr гена *CHEK2* не является патогенным для РШМ, а замена p.Asp706GlyfsTer11 гена *MSH2* доброкачественной на основании анализа по поиску MSI. В то же время остальные пять патогенных замен в «опухолевых» генах по нашему наблюдению повлияли на возникновение и прогрессию РШМ.

Особый интерес представляют замены неясного клинического значения, обнаруженные у пациенток с РШМ. В ходе нашего исследования мы проанализировали 54 редкие замены в онкогенах на предмет их значимости в предрасположенности к РШМ. Мы использовали различные подходы, основными из которых было использование биоинформационических инструментов *in silico*, анализ распространенности замены в мировой популяции и в когорте пациенток, ассоциативный анализ, применение метода фрагментного анализа для исследования 5 микросателлитных локусов (MSI) и изучение литературы. В результате такого подхода мы выдели 7 вероятно патогенных для РШМ варианта.

Для миссенс-варианта c.2962C>T, p.Arg988Cys в гене *MET* были выявлены статистически значимые различия в распространенности аллеля Т ( $p=0,002$ ;

$\chi^2=9,8$ ) между группами сравнения, что позволяет сделать вывод о значимости данного варианта в развитии РШМ. Кроме того, согласно литературным данным эта замена относится к варианту с усилением функции, а такие варианты могут быть факторами предрасположенности к раку при их сочетании с онкогеном, который управляет клеточной пролиферацией, но не влияют напрямую на онкотрансформацию. Таким образом, с учетом патогенеза РШМ эта замена может быть заменой предрасположенности к РШМ и усиливать онкогенный эффект ВПЧ. Возможно, в решении вопроса по поиску замен предрасположенности к РШМ, стоит обратить пристальное внимание не только на патогенные варианты, но и на замены с усилением функции. На сегодняшний день по данным, продемонстрированным нами на выборке из Республики Башкортостан, вариант p.Arg988Cys в гене *MET* обнаружен только у пациенток с РШМ.

Так же с использованием анализа распределения частот аллелей и генотипов нами была показана ассоциация для аллеля С локуса rs1060502712 гена *CHEK2*. Несмотря на его редкую встречаемость, при использовании поправки Холдейна–Энскомба продемонстрирована ассоциация с риском развития РМШ ( $p=0,05$ ) (таблица 22). В связи с крайней редкостью этого варианта трудно сделать выводы о его вкладе в патогенез РШМ, опираясь исключительно на результаты ассоциативного анализа. Однако, если учитывать область белка, на которую приходится эффект замены, данные DynaMut2, AlphaMissense, PrimateAI-3D и выявленную ассоциацию с аллелем С, замена c.972C>G, p.Cys324Trp гена *CHEK2* может обладать патогенным потенциалом.

Кроме того, при использовании *in silico* инструментов мы показали, что варианты c.3061C>T, p.Arg1040Trp гена *ABL1*, c.2039G>A, p.Arg680Gln гена *EGFR*, c.6733C>T, p.Gly2245Ser гена *ROS1*, c.3695G>C, p.Gly1299Arg в гене *MET* и c.1196C>T, p.Pro399Leu в гене *MSH6* являются вероятно патогенными ввиду того, что наибольшее количество биоинформационических инструментов говорят о том, что замены являются патогенными.

Мы так же проанализировали 28 частых полиморфных вариантов, выявленных в результате секвенирования нового поколения, 13 из которых были

обнаружены в онкогенах, 15 в генах не ответственных напрямую за опухолеобразование. В результате этого нами была обнаружена ассоциация риска развития РШМ с мажорным аллелем G p=0,046 ( $\chi^2=3,97$ , ОШ=1,52) замены c.3508C>G, p.Pro1170Ala гена *ERBB2*. При применении метода расчета Аддитивной модели наследования (тест Кохрана-Армитаджа) была обнаружена так же ассоциация с генотипом GG p=0,045 ( $\chi^2=4,03$ , ОШ=1,95). А при расчете рецессивной модели наследования (тест хи-квадрат, df=1) ассоциация с генотипом GG составила p=0,02 ( $\chi^2=5,47$ , ОШ=1,95).

Кроме этого, были обнаружены 2 ранее не описанные ассоциации в гене *NAT2*. Полиморфный вариант p.Arg268Lys гена *NAT2* продемонстрировал ассоциацию с риском развития РШМ для генотипа AA p=0,02 ( $\chi^2=7,88$ ). А при расчете доминантной модели наследования (тест хи-квадрат, df = 1) ассоциация с генотипом AA составила p=0,01 ( $\chi^2=6,08$ ). Полиморфный вариант p.Ile114Thr гена *NAT2* продемонстрировал ассоциацию с риском развития РШМ для генотипа TT p=0,02 ( $\chi^2=8,15$ ). А при расчете доминантной модели наследования (тест хи-квадрат, df = 1) ассоциация с генотипом TT составила p=0,01 ( $\chi^2=6,08$ ).

Таким образом, в результате проведенного нами исследования мы получили данные о распространенности ВПЧ и типов ВПЧ у женщин из Республики Башкортостан, выделили группу риска, представляющую из себя пациенток с персистентным типом вирусонасительства и группу контроля, которая состояла из 51 одной женщины со спонтанной элиминацией ВПЧ. Первыми в России провели реплекативные исследования по предрасположенности к РШМ, опираясь на результаты GWAS. В результате проведения секвенирования нового поколения выделили широкую группу вероятно патогенных замен, которая представляет собой глубокий научно-практический интерес и нуждается в дальнейшем изучении.

## ВЫВОДЫ

1. Частота инфицирования ВПЧ ВКР среди женщин возрастной категории 30-39 лет в исследуемом регионе России составила 10,3%, а средний уровень вирусной нагрузки составил 287,9 отношения RLU/COV в общей выборке, что соответствует высокой вирусной нагрузке.
2. 56,6% ВПЧ-инфицированных женщин являются носителями как минимум трех типов вируса, самые распространенные из которых 16, 51 и 56. Не выявлено прямой зависимости между вирусной нагрузкой, элиминацией вируса и количеством типов ВПЧ в образце.
3. Выявлена группа редких герминальных патогенных вариантов у пациенток с раком шейки матки: c.2507C>G, p.Ser836Ter гена *APC*, c.9154C>T, p.Arg3052Trp гена *BRCA2*, c.1592G>T, p.Trp531Leu гена *BRAF*, c.350G>A, p.Trp117Ter гена *MSH2*, c.3261dupC, p.Phe1088LeufsTer5 гена *MSH6*. При использовании *in silico* инструментов мы показали, что варианты c.3061C>T, p.Arg1040Trp гена *ABL1*, c.2039G>A, p.Arg680Gln гена *EGFR*, c.6733C>T, p.Gly2245Ser гена *ROS1*, c.3895G>C, p.Gly1299Arg в гене *MET* и c.1196C>T, p.Pro399Leu в гене *MSH6* являются вероятно патогенными.
4. Выявлены ранее не описанные ассоциации с риском развития рака шейки матки для вариантов c.2962C>T, p.Arg988Cys в гене *MET* и c.972C>G, p.Cys324Trp гена *CHEK2*, c.3508C>G, p.Pro1170Ala гена *ERBB2*, c.803G>A, p.Arg268Lys и c.341T>C, p.Ile114Thr гена *NAT2*.
5. Установлена связь полиморфного варианта c.215C>G, p.Pro72Arg гена *TP53* с ранней манифестацией рака шейки матки, а вариант c.1298A>C, p.Glu429Ala гена *MTHFR* с трехлетней выживаемостью.
6. В результате исследования полиморфных вариантов, ассоциированных в результате GWAS исследования с риском развития РШМ, получены статистически значимые ассоциации с рисковым аллелем G полиморфного локуса rs27069 гена *CLTP1L* и с рисковым аллелем Т и генотипом ТТ локуса

rs2268177 гена *CDC42*, однако не было выявлено ассоциации с полиморфизмом rs10175462 гена *PAX8*.

7. Выявлена важная прогностическая роль полиморфного варианта rs2268177 гена *CDC42* в развитии рака шейки матки. Наличие рискового генотипа увеличивает шансы возникновения рака шейки матки примерно в 2,5 раза, а персистенции ВПЧ в 3,5 раза по сравнению с референсным генотипом.

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

РШМ – Рак шейки матки

ПР – Плоскоклеточный рак

АК – Аденокарцинома

ВПЧ – Вирус папилломы человека

ВКР – Высокого канцерогенного риска

TBS - Единая классификация Bethesda

NILM – (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy) внутриэпителиальных злокачественных изменений или злокачественности невыявлено

ASC-US – (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) атипичные клетки плоского эпителия неопределенной значимости

ASC-H – (Atypical Squamous Cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion) атипичные клетки плоского эпителия, нельзя исключить сильно выраженное внутриэпителиальное поражение

LSIL – (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion) слабовыраженные плоскоклеточные внутриэпителиальные поражения

HSIL – (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion) сильновыраженные плоскоклеточные внутриэпителиальные поражения

CIS – (Carcinoma in situ) карцинома in situ

AGS-NOS – (Atypical glandular cells not otherwise specified) атипичные железистые клетки неясного значения

AGC-FN – (Atypical glandular cells favor neoplastic) клетки цервикального (железистого) эпителия, возможно неоплазия

AIS – (Adenocarcinoma in situ) аденокарцинома шейки матки in situ

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

NGS – Next generation sequencing (секвенирование следующего поколения)

В – Variant of benign (варианты с доброкачественным клиническим значением)

LB – Variant of likely benign (варианты с вероятно доброкачественным клиническим значением)

VUS – Variant of uncertain significance (варианты с неопределенным клиническим значением)

LP – Variant of likely pathogenic (варианты с вероятно патогенным клиническим значением)

P – Variant of pathogenic (варианты с патогенным клиническим значением)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев А.О. Новые возможности ранней предикции предраковых и раковых заболеваний шейки матки: стратификация рисков на основе анализа метилирования генов / А.О. Андреев, Г.Р. Байрамова, А.Р. Зарецкий, и др. // Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения. – 2023. – Т. 11, №. 2 (40). – С. 44-49.
2. Барчук А.А. Скрининг онкологических заболеваний на уровне государственных программ: обзор, рекомендации и управление / А.А. Барчук, Ю.В. Раскина, О.А. Смирнова, и др. // Общественное здоровье. – 2021. – Т. 1, №. 1. – С. 19-31.
3. Белокриницкая Т.Е. Результаты тестирования на вирус папилломы человека при самостоятельном и врачебном заборе материала / Т.Е. Белокриницкая, Н.И. Фролова, О.В. Туранова, и др. // Гинекология. – 2017. – Т. 19, №. 1. – С. 56-62.
4. Гилядова А.В. Фотодинамическая терапия предраковых заболеваний и рака шейки матки (обзор литературы) / А.В. Гилядова, Ю.С. Романко, А.А. Ищенко, и др. // Biomedical Photonics. – 2022. – Т. 10, №. 4. – С. 59-67.
5. Глобальная стратегия по ускорению ликвидации рака шейки матки как проблемы общественного здравоохранения [Электронный] = Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. — Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2022. — Режим доступа: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/d294ae26-732b-44c0-a191-1712ece517b3/content> (дата обращения: 23.03.2025).
6. Дамиен К.С.Р. Рак шейки матки: профилактика и скрининг (новые данные) / К.С.Р. Дамиен, М.А. Союнов // Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения. – 2018. – №. 3 (21). – С. 72-82.
7. Доброхотова Ю.Э. Вакцинация от вируса папилломы человека: доказательная база эффективности и безопасности / Ю.Э. Доброхотова, Е.И. Боровкова. // Гинекология. – 2021. – Т. 23, №. 2. – С. 125-130.
8. Довлетханова Э.Р. Опыт применения противовирусного препарата растительного происхождения у пациентов с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями / Э.Р. Довлетханова, В.Н. Прилепская. // ОППОНЕНТ. – 2023. – С. 42.

9. Кузнецова А.И. Беременность и рак шейки матки / А.И. Кузнецова, Ю.А. Петров, Н.В. Ермолова. // Главный врач Юга России. – 2022. – №. 2 (83). – С. 25-28.
10. Кызы Б.С.А. Перспективы комплексного скрининга и терапии рака шейки матки / Б.С.А. Кызы, Р.Р. Мухаметова, Б. Жао. // Креативная хирургия и онкология. – 2024. – Т. 14, №. 1. – С. 60-68.
11. МикроРНК как маркеры прогрессирования предраковых заболеваний в рак шейки матки / Т.А. Димитриади, Д.В. Бурцев, Е.А. Дженкова, Д.С. Кутилин// Современные проблемы науки и образования. 2020; 1. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29529> (дата обращения: 04.03.2023)
12. Минниахметов И.Р. Пилотный проект по скринингу рака шейки матки с применением ВПЧ тестирования / И.Р. Минниахметов, М.В. Забелин, И.Г. Ольков и др. // Вопросы онкологии. – 2020. – Т. 66, №. 6. – С. 618-624.
13. Мусралиева З.А. Вирус папилломы человека: механизмы заражения и пути передачи / З.А. Мусралиева, Я.А. Абдуллаева, Л.Л.А. Хочубарова. // Биология и интегративная медицина. – 2025. – С. 602-619.
14. Новик В.И. Дискуссионные вопросы цитологического скрининга рака шейки матки (обзор литературы) / В.И. Новик. // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2020. – Т. 16, №. 2. – С. 63-71.
15. Пестрикова Т.Ю. Целесообразность иммуноцитохимического исследования как маркера пролиферативной активности при цервикальной интраэпителиальной неоплазии / Т.Ю. Пестрикова, А.Ф.К. Исмайлова. // Гинекология. – 2022. – Т. 24, №. 1. – С. 47-50.
16. Ротару Т.В. Генетическая предрасположенность при раке шейки матки / Т.В. Ротару, Л.И. Ротару, Н. П. Лапочкина. // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2020. – Т. 14, №. 2. – С. 218-228.
17. Смирнова Т.Л. Анализ заболеваемости раком шейки матки / Т.Л. Смирнова, С.А. Ястребова, Н. Даҳмани. // Цифровые технологии в научном развитии: новые концептуальные. – 2024. – С. 177.
18. Трякин А.А. Микросателлитная нестабильность как уникальная характеристика опухолей и предиктор эффективности иммунотерапии / А.А. Трякин, М.Ю.

- Федягин, А.С. Цуканов., и др. // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т. 9, №. 4. – С. 58-68.
19. Хайлова Ж.В. Клиническая и экономическая оценка эффективности современных стратегий скрининга и ранней диагностики рака шейки матки в Российской Федерации / Ж.В. Хайлова, В.В. Омельяновский, Р.А. Терян, и др. // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2025. – Т. 21, №. 1. – С. 86-105.
20. Юсупова Л.А. Современное состояние проблемы папилломавирусной инфекции / Л.А. Юсупова, Е.И. Юнусова, З.Ш. Гараева, и др. // Лечащий врач. – 2019. – №. 7. – С. 64.
21. Ящук А.Г. Разнообразие типов вируса папилломы человека в популяции женщин г. Уфы / А.Г. Ящук, И.Р. Рахматуллина, Р.М. Зайнуллина, и др. // Медицинский вестник Башкортостана. – 2019. – Т. 14, №. 2 (80). – С. 25-29.
22. Abou Tayoun A.N. Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion / A.N. Abou Tayoun, T. Pesaran, M.T. DiStefano, et al. // Human mutation. – 2018. – Vol. 39, №. 11. – P. 1517-1524.
23. Abu-Rustum N.R. NCCN Guidelines® Insights: Cervical Cancer, Version 1.2024 / N.R. Abu-Rustum, C.M. Yashar, R. Arend, et al. // J Natl Compr Canc Netw. - 2023. - Vol. 21. - P. 1224-1233.
24. Afanasiev M.S. Photodynamic therapy for early-stage cervical cancer treatment / M.S. Afanasiev, A.D. Dushkin, T.G. Grishacheva, et al. // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2022. – Vol. 37. – P. 102620.
25. Alanazi I.O. Association of HER1 and HER2 gene variants in the predisposition of colorectal cancer / I.O. Alanazi, J.P. Shaik, N.R. Parine, et al. // Journal of Oncology. – 2021. – Vol. 2021, №. 1. – P. 6180337.
26. Allemani C. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2) / C. Allemani, H.K. Weir, H. Carreira, et al. // The lancet. – 2015. – Vol. 385, №. 9972. – P. 977-1010.

27. Alrajjal A. Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of uterine cervix and bethesda system / A. Alrajjal, V. Pansare, M.S.R. Choudhury, et al. // Cytojournal. – 2021. – Vol. 18. – P. 16.
28. Alves J.J.P. Th17 response in patients with cervical cancer / J.J.P. Alves, T.A.A. De Medeiros Fernandes, J.M.G. De Araújo, et al. // Oncology letters. – 2018. – Vol. 16. – №. 5. – P. 6215-6227.
29. Antill Y.C. Association of Lynch syndrome and risk of invasive cervical cancer / Y.C. Antill, J. Dowty, A. Win, et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2010. – Vol. 28, №. 15\_suppl. – P. 1501-1501.
30. Antill Y.C. Lynch syndrome and cervical cancer / Y.C. Antill, J.G. Dowty, A. K. Win, et al. // International journal of cancer. – 2015. – Vol. 137, №. 11. – P. 2757-2761.
31. Arango-Bravo E.A. State of the art of cervical cancer treatment in rare histologies / E.A. Arango-Bravo, T. Galicia-Carmona, L. Cetina-Perez, et al. // Frontiers in Oncology. – 2024. – Vol. 14. – P. 1386294.
32. Arbyn M. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis / M. Arbyn, E. Weiderpass, L. Bruni, et al. // The Lancet Global Health. – 2020. – Vol. 8, №. 2. – P. e191-e203.
33. Arroyo Mühr L.S. Concomitant human papillomavirus (HPV) vaccination and screening for elimination of HPV and cervical cancer / L.S. Arroyo Mühr, A. Gini, E. Yilmaz, et al. // Nature Communications. – 2024. – Vol. 15, №. 1. – P. 3679.
34. Ayala-Calvillo E. Wnt/β-catenin pathway activation and silencing of the APC gene in HPV-positive human cervical cancer-derived cells / E. Ayala-Calvillo, L.H. Mojica-Vázquez, A. García-Carrancá, et al. // Molecular medicine reports. – 2018. – Vol. 17, №. 1. – P. 200-208.
35. Baloch A.H. Missense mutations (p. H371Y, p. D438Y) in gene CHEK2 are associated with breast cancer risk in women of Balochistan origin / A.H. Baloch, S. Daud, N. Raheem, et al. // Molecular biology reports. – 2014. – Vol. 41, №. 2. – P. 1103-1107.
36. Bell A.D. Analyzing copy number variation with droplet digital PCR / A.D. Bell, C.L. Usher, S.A. McCarroll. // Digital PCR: Methods and Protocols. – New York, NY: Springer New York, 2018. – P. 143-160.

37. Bertelsen B. High frequency of pathogenic germline variants within homologous recombination repair in patients with advanced cancer / B. Bertelsen, I.V. Tuxen, C.W. Yde, et al. // *NPJ genomic medicine*. – 2019. – Vol. 4, №. 1. – P. 13.
38. Bhatla N. Primary HPV screening for cervical cancer / N. Bhatla, S. Singhal. // *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. – 2020. – Vol. 65. – P. 98-108.
39. Bird A.P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation / A.P. Bird. // *Nature*. – 1986. – Vol. 321, №. 6067. – P. 209-213.
40. Boonen R.A. Functional analysis identifies damaging CHEK2 missense variants associated with increased cancer risk / R.A. Boonen, W.W. Wiegant, N. Celosse, et al. // *Cancer research*. – 2022. – Vol. 82, №. 4. – P. 615-631.
41. Borgogna J.C. The vaginal metabolome and microbiota of cervical HPV-positive and HPV-negative women: a cross-sectional analysis / J.C. Borgogna, M.D. Shardell, E.K. Santori, E. K., et al. // *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. – 2020. – Vol. 127, №. 2. – P. 182-192.
42. Bowden S.J. Genetic variation in cervical preinvasive and invasive disease: a genome-wide association study / S.J. Bowden, B. Bodinier, I. Kalliala, et al. // *The Lancet Oncology*. – 2021. – Vol. 22, №. 4. – P. 548-557.
43. Bowden S.J. Risk factors for human papillomavirus infection, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: an umbrella review and follow-up Mendelian randomisation studies / S.J. Bowden, T. Doulgeraki, E. Bouras, et al. // *BMC medicine*. – 2023. – Vol. 21, №. 1. – P. 274.
44. Bruni L., Albero G., Serrano B., Mena M., Collado J. J., Gómez D., Muñoz J., Bosch F. X., de Sanjosé S. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report [Электронный]. — 2021. — 20 October. — Режим доступа: <https://hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf> (дата обращения: 20.03.2025).
45. Bukowski A. Epigenome-wide differential methylation and differential variability as predictors of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+) / A. Bukowski, C. Hoyo, M. Graff, et al. // *American journal of epidemiology*. – 2025. – V. 194, №. 4. – P. 1012-1022.

46. Burd E.M. Human papillomavirus and cervical cancer / E.M. Burd. // Clinical microbiology reviews. – 2003. – Vol. 16, №. 1. – P. 1-17.
47. Chanock S.J. How the germline informs the somatic landscape / S.J. Chanock. // Nature Genetics. – 2021. – Vol. 53, №. 11. – P. 1523-1525.
48. Chen H. Correlation between SNPs of PIK3CA, ERBB2 3' UTR, and their interactions with environmental factors and the risk of epithelial ovarian cancer / H. Chen, Z. Zhai, Q. Xie, et al. // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2021. – VoL. 38, №. 10. – P. 2631-2639.
49. Cheng J. Accurate proteome-wide missense variant effect prediction with AlphaMissense / J. Cheng, G. Novati, J. Pan, J., et al. // Science. – 2023. – Vol. 381, №. 6664. – P. eadg7492.
50. Chiarella P. Contribution of genetic polymorphisms in human health / P. Chiarella, P. Capone, R. Sisto. // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2023. – Vol. 20, №. 2. – P. 912.
51. Choi S. HPV and cervical cancer: a review of epidemiology and screening uptake in the UK / S. Choi, A. Ismail, G. Pappas-Gogos, et al. // Pathogens. – 2023. – Vol. 12, №. 2. – P. 298.
52. Chung T.K.H. Microsatellite instability, expression of hMSH2 and hMLH1 and HPV infection in cervical cancer and their clinico-pathological association / T.K.H. Chung, T.H. Cheung, V.W. Wang, et al. // Gynecologic and obstetric investigation. – 2001. – Vol. 52, №. 2. – P. 98-103.
53. Coelho A. TP53 Arg72Pro polymorphism is associated with increased overall survival but not response to therapy in Portuguese/ Caucasian patients with advanced cervical cancer / A. Coelho, A. Nogueira, S. Soares, et al. // Oncology letters. – 2018. – Vol. 15, №. 5. – P. 8165-8171.
54. Colombo N. Pembrolizumab for persistent, recurrent, or metastatic cervical cancer / N. Colombo, C. Dubot, D. Lorusso, et al. // New England Journal of Medicine. – 2021. – Vol. 385, №. 20. – P. 1856-1867.

55. Cybulski C. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer / C. Cybulski, D. Wokołrczyk, A. Jakubowska, et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2011. – Vol. 29, №. 28. – P. 3747-3752.
56. Ding D.C. Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia / D.C. Ding, M.H. Chiang, H.C. Lai, et al. // European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 2009. – Vol. 147, №. 2. – P. 215-220.
57. Eisenblätter R. Validation and functional follow-up of cervical cancer risk variants at the HLA locus / R. Eisenblätter, F. Seifert, P. Schürmann, P., et al. // HLA. – 2024. – Vol. 104, №. 2. – P. e15597.
58. El Awady M.K. Molecular analysis of integrated human papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa / M.K. El Awady, J.B. Kaplan, S.J. O'Brien, et al. // Virology. – 1987. – Vol. 159, №. 2. – P. 389-398.
59. Espinoza H. Genetic predisposition to persistent human papillomavirus-infection and virus-induced cancers / H. Espinoza, K.T. Ha, T.T. Pham, et al. // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9, №. 10. – P. 2092.
60. Estevam G.O. Conserved regulatory motifs in the juxtamembrane domain and kinase N-lobe revealed through deep mutational scanning of the MET receptor tyrosine kinase domain / G.O. Estevam, E.M. Linossi, C.B. Macdonald, et al. // Elife. – 2024. – Vol. 12. – P. RP91619.
61. Gakidou E. Coverage of cervical cancer screening in 57 countries: low average levels and large inequalities / E. Gakidou, S. Nordhagen, Z. Obermeyer. // PLoS medicine. – 2008. – Vol. 5, №. 6. – P. e132.
62. Gao H. The landscape of tolerated genetic variation in humans and primates / H. Gao, T. Hamp, J. Ede, et al. // Science. – 2023. – Vol. 380, №. 6648. – P. eabn8153.
63. Gao Y. The effect of HER2 single nucleotide polymorphisms on cervical cancer susceptibility and survival in a Chinese population / Y. Gao, X. Tang, J. Cao, et al. // Journal of Cancer. – 2019. – Vol. 10, №. 2. – P. 378.
64. Gimenes F. Human leukocyte antigen (HLA)-G and cervical cancer immunoediting: a candidate molecule for therapeutic intervention and prognostic biomarker? / F. Gimenes,

- J.J.V. Teixeira, A.L.P. de Abreu, A. L. P., et al. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer. – 2014. – Vol. 1846, №. 2. – P. 576-589.
65. González-Rodríguez J. C. Cervical cancer prevention by vaccination / J.C. González-Rodríguez, A. Cruz-Valdez, V. Madrid-Marina. // Frontiers in Oncology. – 2024. – Vol. 14. – P. 1386167.
66. Gray P. Lack of detectable HPV18 antibodies in 14% of quadrivalent vaccinees in a longitudinal cohort study / P. Gray, F.C. Mariz, C. Eklund, et al. // npj Vaccines. – 2024. – Vol. 9, №. 1. – P. 146.
67. Guo F. DNA mismatch repair system regulates the expression of PD-L1 through DNMTs in cervical cancer / F. Guo, R. Lu, W. Kong, et al. // Cancer Cell International. – 2024. – Vol. 24, №. 1. – P. 25.
68. Gupta M.K. Cytokine gene polymorphisms and their association with cervical cancer: A North Indian study / M.K. Gupta, R. Singh, M. Banerjee. // Egyptian Journal of Medical Human Genetics. – 2016. – Vol. 17, №. 2. – P. 155-163.
69. Guyard A. Morphologic and molecular study of lung cancers associated with idiopathic pulmonary fibrosis and other pulmonary fibroses / A. Guyard, C. Danel, N. Théou-Anton, et al. // Respiratory research. – 2017. – Vol. 18, №. 1. – P. 120.
70. Hajiesmaeil M. The effect of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on susceptibility to human papilloma virus infection and cervical cancer / M. Hajiesmaeil, F. Tafvizi, S. Sarmadi. // Infection, Genetics and Evolution. – 2016. – Vol. 46. – P. 1-6.
71. Hamerman J.A. The path ahead for understanding Toll-like receptor-driven systemic autoimmunity / J.A. Hamerman, G.M. Barton. // Current opinion in immunology. – 2024. – Vol. 91. – P. 102482.
72. Han F. The effect of CHEK2 variant I157T on cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis / F. Han, C. Guo, L. Liu. // DNA and cell biology. – 2013. – Vol. 32, №. 6. – P. 329-335.
73. Han J. Expression quantitative trait loci in long non-coding RNA PAX8-AS1 are associated with decreased risk of cervical cancer / J. Han, W. Zhou, M. Jia, et al. // Molecular Genetics and Genomics. – 2016. – Vol. 291, №. 4. – P. 1743-1748.

74. Hanahan D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg. // *Cell.* – 2011. – Vol. 144, №. 5. – P. 646-674.
75. Harper D.M. HPV vaccines—a review of the first decade / D.M. Harper, L.R. DeMars. // *Gynecologic oncology.* – 2017. – Vol. 146, №. 1. – P. 196-204.
76. Hou Y. CLPTM1L is a novel putative oncogene promoting tumorigenesis in oral squamous cell carcinoma / Y. Hou, F. Xue, Y. Fu, et al. // *Cell transplantation.* – 2021. – Vol. 30. – P. 09636897211045970.
77. Imam H. Association study of NAT2 gene polymorphism and risk of oral cancer in Southern Punjab, Pakistan / H. Imam, T. Imam, S.Z. Abbas, et al. // *J. Pak. Med. Assoc.* – 2021. – Vol. 71. – P. 1954-1958.
78. Irgit A. Structure and dynamics of the ABL1 tyrosine kinase and its important role in chronic myeloid leukemia / A. Irgit, R. Kamis, B. Sever, et al. // *Archiv der Pharmazie.* – 2025. – Vol. 358, №. 5. – P. e70005.
79. Isidori F. RASAL1 and ROS1 gene variants in hereditary breast cancer / F. Isidori, I. Bozzarelli, S. Ferrari, et al. // *Cancers.* – 2020. – Vol. 12, №. 9. – P. 2539.
80. Izarzugaza J.M.G. Characterization of pathogenic germline mutations in human Protein Kinases / J.M.G. Izarzugaza, L.E.M. Hopcroft, A. Baresic, et al. // *BMC bioinformatics.* – 2011. – Vol. 12. – P. 1-10.
81. Jaganathan K. Predicting splicing from primary sequence with deep learning / K. Jaganathan, S.K. Panagiotopoulou, J.F. McRae, et al. // *Cell.* – 2019. – Vol. 176, №. 3. – P. 535-548. e24.
82. Ji H. MRVI1 and NTRK3 are potential tumor suppressor genes commonly inactivated by DNA methylation in cervical cancer / H. Ji, K. Li, W. Jiang, et al. // *Frontiers in Oncology.* – 2022. – Vol. 11. – P. 802068.
83. Jo U.H. The genetic polymorphisms of HER-2 and the risk of lung cancer in a Korean population / U.H. Jo, S.G.L. Han, J.H. Seo, et al. // *BMC cancer.* – 2008. – Vol. 8, №. 1. – P. 359.
84. Kastan M.B. Cell-cycle checkpoints and cancer / M.B. Kastan, J. Bartek. // *Nature.* – 2004. – Vol. 432, №. 7015. – P. 316-323.

85. Kawamata Y. HPV 16-E6-mediated degradation of intrinsic p53 is compensated by upregulation of p53 gene expression in normal cervical keratinocytes / Y. Kawamata, A. Mitsuhashi, Y. Unno, et al. // International journal of oncology. – 2002. – Vol. 21, №. 3. – P. 561-567.
86. Kedhari Sundaram M. Quercetin modulates signaling pathways and induces apoptosis in cervical cancer cells / M. Kedhari Sundaram, R. Raina, N. Afroze, et al. // Bioscience reports. – 2019. – Vol. 39, №. 8. – P. BSR20190720.
87. Kermanshahi A.Z. HPV-driven cancers: a looming threat and the potential of CRISPR/Cas9 for targeted therapy / A.Z. Kermanshahi, F. Ebrahimi, A. Taherpoor, et al. // Virology Journal. – 2025. – Vol. 22, №. 1. – P. 156.
88. Khelifi R. Inter-ethnic differences in genetic polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes (CYP1A1, CYP2D6, NAT1 and NAT2) in healthy populations: correlation with the functional in silico prediction / R. Khelifi, G. Ben Salah, A. Chakroun, et al. // Molecular biology reports. – 2014. – Vol. 41, №. 9. – P. 5735-5743.
89. Khelifi R. Polymorphisms in the human cytochrome P450 and arylamine N-acetyltransferase: susceptibility to head and neck cancers / R. Khelifi, O. Messaoud, A. Rebai, et al. // BioMed research international. – 2013. – Vol. 2013, №. 1. – P. 582768.
90. Khokhlova S.V. Practical recommendations for drug treatment of cervical cancer. RUSSCO practical recommendations, part 1. / S.V. Khokhlova, O.A. Kravets, K.Y. Morkhov, et al. // Malignant tumors. – 2023. – Vol. 13. – P. 246-262.
91. Koel M. GWAS meta-analyses clarify the genetics of cervical phenotypes and inform risk stratification for cervical cancer / M. Koel, U. Võsa, M. Jõeloo, et al. // Human Molecular Genetics. – 2023. – Vol. 32, №. 12. – P. 2103-2116.
92. Kumpula T.A. Evaluating the role of CHEK2 (p.Asp438Tyr) allele in inherited breast cancer predisposition / T.A. Kumpula, S. Koivuluoma, L. Soikkonen, et al. // Familial Cancer. – 2023. – Vol. 22, №. 3. – P. 291-294.
93. Lacey C.J.N. HPV vaccination in HIV infection / C.J.N. Lacey. // Papillomavirus research. – 2019. – Vol. 8. – P. 100174.

94. Li H. CLPTM1L induces estrogen receptor  $\beta$  signaling-mediated radioresistance in non-small cell lung cancer cells / H. Li, J. Che, M. Jiang, et al. // Cell Communication and Signaling. – 2020. – Vol. 18, №. 1. – P. 152.
95. Li S. Association between GSDMB gene polymorphism and cervical cancer in the northeast Chinese Han population / S. Li, X. Li, S. Zhang, et al. // Frontiers in Genetics. – 2022. – Vol. 13. – P. 860727.
96. Li T. Global status and attributable risk factors of breast, cervical, ovarian, and uterine cancers from 1990 to 2021 / T. Li, H. Zhang, M. Lian, et al. // Journal of Hematology & Oncology. – 2025. – Vol. 18, №. 1. – P. 5.
97. Li X. A multi-variable predictive warning model for cervical cancer using clinical and SNPs data / X. Li, R. Ning, B. Xiao, et al. // Frontiers in Medicine. – 2024. – Vol. 11. – P. 1294230.
98. Li Z. Global landscape of cervical cancer incidence and mortality in 2022 and predictions to 2030: The urgent need to address inequalities in cervical cancer / Z. Li, P. Liu, A. Yin, et al. // International Journal of Cancer. – 2025. – Vol. 157, №. 2. – P. 288-297.
99. Lien A.C. The past, present, and future of cervical cancer vaccines / A.C. Lien, G.S. Johnson, T. Guan, et al. // Vaccines. – 2025. – Vol. 13, №. 2. – P. 201.
100. Lindroth Y. Cervix cytology samples revealed increased methylation of the human markers FAM19A4/miR124-2 up to 8 years before adenocarcinoma / Y. Lindroth, L. Pedersen, J. Alssamaray, et al. // Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica. – 2024. – Vol. 103, №. 2. – P. 378-386.
101. Liu H. Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2 is negatively regulated by the p53-responsive microRNA-3184-5p in cervical cancer cells / H. Liu, Y. Li, J. Zhang, et al. // Oncology reports. – 2021. – Vol. 45, №. 1. – P. 95-106.
102. Liu J. Genomic landscape, immune characteristics and prognostic mutation signature of cervical cancer in China / J. Liu, Z. Li, T. Lu, et al. // BMC medical genomics. – 2022. – Vol. 15, №. 1. – P. 231.
103. Liu J. The Association between Five Genetic Variants in MicroRNAs (rs2910164, rs11614913, rs3746444, rs11134527, and rs531564) and Cervical Cancer Risk: A

Meta-Analysis / J. Liu, P. Dong, L. Zhou, et al. // BioMed research international. – 2021. – Vol. 2021, №. 1. – P. 9180874.

104. Liu S. Functional consequence of the MET-T1010I polymorphism in breast cancer / S. Liu, F. Meric-Bernstam, N. Parinyanitikul, et al. // Oncotarget. – 2014. – Vol. 6, №. 5. – P. 2604.
105. Loaeza-Loaeza J. The CpG island methylator phenotype increases the risk of high-grade squamous intraepithelial lesions and cervical cancer / J. Loaeza-Loaeza, B. Illades-Aguiar, O. del Moral-Hernández, et al. // Clinical Epigenetics. – 2022. – Vol. 14, №. 1. – P. 4.
106. Loopik D.L. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia grades 1, 2, and 3: a systematic review and meta-analysis / D.L. Loopik, H.A. Bentley, M.N. Eijgenraam, et al. // Journal of lower genital tract disease. – 2021. – Vol. 25, №. 3. – P. 221-231.
107. López-Urrutia E. PAX8 is transcribed aberrantly in cervical tumors and derived cell lines due to complex gene rearrangements / E. López-Urrutia, A. Pedroza-Torres, J. Fernandez-Retana, et al. // International journal of oncology. – 2016. – Vol. 49, №. 1. – P. 371-380.
108. Lourenço de Freitas N. Histone deacetylase inhibitors as therapeutic interventions on cervical cancer induced by human papillomavirus / N. Lourenço de Freitas, M.G. Deberaldini, D. Gomes, et al. // Frontiers in cell and developmental biology. – 2021. – Vol. 8. – P. 592868.
109. Luchini C. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach / C. Luchini, F. Bibeau, M.J.L. Ligtenberg, et al. // Annals of Oncology. – 2019. – Vol. 30, №. 8. – P. 1232-1243.
110. Lugo-Salazar D. Conventional cytology scheme: adherence and associated factors / D. Lugo-Salazar, L. López-López, C. Bernal-Lopera, et al. // Public Health. – 2024. – Vol. 236. – P. 459-465.
111. Lutkowska A. Analysis of rs8067378 polymorphism in the risk of uterine cervical cancer from a polish population and its impact on gasdermin B expression / A. Lutkowska, A. Roszak, M. Lianeri, et al. // Molecular Diagnosis & Therapy. – 2017. – Vol. 21, №. 2. – P. 199-207.

112. Lv N. Development of a sensitive droplet digital PCR according to the HPV infection specificity in Chinese population / N. Lv, Y. Zhao, Y. Song, et al. // BMC cancer. – 2023. – Vol. 23, №. 1. – P. 1022.
113. Ma D. Expression of CDC42 in cervical squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic characteristics / D. Ma, Y. Cheng, Y. Zhang, et al. // Chinese Journal of Cancer Research. – 2013. – Vol. 25, №. 6. – P. 656.
114. Ma P.C. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions / P.C. Ma, T. Kijima, G. Maulik, et al. // Cancer research. – 2003. – Vol. 63, №. 19. – P. 6272-6281.
115. Madden K. HLA testing in the molecular diagnostic laboratory / K. Madden, D. Chabot-Richards. // Virchows Archiv. – 2019. – Vol. 474, №. 2. – P. 139-147.
116. Martínez-Castillo M.A. RET could act as suppressor tumor gene in cervical cancer cells / M.A. Martínez-Castillo, M.A. Hernández-Cueto, K. Taniguchi-Ponciano, et al. // Gaceta médica de México. – 2025. – Vol. 161, №. 2. – P. 138-145.
117. Masters J.R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly / J.R. Masters. // Nature Reviews Cancer. – 2002. – Vol. 2, №. 4. – P. 315-319.
118. Medina-Sanson A. Genotype-environment interaction analysis of NQO1, CYP2E1, and NAT2 polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Mexican interinstitutional group for the identification of the causes of childhood leukemia / A. Medina-Sanson, J.C. Núñez-Enríquez, E. Hurtado-Cordova, et al. // Frontiers in Oncology. – 2020. – Vol. 10. – P. 571869.
119. Mo H.N. Targeting MET in cancer therapy / H.N. Mo, P. Liu. // Chronic diseases and translational medicine. – 2017. – Vol. 3, №. 03. – P. 148-153.
120. Muñoz-Bello J.O. Epidemiology and molecular biology of HPV variants in cervical cancer: the state of the art in Mexico / J.O. Muñoz-Bello, A. Carrillo-García, M. Lizano. // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23, №. 15. – P. 8566.
121. Muthusami S. A review on the role of epidermal growth factor signaling in the development, progression and treatment of cervical cancer / S. Muthusami, R. Sabanayagam, L. Periyasamy, et al. // International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. – Vol. 194. – P. 179-187.

122. Neklason D.W. Activating mutation in MET oncogene in familial colorectal cancer / D.W. Neklason, M.W. Done, N.R. Sargent, et al. // BMC cancer. – 2011. – Vol. 11, №. 1. – P. 424.
123. Nilyanimit P. Comparable detection of HPV using real-time PCR in paired cervical samples and concentrated first-stream urine collected with Colli-Pee device / P. Nilyanimit, S. Chaithongwongwatthana, S. Oranratanaphan, et al. // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2024. – Vol. 108, №. 3. – P. 116160.
124. Ojesina A.I. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas / A.I. Ojesina, L. Lichtenstein, S.S. Freeman, et al. // Nature. – 2014. – Vol. 506, №. 7488. – P. 371-375.
125. Okunade K.S. Human papillomavirus and cervical cancer / K.S. Okunade. // Journal of Obstetrics and Gynaecology. – 2020. – Vol. 40, №. 5. – P. 602-608.
126. Okuyama N.C.M. CXCL12/CXCR4 axis gene variants contribute to an increased vulnerability to HPV infection and cervical oncogenesis / N.C.M. Okuyama, F. Cezar-Dos-Santos, K.P. Trugilo, et al. // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. – 2022. – Vol. 148, №. 4. – P. 793-802.
127. Oliushina E.M. Predictive markers of immunotherapy in cervical cancer / E.M. Oliushina, L.E. Zavalishina, Y.Y. Andreeva, et al. // Arkhiv Patologii. – 2023. – Vol. 85, №. 5. – P. 5-12.
128. Ørsted D.D. Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population / D.D. Ørsted, S.E. Bojesen, A. Tybjærg-Hansen, et al. // The Journal of experimental medicine. – 2007. – Vol. 204, №. 6. – P. 1295-1301.
129. Ouh Y.T. Enhancing cervical cancer screening: review of p16/Ki-67 dual staining as a promising triage strategy / Y.T. Ouh, H.Y. Kim, K.W. Yi, et al. // Diagnostics. – 2024. – Vol. 14, №. 4. – P. 451.
130. Pal A. Human papillomavirus E6 and E7: the cervical cancer hallmarks and targets for therapy /A. Pal, R. Kundu. // Frontiers in microbiology. – 2020. – Vol. 10. – P. 3116.
131. Pan B. Activation of AMPK inhibits cervical cancer growth by hyperacetylation of H3K9 through PCAF / B. Pan, C. Liu, J. Su, et al. // Cell Communication and Signaling. – 2024. – Vol. 22, №. 1. – P. 306.

132. Pan S. Clinicopathological features and survival of adolescent and young adults with cervical cancer / S. Pan, W. Jiang, S. Xie, et al. // *Cancer Control.* – 2021. – Vol. 28. – P. 10732748211051558.
133. Pandey N.O. Association of TLR4 and TLR9 polymorphisms and haplotypes with cervical cancer susceptibility / N.O. Pandey, A.V. Chauhan, N.S. Raithatha, et al. // *Scientific Reports.* – 2019. – Vol. 9, №. 1. – P. 9729.
134. Pangarkar M.A. The Bethesda System for reporting cervical cytology / M.A. Pangarkar. // *Cytojournal.* – 2022. – Vol. 19. – P. 28.
135. Parashar D. Targeted biologic inhibition of both tumor cell-intrinsic and intercellular CLPTM1L/CRR9-mediated chemotherapeutic drug resistance / D. Parashar, A. Geethadevi, D. McAllister, et al. // *NPJ Precision Oncology.* – 2021. – Vol. 5, №. 1. – P. 16.
136. Penkert J. Breast cancer patients suggestive of Li-Fraumeni syndrome: mutational spectrum, candidate genes, and unexplained heredity / J. Penkert, G. Schmidt, W. Hofmann, et al. // *Breast Cancer Research.* – 2018. – Vol. 20, №. 1. – P. 87.
137. Petersen Z. Barriers to uptake of cervical cancer screening services in low-and-middle-income countries: a systematic review / Z. Petersen, A. Jaca, T.G. Ginindza, et al. // *BMC women's health.* – 2022. – Vol. 22, №. 1. – P. 486.
138. Poulikakos P.I. Molecular pathways and mechanisms of BRAF in cancer therapy / P.I. Poulikakos, R.J. Sullivan, R. Yaeger. // *Clinical Cancer Research.* – 2022. – Vol. 28, №. 21. – P. 4618-4628.
139. Qi X.P. RET germline mutations identified by exome sequencing in a Chinese multiple endocrine neoplasia type 2A/familial medullary thyroid carcinoma family / X.P. Qi, J.M. Ma, Z.F. Du, et al. // *PloS one.* – 2011. – Vol. 6, №. 5. – P. e20353.
140. Qiu L. Characterization of the genomic landscape in cervical cancer by next generation sequencing / L. Qiu, H. Feng, H. Yu, et al. // *Genes.* – 2022. – Vol. 13, №. 2. – P. 287.
141. Rajaram S. Screening for cervical cancer: Choices & dilemmas / S. Rajaram, B. Gupta. // *Indian Journal of Medical Research.* – 2021. – Vol. 154, №. 2. – P. 210-220.
142. Ramachandran D. Association of genomic variants at PAX8 and PBX2 with cervical cancer risk / D. Ramachandran, Y. Wang, P. Schürmann, et al. // *International Journal of Cancer.* – 2021. – Vol. 149, №. 4. – P. 893-900.

143. Ramachandran D. Genomic risk factors for cervical cancer / D. Ramachandran, T. Dörk. // Cancers. – 2021. – Vol. 13, №. 20. – P. 5137.
144. Rashkin S.R. Pan-cancer study detects genetic risk variants and shared genetic basis in two large cohorts / S.R. Rashkin, R.E. Graff, L. Kachuri, et al. // Nature communications. – 2020. – Vol. 11, №. 1. – P. 4423.
145. Regua A.T. RET signaling pathway and RET inhibitors in human cancer / A.T. Regua, M. Najjar, H.W. Lo. // Frontiers in oncology. – 2022. – Vol. 12. – P. 932353.
146. Rhiem K. Increased risk of cervical cancer in high-risk families with and without mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes / K. Rhiem, C. Fischer, K. Bosse, et al. // Journal of clinical oncology. – 2007. – Vol. 25, №. 18 \_suppl. – P. 5588-5588.
147. Richards S. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology / S. Richards, N. Aziz, S. Bale, et al. // Genetics in medicine. – 2015. – Vol. 17, №. 5. – P. 405-423.
148. Rodrigues C.H.M. DynaMut2: Assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations / C.H.M. Rodrigues, D.E.V. Pires, D.B. Ascher. // Protein Science. – 2021. – Vol. 30, №. 1. – P. 60-69.
149. Ruiz-Lafuente N. The roles of Cdc42 and Rac1 in the formation of plasma membrane protrusions in cancer epithelial HeLa cells / N. Ruiz-Lafuente, A. Minguela, M. Muro, et al. // Molecular Biology Reports. – 2021. – Vol. 48, №. 5. – P. 4285-4294.
150. Saipova H. M. Breast cancer and hereditary tumor syndromes: a modern paradigm [Электронный] / H. M. Saipova // Ethiopian International Journal of Multidisciplinary Research. — 2024. — Vol. 11, № 05. — P. 455–458. — Режим доступа: <https://www.eijmr.org/index.php/eijmr/article/view/1566> (дата обращения: 23.03.2025)
151. Salta S. DNA methylation as a triage marker for colposcopy referral in HPV-based cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis / S. Salta, J. Lobo, B. Magalhães, et al. // Clinical epigenetics. – 2023. – TVol. 15, №. 1. – P. 125.
152. Schiffman M. Human papillomavirus and cervical cancer / M. Schiffman, P.E. Castle, J. Jeronimo, et al. // The lancet. – 2007. – Vol. 370, №. 9590. – P. 890-907.

153. Seppälä E.H. CHEK2 variants associate with hereditary prostate cancer / E.H. Seppälä, T. Ikonen, N. Mononen, et al. // British journal of cancer. – 2003. – Vol. 89, №. 10. – P. 1966-1970.
154. Sequist L.V. Response to treatment and survival of patients with non-small cell lung cancer undergoing somatic EGFR mutation testing / L.V. Sequist, V.A. Joshi, P.A. Jänne, et al. // The oncologist. – 2007. – Vol. 12, №. 1. – P. 90-98.
155. Shiloh Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage / Y. Shiloh. // Current opinion in genetics & development. – 2001. – Vol. 11, №. 1. – P. 71-77.
156. Simba H. Systematic review of genetic factors in the etiology of esophageal squamous cell carcinoma in African populations / H. Simba, H. Kuivaniemi, V. Lutje, et al. // Frontiers in Genetics. – 2019. – Vol. 10. – P. 642.
157. Singh D. Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative / D. Singh, J. Vignat, V. Lorenzoni, et al. // The Lancet Global Health. – 2023. – Vol. 11, №. 2. – P. e197-e206.
158. Singh P. Association between promoter methylation and gene expression of CGB3 and NOP56 in HPV-infected cervical cancer cells / P. Singh, K. Chalertpet, J. Sukhathee, et al. // Biomedical Reports. – 2022. – Vol. 16, №. 1. – P. 1.
159. Sio Y.Y. The ERBB2 exonic variant Pro1170Ala modulates mitogen-activated protein kinase signaling cascades and associates with allergic asthma / Y.Y. Sio, W.L. Gan, W.S. Ng, et al. // International Archives of Allergy and Immunology. – 2023. – Vol. 184, №. 10. – P. 1010-1021.
160. Song Y. Hydralazine inhibits human cervical cancer cell growth in vitro in association with APC demethylation and re-expression / Y. Song, C. Zhang. // Cancer chemotherapy and pharmacology. – 2009. – Vol. 63, №. 4. – P. 605-613.
161. Sousa H. Is there a biological plausability for p53 codon 72 polymorphism influence on cervical cancer development? / H. Sousa, A.M. Santos, D. Pinto, et al. // Acta Medica Portuguesa. – 2011. – Vol. 24, №. 1. – P. 127-134.

162. Sriharikrishnaa S. A comprehensive review on the functional role of miRNA clusters in cervical cancer / S. Sriharikrishnaa, F.E. John, M. Bairy, et al. // Epigenomics. – 2024. – Vol. 16, №. 7. – P. 493-511.
163. Srinivasan G. Cervical cancer: novel treatment strategies offer renewed optimism / G. Srinivasan, Y. Gangotri, Y. Ashish. // Pathology-Research and Practice. – 2024. – Vol. 254. – P. 155136.
164. Srinivasan P. The context-specific role of germline pathogenicity in tumorigenesis / P. Srinivasan, C. Bandlamudi, P. Jonsson, et al. // Nature genetics. – 2021. – Vol. 53, №. 11. – P. 1577-1585.
165. Stanton S.E. Pro1170 Ala polymorphism in HER2-neu is associated with risk of trastuzumab cardiotoxicity / S.E. Stanton, M.M. Ward, P. Christos, et al. // BMC cancer. – 2015. – Vol. 15, №. 1. – P. 267.
166. Stolarova L. CHEK2 germline variants in cancer predisposition: stalemate rather than checkmate / L. Stolarova, P. Kleiblova, M. Janatova, et al. // Cells. – 2020. – Vol. 9, №. 12. – P. 2675.
167. Storey A. Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer / A. Storey, M. Thomas, A. Kalita, et al. // Nature. – 1998. – Vol. 393, №. 6682. – P. 229-234.
168. Sun Q. Expression of GSDML associates with tumor progression in uterine cervix cancer / Q. Sun, J. Yang, G. Xing, et al. // Translational oncology. – 2008. – Vol. 1, №. 2. – P. 73-IN1.
169. Sun Y. An overview of agents and treatments for PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors / Y. Sun, L. Yue, P. Xu, et al. // Frontiers in Oncology. – 2022. – Vol. 12. – P. 927587.
170. Szabo C. The breast cancer information core: database design, structure, and scope / C. Szabo, A. Masiello, J.F. Ryan, et al. // Human mutation. – 2000. – Vol. 16, №. 2. – P. 123-131.
171. Szarewski A. Cervical screening in adolescents—at least do no harm / A. Szarewski, P. Sasieni. // The Lancet. – 2004. – Vol. 364, №. 9446. – P. 1642-1644.

172. Tan S.C. FAS c.-671A> G polymorphism and cervical cancer risk: a case–control study and meta-analysis / S.C. Tan, M.P. Ismail, D.R. Duski, et al. // Cancer genetics. – 2017. – Vol. 211. – P. 18-25.
173. Tanaka H. Adherens junctions associated protein 1 serves as a predictor of recurrence of squamous cell carcinoma of the esophagus / H. Tanaka, M. Kanda, M. Koike, et al. // International Journal of Oncology. – 2015. – Vol. 47, №. 5. – P. 1811-1818.
174. The role of ALK gene and PI3k/Akt/NF-κ B signaling pathway in precancerous lesions of cervical cancer / D. Qi, Y. Sun, W. Ai [et al.] // Journal of Obstetrics and Gynaecology. — 2024. — Vol. 44, № 1. — P. 123–129. — DOI: 10.1080/01443615.2024.2345678.
175. Tjin E.P.M. Functional analysis of HGF/MET signaling and aberrant HGF-activator expression in diffuse large B-cell lymphoma / E.P.M. Tjin, R.W.J. Groen, I. Vogelzang, et al. // Blood. – 2006. – Vol. 107, №. 2. – P. 760-768.
176. Torrezan G.T. Complex landscape of germline variants in Brazilian patients with hereditary and early onset breast cancer / G.T. Torrezan, F.G.S.R. de Almeida, M.C.P. Figueiredo, et al. // Frontiers in genetics. – 2018. – Vol. 9. – P. 161.
177. Tyner J.W. MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity / J.W. Tyner, L.B. Fletcher, E.Q. Wang, et al. // Cancer research. – 2010. – Vol. 70, №. 15. – P. 6233-6237.
178. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025 [Электронный] / The UniProt Consortium // Nucleic Acids Research. — 2024. — Режим доступа: DOI: 10.1093/nar/gkae1010 (дата обращения: 20.03.2025).
179. Varadi M. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences / M. Varadi, D. Bertoni, P. Magana, et al. // Nucleic acids research. – 2024. – Vol. 52, №. D1. – P. D368-D375.
180. Vázquez-Ibarra K.C. The ERBB2 gene polymorphisms rs2643194, rs2934971, and rs1058808 are associated with increased risk of gastric cancer / K.C. Vázquez-Ibarra, A.R. Bustos-Carpinteyro, A. García-Ruvalcaba, et al. // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2019. – Vol. 52, №. 5. – P. e8379.
181. Vu M. Cervical cancer worldwide / M. Vu, J. Yu, O.A. Awolude, et al. // Current problems in cancer. – 2018. – Vol. 42, №. 5. – P. 457-465.

182. Wang D. Bioinformatics analysis illustrates the functions of miR-377-5p in cervical cancer / D. Wang, Y. Zhang, D. Ren, et al. // Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. – 2024. – Vol. 40, №. 4. – P. 4238-4249.
183. Wang M. Global cervical cancer incidence by histological subtype and implications for screening methods / M. Wang, K. Huang, M.C.S. Wong, et al. // Journal of Epidemiology and Global Health. – 2024. – Vol. 14, №. 1. – P. 94-101.
184. Wang R. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge / R. Wang, W. Pan, L. Jin, et al. // Cancer letters. – 2020. – Vol. 471. – P. 88-102.
185. Wang Z. Effects of methylenetetrahydrofolate reductase single-nucleotide polymorphisms on breast, cervical, ovarian, and endometrial cancer susceptibilities / Z. Wang, K. Li, L. Ouyang, et al. // Chronic Diseases and Translational Medicine. – 2021. – Vol. 7, №. 3. – P. 169-181.
186. Waterhouse A. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes / A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, et al. // Nucleic acids research. – 2018. – Vol. 46, №. W1. – P. W296-W303.
187. Wen H. Prevalence and landscape of pathogenic or likely pathogenic germline variants and their association with somatic phenotype in unselected Chinese patients with gynecologic cancers / H. Wen, Q. Xu, X. Sheng, et al. // JAMA Network Open. – 2023. – Vol. 6, №. 7. – P. e2326437-e2326437.
188. Wentzensen N. Methylation of HPV18, HPV31, and HPV45 genomes and cervical intraepithelial neoplasia grade 3 / N. Wentzensen, C. Sun, A. Ghosh, et al. // Journal of the National Cancer Institute. – 2012. – Vol. 104, №. 22. – P. 1738-1749.
189. Winer R.L. Strategies to increase cervical cancer screening with mailed human papillomavirus self-sampling kits: a randomized clinical trial / R.L. Winer, J. Lin, M.L. Anderson, et al. // Jama. – 2023. – Vol. 330, №. 20. – P. 1971-1981.
190. Wong Y.F. The role of microsatellite instability in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the cervix / Y.F. Wong, T.H. Cheung, K.Y. Poon, et al. // Gynecologic oncology. – 2003. – Vol. 89, №. 3. – P. 434-439.

191. Wright A.A. Oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix / A.A. Wright, B.E. Howitt, A.P. Myers, et al. // Cancer. – 2013. – Vol. 119, №. 21. – P. 3776-3783.
192. Xie W. (Nano) biotechnological approaches in the treatment of cervical cancer: integration of engineering and biology / W. Xie, Z. Xu. // Frontiers in Immunology. – 2024. – Vol. 15. – P. 1461894.
193. Xin D.J. Single nucleotide polymorphisms of HER2 related to osteosarcoma susceptibility / D.J. Xin, G.D. Shen, J. Song. // International Journal of Clinical and Experimental Pathology. – 2015. – Vol. 8, №. 8. – P. 9494.
194. Xu M. Advances in cervical cancer: current insights and future directions / M. Xu, C. Cao, P. Wu, et al. // Cancer Communications. – 2025. – Vol. 45, №. 2. – P. 77-109.
195. Xu Y. Identification of potential driver genes based on multi-genomic data in cervical cancer / Y. Xu, H. Luo, Q. Hu, et al. // Frontiers in genetics. – 2021. – Vol. 12. – P. 598304.
196. Yaeger R. Response to anti-EGFR therapy in patients with BRAF non-V600-mutant metastatic colorectal cancer / R. Yaeger, D. Kotani, S. Mondaca, et al. // Clinical Cancer Research. – 2019. – Vol. 25, №. 23. – P. 7089-7097.
197. Yang X. Histone acetyltransferase CSRP2BP promotes the epithelial–mesenchymal transition and metastasis of cervical cancer cells by activating N-cadherin / X. Yang, F. Sun, Y. Gao, et al. // Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2023. – Vol. 42, №. 1. – P. 268.
198. Yang X. The role of TLRs in cervical cancer with HPV infection: a review / X. Yang, Y. Cheng, C. Li. // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2017. – Vol. 2, №. 1. – P. 1-10.
199. Yang Z. The synergy of germline C634Y and V292M RET mutations in a northern Chinese family with multiple endocrine neoplasia type 2A / Z. Yang, X. Qi, N. Gross, et al. // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2020. – Vol. 24, №. 22. – P. 13163-13170.

200. Ye H. Cdc42 expression in cervical cancer and its effects on cervical tumor invasion and migration / H. Ye, Y. Zhang, L. Geng, et al. // International journal of oncology. – 2014. – Vol. 46, №. 2. – P. 757-763.
201. Yi K. The association between MTHFR polymorphisms and cervical cancer risk: a system review and meta analysis / K. Yi, L.Y. Yang, Z. Lan, et al. // Archives of gynecology and obstetrics. – 2016. – Vol. 294, №. 3. – P. 579-588.
202. Yuan Y. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer / Y. Yuan, X. Cai, F. Shen, et al. // Cancer Letters. – 2021. – Vol. 497. – P. 243-254.
203. Zhang Q. The tumorigenic function of LINC00858 in cancer / Q. Zhang, C. Zhong, S. Duan. // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2021. – Vol. 143. – P. 112235.
204. Zhang T. Rare germline mutation and MSH2-&MSH6+ expression in a double primary carcinoma of colorectal carcinoma and endometrial carcinoma: a case report / T. Zhang, X. Huang, W. Liu, et al. // Diagnostic Pathology. – 2024. – Vol. 19, №. 1. – P. 25.
205. Zhang X. The HLA-DQB1 gene polymorphisms associated with cervical cancer risk: A meta-analysis / X. Zhang, Z. Lv, H. Yu, et al. // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2015. – Vol. 73. – P. 58-64.
206. Zheng J. Non-coding RNAs-EZH2 regulatory mechanisms in cervical cancer: The current state of knowledge / J. Zheng, L. Chen. // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2022. – Vol. 146. – P. 112123.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица 31 - Результаты анализа равновесия Харди-Вайнберга

Ген	Вариант	Генотип	Тест Харди-Вайнберга для пациенток с РШМ				Тест Харди-Вайнберга для здоровых лиц			
			N=111	HWE	$\chi^2$	p	N=384	HWE	$\chi^2$	p
<i>CLTP1L</i>	rs27069	GG	0,486	0,494	0,1	0,75	0,401	0,396	0,1	0,76
		AG	0,432	0,418			0,456	0,467		
		AA	0,081	0,088			0,143	0,138		
			N=111	HWE	$\chi^2$	p	N=378	HWE	$\chi^2$	p
<i>PAX8</i>	rs10175462	GG	0,360	0,364	0	0,94	0,310	0,310	0	1
		AG	0,486	0,479			0,495	0,494		
		AA	0,153	0,157			0,196	0,196		
			N=111	HWE	$\chi^2$	p	N=384	HWE	$\chi^2$	p
<i>CDC42</i>	rs2268177	TT	0,162	0,140	0,41	0,52	0,058	0,055	0,04	0,84
		AT	0,423	0,468			0,354	0,359		
		AA	0,414	0,392			0,588	0,585		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=51	HWE	$\chi^2$	p
<i>TP53</i>	rs1042522	CC	0,130	0,130	0	1	0,137	0,139	0	1
		CG	0,463	0,461			0,471	0,468		
		GG	0,407	0,408			0,392	0,394		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=51	HWE	$\chi^2$	p
<i>CHEK2</i>	rs17879961	AA	0,972	0,972	0	1	0,941	0,942	0	1
		AG	0,028	0,027			0,059	0,057		
		GG	0	0			0			
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=384	HWE	$\chi^2$	p
<i>CHEK2</i>	rs1060502712	CC	0	0	0	1	0	0	0	1
		CG	0,009	0,009			0	0		
		GG	0,991	0,991			1	1		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=384	HWE	$\chi^2$	p
<i>MET</i>	rs34589476	TT	0	0	0	1	0	0	0	1
		TC	0,028	0,027			0	0		
		CC	0,972	0,972			1	1		

			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>ERBB2</i>	rs1058808	CC	0,093	0,080	0,16	0,69	0,115	0,141	0,74	0,39
		CG	0,380	0,405			0,521	0,469		
		GG	0,528	0,515			0,365	0,391		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>NAT2</i>	rs1208	AA	0,380	0,408	0,81	0,37	0,406	0,346	2,94	0,09
		AG	0,519	0,461			0,365	0,484		
		GG	0,102	0,130			0,229	0,169		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>NAT2</i>	rs1801280	TT	0,361	0,396	1,4	0,24	0,396	0,340	2,45	0,12
		TC	0,537	0,466			0,375	0,486		
		CC	0,102	0,137			0,229	0,174		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=51	HWE	$\chi^2$	p
<i>MTHFR</i>	rs1801133	TT	0,065	0,082	0,46	0,5	0,039	0,081	1,09	0,3
		TC	0,444	0,409			0,490	0,407		
		CC	0,491	0,508			0,471	0,512		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=51	HWE	$\chi^2$	p
<i>MTHFR</i>	rs1801131	CC	0,102	0,105	0,01	0,94	0,098	0,081	0,23	0,63
		AC	0,444	0,438			0,373	0,407		
		AA	0,454	0,457			0,529	0,512		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>ERBB2</i>	rs1136201	AA	0,620	0,605	0,49	0,49	0,521	0,509	0,12	0,73
		AG	0,315	0,346			0,385	0,409		
		GG	0,065	0,049			0,094	0,082		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>KIT</i>	rs3822214	CC	0	0,002	0	1	0	0,002	0	1
		AC	0,083	0,008			0,083	0,008		
		AA	0,917	0,918			0,917	0,918		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>RET</i>	rs1799939	AA	0,009	0,025	1,17	0,28	0,042	0,018	1,09	0,3
		AG	0,296	0,265			0,188	0,234		
		GG	0,694	0,710			0,711	0,748		

			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>BRCA2</i>	rs144848	CC	0,046	0,047	0	1	0,042	0,05	0,18	0,67
		CA	0,343	0,340			0,365	0,348		
		AA	0,611	0,612			0,594	0,602		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>BRCA2</i>	rs4987117	TT	0	0,002	0	1	0,010	0,002	1,29	0,26
		CT	0,083	0,080			0,063	0,080		
		CC	0,917	0,918			0,927	0,918		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>BRCA1</i>	rs1799950	CC	0	0,001	0	1	0	0,004	0,04	0,84
		CT	0,074	0,071			0,125	0,117		
		TT	0,926	0,927			0,875	0,879		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>BRCA1</i>	rs1799967	TT	0,009	0,002	1,23	0,27	0,010	0,005	1,04	0,31
		CT	0,074	0,088			0,115	0,126		
		CC	0,917	0,910			0,875	0,869		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>ABL1</i>	rs2229070	GG	0	0,008	1,12	0,29	0	0,008	1,13	0,29
		CG	0,176	0,160			0,117	0,161		
		CC	0,824	0,832			0,823	0,831		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>EGFR</i>	rs1140475	TT	0,009	0,009	0	1	0,010	0,010	0	1
		TC	0,176	0,176			0,177	0,178		
		CC	0,815	0,815			0,813	0,812		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>ROS1</i>	rs619203	CC	0,111	0,127	0,28	0,6	0,063	0,076	0,2	0,66
		CG	0,491	0,459			0,427	0,400		
		GG	0,398	0,414			0,510	0,524		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>ROS1</i>	rs529156		0,111	0,127	0,28	0,6	0,063	0,076	0,2	0,66
			0,491	0,459			0,427	0,400		
			0,398	0,414			0,510	0,524		

			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>ROSI</i>	rs529038		0,111	0,127	0,28	0,6	0,063	0,076	0,2	0,66
			0,491	0,459			0,427	0,400		
			0,398	0,414			0,510	0,524		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>MET</i>	rs56391007	TT	0	0	0	1	0	0,001	0	1
		CT	0,028	0,027			0,073	0,070		
		CC	0,972	0,972			0,927	0,928		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>F5</i>	rs6030	CC	0,176	0,148	0,74	0,39	0,156	0,122	1,04	0,31
		CT	0,417	0,473			0,385	0,454		
		TT	0,407	0,379			0,458	0,424		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>F5</i>	rs4524	CC	0,102	0,082	0,43	0,51	0,125	0,076	2,76	0,1
		CT	0,370	0,409			0,302	0,400		
		TT	0,528	0,508			0,573	0,524		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>F5</i>	rs1046712	TT	0,028	0,021	0,28	0,69	0,010	0,021	0,42	0,52
		TG	0,231	0,246			0,260	0,246		
		GG	0,741	0,734			0,729	0,739		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>OPRM1</i>	rs1799971	AA	0,028	0,017	0,29	0,59	0,031	0,033	0	1
		AG	0,204	0,226			0,302	0,298		
		GG	0,769	0,758			0,667	0,669		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>SLO1D1</i>	rs4149056	CC	0,065	0,038	1,46	0,23	0,094	0,065	1,05	0,31
		CT	0,259	0,313			0,323	0,380		
		TT	0,676	0,649			0,583	0,555		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>CYP2B6</i>	rs8192709	CC	0	0,005	1,04	0,31	0	0,002	0	1
		CT	0,139	0,129			0,083	0,129		
		TT	0,861	0,866			0,917	0,918		

			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>F5</i>	rs6025	TT	0	0	0	1	0	0	0	1
		CT	0,037	0,036			0	0		
		CC	0,963	0,963			1	1		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>F5</i>	rs9332607	AA	0,093	0,096	0,01	0,94	0,072	0,105	1,03	0,31
		GA	0,435	0,428			0,505	0,439		
		GG	0,472	0,476			0,423	0,456		
			N=108	HWE	$\chi^2$	p	N=96	HWE	$\chi^2$	p
<i>F5</i>	rs6035	TT	0,907	0,910	0	1	0,873	0,877	0,04	0,85
		CT	0,093	0,088			0,127	0,119		
		CC	0	0			0	0		

Таблица 32 – Результаты сравнительного анализа частот аллелей замен онкогенов в группе здоровых индивидов и группе пациенток с РШМ при поиске ассоциаций с риском развития РШМ

Полиморфный локус	Ал.	MAF (Контроль)	MAF (Опыт)	P	$\chi^2$	ОШ	ДИ 95%
<b><i>ERBB2</i> p.Pro1170Ala rs1058808</b>	G	0,625	0,718	0,046	3,97	1,52	1,01-2,31
<b><i>ERBB2</i> p.p.Ile655Val rs1136201</b>	G	0,286	0,222	0,14	2,22	0,71	0,45-1,11
<b><i>KIT</i> p.Met541Leu rs3822214 (с использованием поправки Холдейна–Энскомба)</b>	C	0,042	0,042	1	0	1,0	0,38-2,65
<b><i>RET</i> p.Gly691Ser rs1799939</b>	A	0,135	0,157	0,53	0,39	0,19	0,69-2,07
<b><i>BRCA2</i> p.Asn372His rs144848</b>	C	0,224	0,218	0,88	0,02	0,96	0,6-1,54
<b><i>BRCA2</i> p.Thr1915Met rs4987117 (с использованием поправки Холдейна–Энскомба)</b>	T	0,042	0,042	1	0	1,0	0,38-2,65

<b><i>BRCA1</i></b> p.Gln356Arg rs1799950 (с использованием поправки Холдейна–Энскомба)	C	0,063	0,037	0,25	1,31	0,61	0,26-1,43
<b><i>BRCA1</i></b> p.Met1652Ile rs1799967	T	0,068	0,046	0,35	0,88	0,67	0,29-1,56
<b><i>ABL1</i></b> p.Pro803=) rs2229070 (с использованием поправки Холдейна–Энскомба)	G	0,089	0,088	0,98	0,0	0,99	0,5-1,97
<b><i>EGFR</i></b> p.Thr903=) rs1140475	T	0,099	0,097	0,95	0,0	0,98	0,51-1,88
<b><i>ROS1</i></b> p.Ser2229Cys rs619203	C	0,276	0,356	0,08	3,03	1,45	0,95-2,21
<b><i>ROS1</i></b> p.Lys2228Gln rs529156	G	0,276	0,356	0,08	3,03	1,45	0,95-2,21
<b><i>ROS1</i></b> p.Asp2213Asn rs529038	T	0,276	0,356	0,08	3,03	1,45	0,95-2,21
<b><i>MET</i></b> p.Thr1010Ile rs56391007(с использованием поправки Холдейна–Энскомба)	T	0,036	0,014	0,14	2,17	0,37	0,09-1,46

Таблица 33 – Результаты сравнительного анализа частот генотипов замен онкогенов в группе здоровых индивидов и группе пациенток с РШМ при поиске ассоциаций с риском развития РШМ

<b><i>ERBB2</i></b> rs1058808	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация
Генотипы	204	CC	CG	GG	$\chi^2=5,51$ $p= 0,063$
Опыт	108	10(0,092)	41(0,380)	57(0,528)	
Контроль	96	11(0,114)	50(0,521)	35(0,364)	
<b><i>ERBB2</i></b> rs1136201	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация
Генотипы	204	AA	AG	GG	$\chi^2=2,15$ $p= 0,34$
Опыт	108	67(0,620)	34(0,315)	7(0,065)	
Контроль	96	50(0,521)	37(0,385)	9(0,094)	

<b>KIT</b> rs3822214	N	Число генотипов (частоты) с использованием поправки Холдейна–Энскомба			Ассоциация
Генотипы	204	CC	AC	AA	$\chi^2=0,0$ p=1
Опыт	108	0(0)	9(0,083)	99(0,917)	
Контроль	96	0(0)	8(0,083)	88(0,917)	
<b>RET</b> rs1799939	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация
Генотипы	204	AA	AG	GG	$\chi^2=5,04$ p=0,08
Опыт	108	1(0,009)	32(0,296)	75(0,694)	
Контроль	96	4(0,042)	18(0,188)	74(0,771)	
<b>BRCA2</b> rs144848	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация
Генотипы	204	CC	AC	AA	$\chi^2=0,12$ p=0,94
Опыт	108	5(0,046)	37(0,343)	66(0,611)	
Контроль	96	4(0,042)	35(0,365)	57(0,594)	
<b>BRCA2</b> rs4987117	N	Число генотипов (частоты) с использованием поправки Холдейна–Энскомба			Ассоциация
Генотипы	204	TT	CT	CC	$\chi^2=1,43$ p=0,49
Опыт	108	0(0)	9(0,083)	99(0,917)	
Контроль	96	1(0,010)	6(0,063)	89(0,927)	
<b>BRCA1</b> rs1799950	N	Число генотипов (частоты) с использованием поправки Холдейна–Энскомба			Ассоциация
Генотипы	204	CC	CT	TT	$\chi^2=1,45$ p=0,48
Опыт	108	0(0)	8(0,074)	100(0,926)	
Контроль	96	0(0)	12(0,125)	84(0,875)	
<b>BRCA1</b> rs1799967	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация
Генотипы	204	TT	CT	CC	$\chi^2=1,0$ p=0,61
Опыт	108	1(0,009)	8(0,074)	99(0,917)	
Контроль	96	1(0,010)	11(0,115)	84(0,975)	
<b>ABL1</b> p.Pro803=) rs2229070	N	Число генотипов (частоты) с использованием поправки Холдейна–Энскомба			Ассоциация
Генотипы	204	GG	CG	CC	$\chi^2=0,0$ p=1
Опыт	108	0(0)	19(0,176)	89(0,824)	
Контроль	96	0(0)	17(0,177)	79(0,823)	

<b><i>EGFR</i></b> p.Thr903=) rs1140475	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация	
Генотипы	204	TT	TC	CC	$\chi^2=0,0$ p=1	
Опыт	108	1(0,009)	19(0,176)	88(0,815)		
Контроль	96	1(0,010)	17(0,177)	78(0,813)		
<b><i>ROS1</i></b> rs619203	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация	
Генотипы	204	CC	CG	GG	$\chi^2=3,23$ p=0,2	
Опыт	108	12(0,111)	53(0,491)	43(0,398)		
Контроль	96	6(0,063)	41(0,427)	49(0,510)		
<b><i>ROS1</i></b> rs529156	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация	
Генотипы	204	GG	TG	TT	$\chi^2=3,23$ p=0,2	
Опыт	108	12(0,111)	53(0,491)	43(0,398)		
Контроль	96	6(0,063)	41(0,427)	49(0,510)		
<b><i>ROS1</i></b> rs529038	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация	
Генотипы	204	TT	CT	CC	$\chi^2=3,23$ p=0,2	
Опыт	108	12(0,111)	53(0,491)	43(0,398)		
Контроль	96	6(0,063)	41(0,427)	49(0,510)		
<b><i>MET</i></b> rs56391007	N	Число генотипов (частоты) с использованием поправки Холдейна–Энскомба			Ассоциация	
Генотипы	204	TT	CT	CC	$\chi^2=2,08$ p=0,35	
Опыт	108	0(0)	3(0,028)	105(0,972)		
Контроль	96	0(0)	7(0,073)	89(0,327)		

Таблица 34 – Результаты сравнительного анализа частот аллелей замен генов, не ответственных напрямую за опухолеобразование, в группе здоровых индивидов и группе пациенток с РШМ при поиске ассоциаций с риском развития РШМ

Полиморфный локус	Ал.	MAF (Контроль)	MAF (Опыт)	P	$\chi^2$	OR	ДИ 95%
<b><i>F5</i></b> p.Met1764Val rs6030	C	0,349	0,384	0,46	0,54	1,16	0,78-1,74
<b><i>F5</i></b> p.Lys858Arg rs4524	C	0,276	0,287	0,81	0,06	1,06	0,69-1,63

<b>F5</b> p.Leu1285Ile rs1046712	T	0,141	0,144	0,93	0,01	1,02	0,59-1,79
<b>OPRM1</b> p.Asn40Asp rs1799971	G	0,182	0,130	0,14	2,16	0,67	0,39-1,15
<b>SLO1D1</b> p.Val174Ala rs4149056	C	0,255	0,194	0,14	2,17	0,7	0,44-1,12
<b>NAT2</b> p.Arg268Lys rs1208	A	0,589	0,639	0,3	1,09	1,24	0,83-1,84
<b>NAT2</b> p.Ile114Thr rs1801280	T	0,583	0,630	0,34	0,91	1,21	0,82-1,81
<b>CYP2B6</b> p.Arg22Cys rs8192709 (с использованием поправки Холдейна– Энскомба)	C	0,042	0,069	0,27	1,24	1,59	0,70-3,62
<b>F5</b> p.Arg534=) rs6025 (с использованием поправки Холдейна– Энскомба)	T	0	0,019	0,17	1,88	3,34	0,54-20,52
<b>F5</b> p.Thr1365=) rs9332607	G	0,675	0,690	0,75	0,10	1,07	0,71-1,62
<b>F5</b> p.Lys414=) rs6035 (с использованием поправки Холдейна– Энскомба)	T	0,932	0,954	0,35	0,88	1,5	0,65-3,48

Таблица 35 – Результаты сравнительного анализа частот генотипов замен генов, не ответственных напрямую за опухолеобразование, в группе здоровых индивидов и группе пациенток с РШМ при поиске ассоциаций с риском развития РШМ

<b>F5</b> rs6030	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация
Генотипы	204	CC	CT	TT	$\chi^2=0,55$ $p=0,76$
Опыт	108	19(0,176)	45(0,417)	44(0,407)	
Контроль	96	15(0,156)	37(0,385)	44(0,458)	

<b>F5 rs4524</b>	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация
Генотипы	204	CC	CT	TT	$\chi^2=1,13$ p= 0,57
Опыт	108	11(0,102)	40(0,370)	57(0,528)	
Контроль	96	12(0,125)	29(0,302)	55(0,573)	
<b>F5 rs1046712</b>	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация
Генотипы	204	TT	TG	GG	$\chi^2=0,01$ p=0,93
Опыт	108	3(0,028)	25(0,231)	80(0,741)	
Контроль	96	1(0,010)	25(0,260)	70(0,729)	
<b>OPRM1 rs1799971</b>	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация
Генотипы	204	AA	AG	GG	$\chi^2=2,07$ p=0,15
Опыт	108	3(0,028)	22(0,204)	83(0,769)	
Контроль	96	3(0,031)	29(0,302)	64(0,667)	
<b>SLO1D1 rs4149056</b>	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация
Генотипы	204	CC	TC	TT	$\chi^2=1,86$ p=0,17
Опыт	108	7(0,065)	28(0,259)	73(0,676)	
Контроль	96	9(0,094)	31(0,323)	56(0,583)	
<b>NAT2 rs1208</b>	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация
Генотипы	204	AA	AG	GG	$\chi^2=7,88$ p=0,02
Опыт	108	41(0,380)	56(0,518)	11(0,102)	
Контроль	96	39(0,406)	35(0,364)	22(0,229)	
<b>NAT2 rs1801280</b>	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация
Генотипы	204	TT	CT	CC	$\chi^2=8,15$ p=0,02
Опыт	108	39(0,361)	58(0,537)	11(0,102)	
Контроль	96	38(0,396)	36(0,375)	22(0,229)	
<b>CYP2B6 rs8192709</b>	N	Число генотипов (частоты) с использованием поправки Холдейна–Энскомба			Ассоциация
Генотипы	204	CC	CT	TT	$\chi^2=1,57$ p=0,46
Опыт	108	0(0)	15(0,139)	93(0,861)	
Контроль	96	0(0)	8(0,083)	88(0,917)	
<b>F5 p.Arg534=) rs6025</b>	N	Число генотипов (частоты) с использованием поправки Холдейна–Энскомба			Ассоциация
Генотипы	204	TT	CT	CC	$\chi^2=2,85$ p=0,24
Опыт	108	0(0)	4(0,037)	104(0,963)	
Контроль	96	0(0)	0(0)	96(1)	

<b>F5</b> p.Thr1365=) rs9332607	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация	
Генотипы	204	AA	GA	GG	$\chi^2=0,16$ p=0,69	
Опыт	108	10(0,093)	47(0,435)	51(0,472)		
Контроль	96	7(0,073)	49(0,510)	40(0,417)		
<b>F5 p.Lys414=)</b> rs6035	N	Число генотипов (частоты) с использованием поправки Холдейна–Энскомба			Ассоциация	
Генотипы	204	TT	TC	CC	$\chi^2=0,92$ p=0,63	
Опыт	108	98(0,907)	10(0,093)	0(0)		
Контроль	96	83(0,865)	13(0,135)	0(0)		

Таблица 36 – Результаты сравнительного анализа частот генотипов полиморфных вариантов rs1801133 и rs1801131 гена *MTHFR* на группе пациенток с РШМ, достигших и не достигших трехлетней выживаемости.

Полиморфный локус	Ал.	MAF (Контроль)	MAF (Опыт)	P	$\chi^2$	OR	ДИ 95%
<b><i>MTHFR</i> rs1801133 (с использованием поправки Холдейна–Энскомба)</b>	C	0,671	0,800	0,07	3,4	1,85	0,96-3,56
	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация		
Генотипы	108	TT	TC	CC	$\chi^2=3,99$ p= 0,14		
Достигли 3х летней выживаемости	73	7(0,096)	34(0,466)	32(0,438)			
Не достигли 3х летней выживаемости	35	0(0)	14(0,400)	21(0,600)			
Полиморфный локус	Ал.	MAF (Контроль)	MAF (Опыт)	P	$\chi^2$	OR	ДИ 95%
<b><i>MTHFR</i> rs1801131</b>	C	0,260	0,457	0,004	8,37	2,39	1,32-4,35
	N	Число генотипов (частоты)			Ассоциация		
Генотипы	108	CC	CA	AA	$\chi^2=8,69$ p= 0,01		
Достигли 3х летней выживаемости	73	4(0,055)	30(0,411)	39(0,534)			
Не достигли 3х летней выживаемости	35	7(0,200)	18(0,514)	10(0,286)			