

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

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Уфа – 2025

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики человека в Институте Биохимии и Генетики - обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН).

Научный руководитель: Миннихаев Илдар Рамилович	Кандидат биологических наук, доцент
Официальные рецензенты	
Гималова Галя Фуатовна Кандидат биологических наук	Научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека Института биохимии и генетики - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН)
Аюпова Гузель Рамилевна Кандидат медицинских наук	Начальник организационно-методического отдела клиники БГМУ
Ведущая организация:	Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН)

Защита научно-квалификационной работы состоится «19» сентября 2025 года в «12:00» часов на заседании аттестационной комиссии при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 71, конференц-зал ИБГ УФИЦ РАН (ком. №406).

Председатель аттестационной комиссии
доктор биологических наук, профессор
Фархутдинов Рашит Габдулхаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Рак шейки матки (МКБ-10 – C53.0, C53.1, C53.8, C53.9) – это многофакториальное онкологическое заболевание, возникающее в эпителии шейки матки. Как распространенное злокачественное новообразование, представляющее значительную угрозу для здоровья женщин, рак шейки матки представляет собой серьезную проблему глобального общественного здравоохранения. В 2022 году было зарегистрировано 661 021 новый случай и 348 189 смертей, связанных с раком шейки матки во всем мире. Рак шейки матки чаще всего вызывается инфекцией вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска (Zhou L. et al., 2025). Однако до 90% ВПЧ-инфекций спонтанно и без какого-либо лечения элиминируется (Довлетханова и др., 2023), а сама малигнизация по современным данным может занимать до 40 лет (Wang et al., 2020). Кроме длительного вирусоносительства в канцерогенезе шейки матки весомую роль отдают иммуносупрессивным состояниям и действию канцерогенных веществ (Bowden et al., 2023). На сегодняшний день доказан весомый наследственный компонент в возникновении рака шейки матки (Ramachandran et al., 2021), а возникновение рака шейки матки, кроме прочего, происходит под влиянием генетических факторов, но ключевые молекулярные пути заболевания раскрыты не полностью. В связи с этим, выявление генов молекулярно-генетической предрасположенности к раку шейки матки и разработка на их основе прогностических маркеров ранней диагностики заболевания и подходов таргетного лечения является актуальной задачей современной профилактической медицины.

Степень разработанности темы исследования. Ранее основной фокус внимания в изучении ВПЧ-зависимого рака шейки матки был обращен на сам вирус и те молекулярные механизмы, которые приводят к канцерогенезу под его влиянием. Но за последние десятилетия история изучения генетики рака шейки матки пополнилась изучением наследственного компонента в патогенезе заболевания. Изучение наследуемости происходило в несколько ключевых

этапов: исследование генов-кандидатов, полногеномные исследования и секвенирование.

Существует необходимость разработки предикторных систем, обладающих высоким прогностическим потенциалом с высокой долей чувствительности и специфичности, основная цель которых будет представлять собой вспомогательный инструмент, используемый наряду с клинической лабораторной диагностикой ВПЧ-инфекции и цитологическим исследованием соскоба шейки матки для прогноза исхода течения ВПЧ инфекции.

Цель исследования: определение распространённости и персистентного носительства ВПЧ инфекции, идентификация наиболее распространенных онкогенных типов вируса у женщин из Республики Башкортостан, и оценка спектра и частоты герминальных замен у женщин с клиническим диагнозом рак шейки матки, а так же поиск генов предрасположенности к раку шейки матки и разработка прогностической модели риска развития рака шейки матки.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определение распространённости ВПЧ инфекции, идентификация спектра и частот онкогенных типов вируса у женщин из Республики Башкортостан с оценкой частоты спонтанной элиминации/персистенции ВПЧ.
2. Поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов *CLPTM1L* (rs27069), *PAX8* (rs10175462) и *CDC42* (rs2268177) с развитием рака шейки матки с учетом спонтанной элиминации ВПЧ.
3. Анализ спектра редких герминальных вариантов замен нуклеотидной последовательности ДНК, выявленных при таргетном NGS секвенировании 42 генов, с оценкой их значимости (*in silico*) при раке шейки матки.
4. Поиск ассоциаций частых вариантов 20 генов, выявленных при таргетном секвенировании, с риском развития рака шейки матки.
5. Оценка микросателитной нестабильности в соматической ДНК пациенток с герминальными условно-патогенными мутациями в генах системы репарации неспаренных оснований ДНК (dMMR) на основе анализа 5 микросателитных локусов (MSI): NR-21, BAT26, BAT-25, NR-24, NR-27.

6. Определение генетических маркеров предрасположенности к раку шейки матки с целью оптимизации ранней диагностики и профилактики заболевания.

Научная новизна. Впервые в Республике Башкортостан была выполнена не только оценка спектра и распространенности ВПЧ инфекции, но и осуществлен мониторинг течения инфекции у пациенток, обследованных в рамках проекта по скринингу ВПЧ. В результате чего были выделены рискованная группа с персистентным вирусносительством и группа со спонтанной элиминацией ВПЧ. Впервые в России были проведены репликативные исследования трех полиморфных вариантов генов *CLPTMIL* (rs27069), *PAX8* (rs10175462) и *CDC42* (rs2268177), ассоциированных в результате GWAS с РШМ. Были выявлены редкие, патогенные и условно-патогенные варианты герминальных замен у пациенток с РШМ. Произведены ассоциативные исследования для 20 генов с РШМ для популяции из Республики Башкортостан. Описаны редкие варианты герминальных замен с неясной клинической значимостью и выделена группа потенциально патогенных вариантов. Так же на основании полученных данных были разработаны прогностические модели риска развития рака шейки матки.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Поиск герминальной составляющей ВПЧ-зависимого рака шейки матки является значимой и на сегодняшний день не решенной задачей. Анализ распространенности ВПЧ и его типов, выполненный в рамках этой работы, еще раз подчеркнули необходимость внедрения новых предикторных инструментов. Нами были выделены редкие патогенные варианты, выявленные у пациенток с ВПЧ-зависимым раком шейки матки. Кроме этого в задачи исследования входило изучение полиморфных вариантов с последующей разработкой прогностических моделей риска развития рака шейки матки. Полученные данные позволили выявить потенциальную применимость и релевантность метода для разработки персонализированной генетической диагностики рака шейки матки в клинической практике и системе профилактики здравоохранения Российской Федерации. Методология исследования состоит в использовании системного подхода на основе комплекса молекулярно-генетического и клинического анализов, а также

анализа литературных данных отечественных и зарубежных авторов в области генетики рака шейки матки. Для молекулярно-генетического исследования были выбраны следующие методы исследования: выделение ДНК с соскоба шейки матки, выделение геномной ДНК фенольно-хлороформной экстракцией, метод обратного гибридного захвата, полимеразная цепная реакция синтеза ДНК (ПЦР) в режиме «реального времени», метод секвенирования нового поколения, иммуногистохимический и метод фрагментного анализа, а так же различные варианты биоинформатического анализа.

Положения, выносимые на защиту:

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. В результате проведенного исследования по распространенности ВПЧ инфекции и ее типов в Республике Башкортостан, мы показали, что более 50% ВПЧ-инфицированных женщин являются носителями как минимум трех типов вируса, самыми распространенными из которых были 16, 51 и 56. Не было выявлено прямой зависимости между вирусной нагрузкой, элиминацией вируса и количеством типов ВПЧ в образце. Были сделаны выводы о необходимости расширении предсказательных инструментов течения ВПЧ-инфекции, одним из которых является предикторная панель, основанная на генетическом тестировании.
3. 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 T и генотипом TT локуса rs2268177 гена *CDC42*, однако не было выявлено ассоциации с полиморфизмом rs10175462 гена *PAX8*.
4. В результате исследования была выявлена группа герминальных патогенных замен у пациенток с раком шейки матки: p.(Ser836Ter) гена *APC*, p.(Arg3052Trp)

гена *BRCA2*, p.(Trp531Leu) гена *BRAF*, p.(Trp117Ter) гена *MSH2*, p.(Phe1088LeufsTer5) гена *MSH6*.

5. Для редких полиморфных вариантов неясной клинической значимости p.(Arg988Cys) в гене *MET* и p.(Cys324Trp) гена *CHEK2* были выявлены ранее не описанные ассоциации с риском развития рака шейки матки. А при использовании *in silico* инструментов мы показали, что варианты p.(Arg1040Trp) гена *ABL1*, p.(Arg680Gln) гена *EGFR*, p.(Gly2245Ser) гена *ROS1*, p.(Gly1299Arg) в гене *MET* и p.(Pro399Leu) в гене *MSH6* являются, вероятно-патогенными, в виду того, что наибольшее количество биоинформатических инструментов говорят об их патогенности.

6. Были выявлены ранее не описанные ассоциации с полиморфными вариантами p.(Pro1170Ala) гена *ERBB2*, p.(Arg268Lys) и p.(Ile114Thr) гена *NAT2*.

7. Была разработана прогностическая модель риска развития рака шейки маки.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается применением современных молекулярно-генетических методов и объемом проделанной работы. Результаты исследования согласуются с данными, представленными в отечественной и зарубежной литературе. Выводы полностью и в строгой логической последовательности соответствуют поставленным задачам и отражают полученные результаты.

Личный вклад автора в проведенные исследования. Определение темы диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем к.б.н., доцентом И.Р. Миннихметовым. Автор самостоятельно изучил отечественную и зарубежную литературу по теме диссертации, лично написал рукопись данной работы, а также непосредственно участвовал в подготовке материалов к публикациям и их написании. Соискатель самостоятельно проводил экспериментальную работу, обрабатывал, анализировал и обобщал полученные результаты.

Публикации. По теме научной квалификационной работы опубликовано 6 печатных работ, в том числе 1 статья в журналах, индексируемых Web of science,

2 статьи в журналах, индексируемых Scopus, и 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК.

Соответствие научной квалификационной работы паспорту научной деятельности. Работа «Исследование молекулярно-генетических основ формирования рака шейки матки» соответствует формуле специальности 1.5.7 – «Генетика». В работе исследованы молекулярно генетические аспекты рака шейки матки, а также изучена возможность их использования в качестве маркеров риска развития данной патологии у пациентов.

Структура и объем работы. Научно-квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 212 работу зарубежных и отечественных авторов. Работа изложена на 180 страницах, содержит 10 рисунков и 37 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования. Заделом исследования являлись соскобы цервикального эпителия 28 928 женщин в возрасте 30-39 лет, обследованных в рамках пилотного проекта по скринингу рака шейки матки (2019 г.) с применением ВПЧ-тестирования (Миннихметов и др., 2020). Для 219 женщин с целью оценки распространенности вируса было проведено типирование ВПЧ. Для выделения групп с персистенцией и элиминацией ВПЧ спустя некоторое время повторно было обследовано 70 женщин, с последующим выделением их герминальной ДНК. В исследовании использовалась герминальная ДНК 495 женщин: 111 пациенток с клиническим диагнозом РШМ, 51 с зафиксированной элиминацией ВПЧ, 333 условно-здоровых женщин. Для проведения сравнительного анализа некоторых SNP, были использованы данные полногеномного секвенирования 96 здоровых лиц старше 50 лет с отсутствием в анамнезе онкологических заболеваний. Для дополнительного исследования так же было использовано соматическое ДНК опухолевой ткани 2 пациенток с

выявленными условно-патогенными герминальными заменами в системе генов dMMR.

Методы исследования. Работа включала использование ДНК, выделенного из соскоба с шейки матки с целью получения данных о носительстве ВПЧ и его типах, выделение геномной ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции для получения коллекции ДНК женщин с клиническим диагнозом РШИ и групп сравнения, выделение соматической опухолевой ДНК пациенток с выявленными патогенными и вероятно-патогенными герминальными заменами в генах системы репарации неспаренных оснований для последующего анализа микросателитной нестабильности. Для детекции и типирования ВПЧ в образце с соскоба эпителия шейки матки была применена технология гибридного захвата и полимеразной цепной реакции в «реальном времени» (ПЦР-РВ). Для исследования полиморфных вариантов герминальной ДНК была использована ПЦР-РВ, а так же секвенирование нового поколения с последующей обработкой полученных результатов при помощи различных баз данных и *in silico* инструментов. Исследование микросателитной нестабильности было проведено методами иммуногистохимии и методом фрагментного анализа. Так же был применен биоинформатический анализ с использованием программного обеспечения PLINK версии 1.09 и ROC-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Распространенность вируса папилломы человека и его типов среди женщин из Республики Башкортостан.

В ходе анализа распространенности ВПЧ мы установили, что большинство женщин, обследованных в рамках пилотного проекта 2019 года, находились в возрастной группе 30–39 лет. Согласно данным литературы, уровень ВПЧ-позитивности среди женщин различается в зависимости от возраста: среди женщин младше 25 лет он составляет примерно 30%, в группе 25–34 лет — около

12%, в возрасте 35–44 лет — около 6%, а среди женщин 45–65 лет — менее 5%. (Миннихметов и др., 2020). Таким образом, полученные данные показывают, что средний уровень распространённости ВПЧ среди женщин в возрасте 30–39 лет составил 10,6%. У инфицированных пациенток было выявлено 17 различных типов вируса, при этом количество одновременно обнаруженных типов варьировало от 1 (17,6% случаев) до 11 (0,5%) (см. рис. 1). Более половины ВПЧ-положительных женщин являлись носителями как минимум трёх типов вируса. Прямой зависимости между вирусной нагрузкой и числом типов ВПЧ в образце выявлено не было: например, у носительницы 11 типов вируса вирусная нагрузка составила 1 810,73 условных единиц свечения, тогда как у женщин с одним типом ВПЧ она достигала 2 197,56 и выше. У женщин, инфицированных 10 типами ВПЧ, вирусная нагрузка колебалась от 181,08 до 1 625,05 условных единиц свечения.

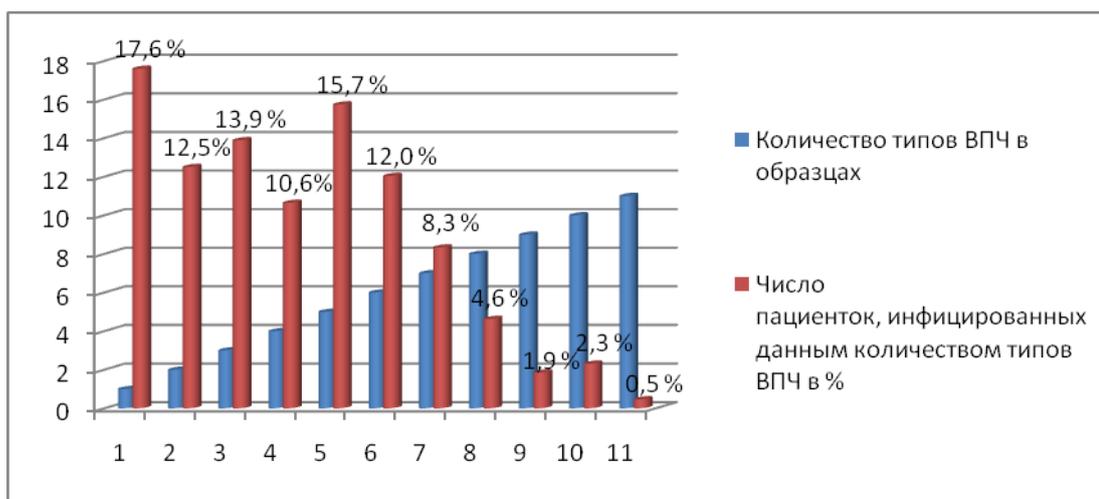


Рисунок 1 - Количество типов ВПЧ, одновременно детектированных у женщин из Республики Башкортостан

У 60% пациенток был выявлен ВПЧ 16-го типа, тогда как ВПЧ 18-го типа обнаружен лишь у 23,7% инфицированных женщин из Республики Башкортостан. ВПЧ 51-го и 56-го типов распространены среди 40% обследованных пациенток каждый. При этом высокоонкогенные типы ВПЧ 51 и 58, которые занимают лидирующие позиции по распространённости, не входят в число типов, против которых разработаны вакцины. Мы также пришли к выводу, что ни один из

широко применяемых в настоящее время методов диагностики не способен служить надежным прогностическим маркером исхода заболевания на ранних этапах, до появления выраженных клинических симптомов. Кроме того, вакцинация не покрывает весь спектр типов ВПЧ, что создает значительный пробел в профилактических мерах.

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

Полногеномный поиск ассоциаций (genome-wide association studies, GWAS) представляет собой мощный метод выявления однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с развитием рака шейки матки (РШМ). В результате проведенных исследований были идентифицированы значимые ассоциации с геном *PAX8*, длиной межгенной некодирующей РНК 339, геном *CDC42*, геном, ответственным за резистентность к цисплатину, а также с локусами HLA и GSDM-B (Koel et al., 2023). Примечательно, что фактически все найденные ассоциации приходятся на интронные области в генах, по есть вероятно выполняют регуляторную функцию. Однако, общеизвестным фактом является и то, что в разных этнических группах полиморфные варианты, которыми безусловно являются варианты, выявленные в результате GWAS, сегрегируются по-разному, и от разности этой сегрегации зависит фенотипическое проявление эффекта замены.

Таблица 1 – Результаты исследования локусов *CLPTM1L* (rs27069), *PAX8* (rs10175462) и *CDC42* (rs2268177) у пациенток с раком шейки матки.

Ген	Координата	Рисковый аллель	Результат	Рисковый генотип	Результат
<i>CLPTM1L</i>	rs27069	G	p=0,043 $\chi^2=4,098$	GG	$\chi^2=4,172$ p= 0,124

			ОШ = 1,395 ДИ 95% = 1,01-1,929		
<i>PAX8</i>	rs10175462	G	p=0,217 $\chi^2=1,526$ ОШ = 1,212 ДИ 95% = 0,893 -1,643	GG	$\chi^2=1,54$ p= 0,463
<i>CDC42</i>	rs2268177	T	p=3,751e-005 $\chi^2=16,99$ ОШ = 1,945 ДИ 95% = 1,413-2,676	TT	$\chi^2=17,35$ p= 0,0002

В результате репликативного исследования трех полиморфных вариантов на группе пациенток с клиническим диагнозом РШМ и группы сравнения, мы показали, что для одного из трех полиморфизмов, а именно rs гена *PAX8* ассоциации выявлено не было. Это указывает на то, что для создания предикторных инструментов, основанных на генетическом типировании, необходимо адаптировать их для популяций, особенно не вошедших в выборку GWAS (Россия, Китай, Индия, Африка, Южная Америка). Однако изученные полиморфные варианты генов *CDC42* и гена резистентности к цисплатину могут войти в генетическую предикторную панель для нашей популяции.

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

Еще одним важным инструментом выявления предрасположенности к раку шейки матки является применение секвенирования следующего поколения (NGS) для изучения герминальных вариантов у пациенток с этим заболеванием. Одним из подходов является выявление патогенных и условно-патогенных замен. В зависимости от состава таргетной панели генов, используемой для секвенирования, доля выявленных патогенных и условно-патогенных замен

составляет примерно 5%. Исследование Хао Вэня и его коллег по распространенности патогенных и потенциально патогенных вариантов зародышевой линии в 62 генах предрасположенности к раку в китайской популяции показало, что распространенность патогенных и потенциально патогенных вариантов составила 6,4% (23 из 358) для рака шейки матки (Qiu et al., 2022). В результате проведенного нами исследования, с использованием кастомной NGS панели для анализа 48 генов, 27 из которых относятся к категории протоонкогенов и опухолевых супрессоров, в когорте женщин с клиническим диагнозом РШМ было выявлено 148 замен нуклеотидной последовательности генов, непосредственно участвующих в опухолеобразовании. 23,6% являются доброкачественными согласно литературным источникам и базам данных, 70,9% относятся к категории VUS и их клиническую значимость еще предстоит раскрыть. Семь замен (4,7 %) являются патогенными или условно патогенными, а полиморфный вариант rs1042522 в гене TP53 ассоциирован в ряде исследований с риском развития РШМ.

Таблица 2 - Спектр и частоты патогенных и вероятно-патогенных замен в протоонкогенах и генах онко-супрессоров

Вариант	Частота	Значимость варианта
<i>TP53</i> c.215G>C p.(Pro72Arg) rs1042522	94(0,87) 144G(0,666) 50GG	Доброкачественный или вероятно патогенный для варианта GG
<i>CHEK2</i> c.470T>C p.(Ile157Thr) rs17879961	3(0,027) 3C(0,014) 3TC	Патогенная
<i>APC</i> c.2507C>G p.(Ser836Ter) rs1580623270	1(0,009) 1G(0,005) 1CG	Патогенная
<i>BRCA2</i> c.9154C>T p.(Arg3052Trp) rs45580035	1(0,009) 1T(0,005) 1CT	Патогенная
<i>BRAF</i>	1(0,009)	Вероятно-патогенная

c.1592G>T p.(Trp531Leu) rs397507478	1T(0,005) 1GT	
<i>MSH2</i> c.350G>A p.(Trp117Ter) rs786202083	1(0,009) 1A(0,005) 1GA	Патогенная
<i>MSH2</i> ->G p.(Asp706GlyfsTer11)	0,005	Вероятно-патогенная
<i>MSH6</i> ->C p.(Phe1088LeufsTer5)	0,005	Вероятно-патогенная

В результате проведенного нами анализа мы показали, что из представленных патогенных и вероятно-патогенных вариантов значимыми для РШМ являются варианты p.(Ser836Ter) гена *APC*, p.(Arg3052Trp) гена *BRCA2*, p.(Trp531Leu) гена *BRAF*, p.(Trp117Ter) гена *MSH2*, p.(Phe1088LeufsTer5) гена *MSH6*. Важным вспомогательным инструментом для дифференцировки значимости герминальных замен системы репарации неспаренных состояний послужило применение фрагментного анализа с исследованием 5 микросателлитных локусов (MSI): NR-21 BAT-26 BAT-25 NR-24 NR-27. В результате данного исследования было показано, что для пациентки с выявленным вариантом p.Phe1088LeufsTer5 ->C гена *MSH6*, в отличие от варианта p.Asp706GlyfsTer11->G гена *MSH2* были выявлены признаки микросателлитной нестабильности (рисунок 2). Таким образом мы можем сделать вывод, что герминальная замена p.(Phe1088LeufsTer) гена *MSH6* патогенна, оказала влияние на течение заболевания.

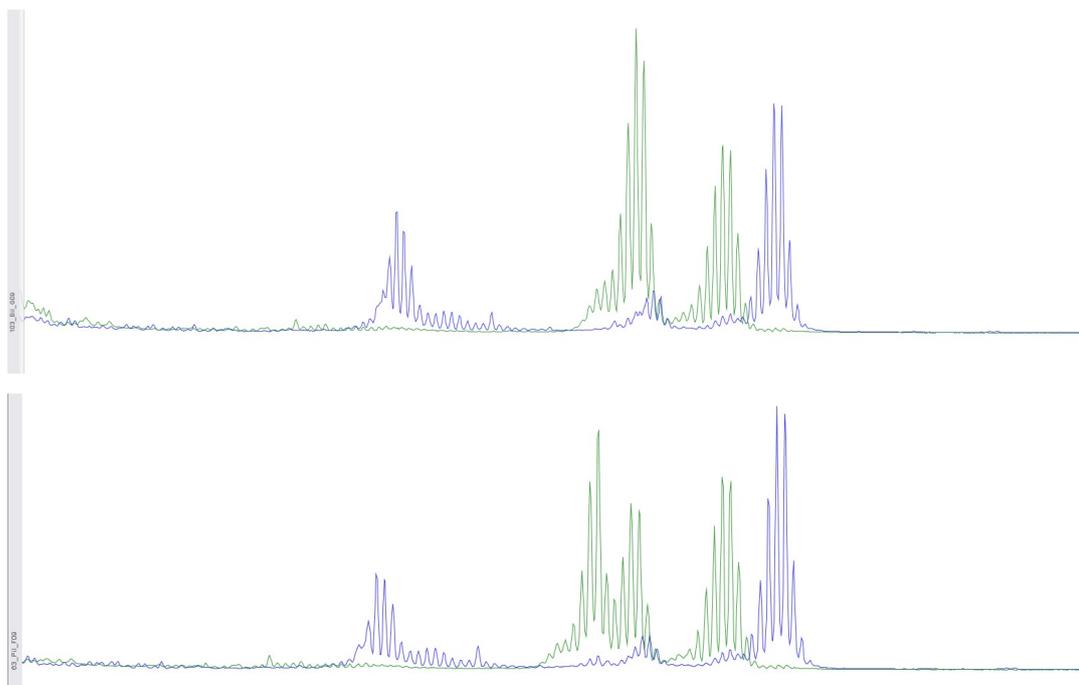


Рисунок 2 - Метод фрагментного анализа на генетическом анализаторе 3500xL с исследованием 5 микросателлитных локусов (MSI): NR-21 BAT-26 BAT-25 NR-24 NR-27.

Кроме этого нами были обнаружены новые ассоциации с полиморфными вариантами из категории с неясной клинической значимостью (VUS).

Таблица 3 – Результаты ассоциативного анализа вариантов из категории с неясной клинической значимостью, которые продемонстрировали ассоциации.

Ген	Координата	Рисковый аллель	Результат	Рисковый генотип	Результат
<i>MET</i>	rs34589476	T	p=0,002 $\chi^2=9,8$ ОШ = 10,76 ДИ 95% = 1,69 – 68,73	NA	NA
<i>CHEK2</i>	rs1060502712	C	p=0,05 $\chi^2=3,8$ ОШ = 5,92 ДИ 95% = 0,78 -45,1	NA	NA
<i>ERBB2</i>	rs1058808	G	p=0,046 $\chi^2=3,97$ ОШ = 1,52	GG	$\chi^2=5,51$ p= 0,063

			ДИ 95% = 1,01-2,31		
<i>NAT2</i>	rs1208	A	p=0,3 $\chi^2=1,09$ ОШ = 1,24 ДИ 95% = 0,83-1,84	AA	$\chi^2=7,88$ p= 0,02
<i>NAT2</i>	rs1801280	T	p=0,34 $\chi^2=0,91$ ОШ = 1,21 ДИ 95% = 0,82-1,81	TT	$\chi^2=8,15$ p= 0,02

Особенный интерес из перечисленных замен с неясной клинической значимостью представляет миссенс-вариант p.(Arg988Cys) в гене *MET* (с.2962C>T, rs34589476, chr7:116411923), который в гетерозиготном состоянии обнаружен у 3 (2,7 %) женщин русской этнической принадлежности с плоскоклеточным РШМ. При достаточно благоприятном *in silico* прогнозе, данный вариант, приходящийся на функционально значимый юкстамембранный домен, считается фактором предрасположенности к раку при его сочетании с онкогеном, который управляет клеточной пролиферацией, но не влияют напрямую на онкотрансформацию (Tyner et al., 2010). Таким образом, с учетом патогенеза рака шейки матки эти замены могут быть заменами предрасположенности к нему и усиливать онкогенный эффект ВПЧ. К тому же, обнаруженный относительно часто у когорты пациенток, данный вариант не был обнаружен у групп сравнения, что предполагает его стопроцентную пенетрантность.

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 *P53* 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 С 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.

Нами было проанализировано 54 редкие замены неясной клинической значимости в протоонкогенах и генах супрессорах-опухолей. Для анализа редких замен категории VUS мы использовали базы данных ClinVar, OncoBRCA, Ensembl, GnomAD, UniProt, AlphaFold. 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, DynaMut2, PrimateAI-3D, SpliceAI. В результате этого к вариантам из категории неясной клинической значимости (VUS) с неблагоприятным *in silico* прогнозом мы отнесли замены p.Arg1040Trp (ген ABL1), p.Arg680Gln (ген EGFR), p.Gly2245Ser (ген ROS1), p.Gly1299Arg (ген MET) и p.Pro399Leu (ген MSH6).

Разработка прогностических моделей риска развития рака шейки матки у женщин

Заключительным этапом нашего исследования стало создание прогностической модели развития 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 качестве группы сравнения в данной модели использовались результаты секвенирования здоровых лиц старше 50 лет с отсутствием в анамнезе онкологических заболеваний. В результате этого нами была получена модель, значимый эффект в которой обнаружен только для генотипа АТ rs2268177 ($p = 0.0145$) (рисунок 2, таблица 4).

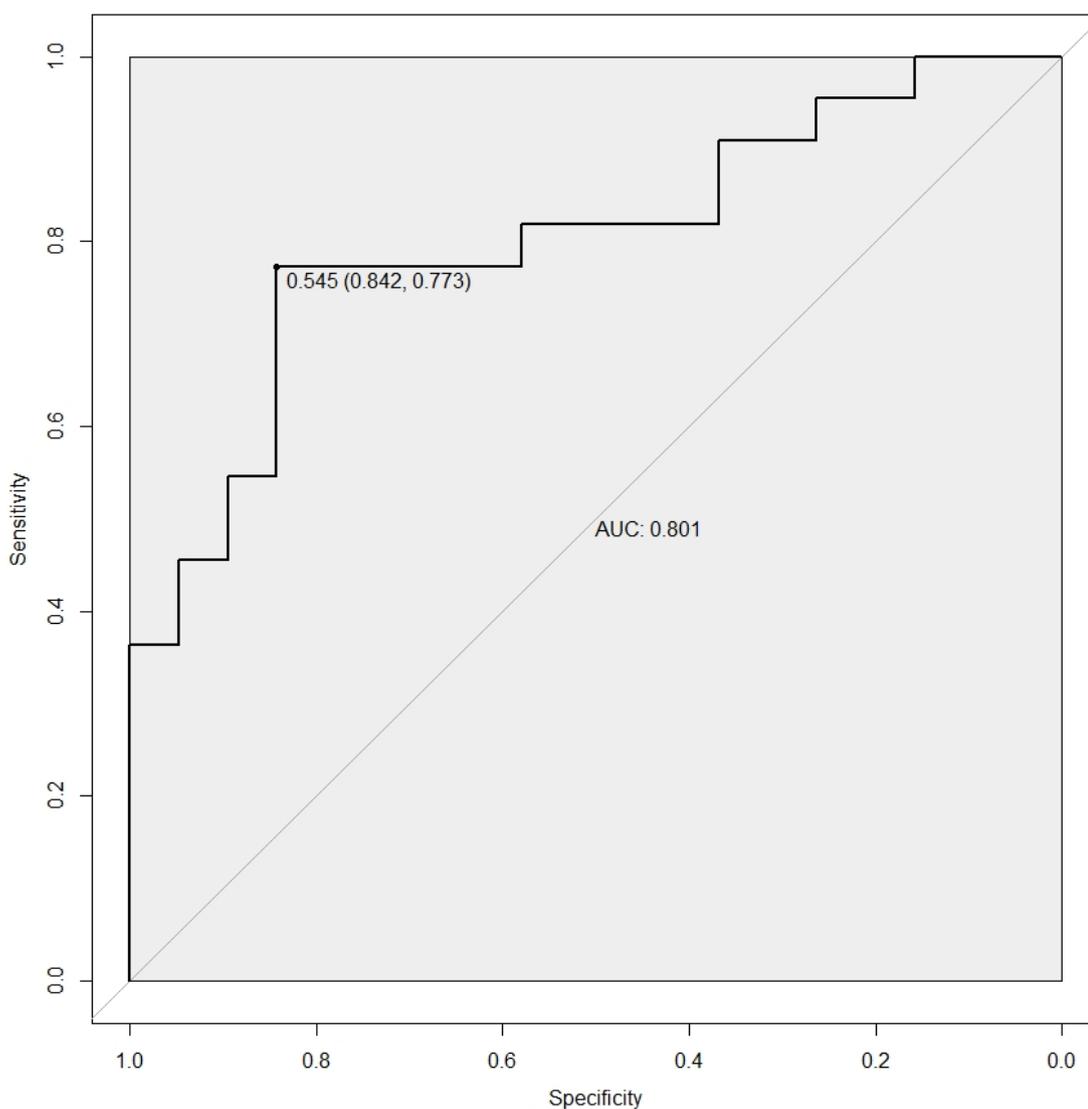


Рисунок 2 – Прогностическая модель риска развития рака шейки матки построенная на основании генотипов rs1058808, rs1208, rs1801280, rs27069, rs2268177 и rs10175462

Таблица 4 – Прогностическая модель риска развития рака шейки матки построенная на основании генотипов rs1058808, rs1208, rs1801280, rs27069, rs2268177 и rs10175462.

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 AT rs2268177 $OR=e^{0,92829} \approx 2,53$. Это значит, что наличие генотипа AT увеличивает шансы положительного исхода примерно в 2,5 раза по сравнению с референсным генотипом AA.

Далее с целью подтверждения полученных данных мы отобрали полиморфные варианты rs2268177, rs27069 и rs10175462. В качестве группы сравнения в данной модели использовались данные генотипирования группы

условно-здоровых женщин. В результате этого нами была получена модель, в которой интерсепт, то есть константа или логарифм шансов при всех предикторах, равных нулю равен $-2,1011$, 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 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 3, таблица 5).

Анализ коэффициентов для rs27069 и rs10175462 демонстрирует, что все р-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.

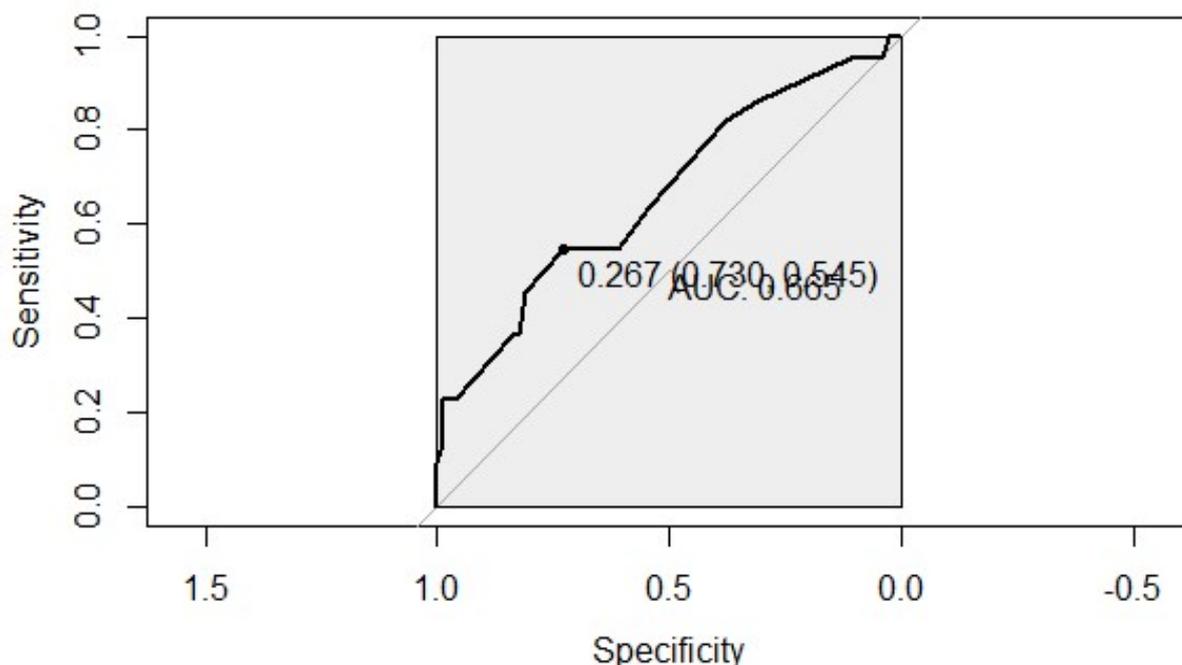


Рисунок 3 – Прогностическая модель риска развития рака шейки маки построенная на основании генотипов rs27069, rs2268177 и rs10175462.

Таблица 5 – Прогностическая модель риска развития рака шейки матки построенная на основании генотипов rs27069, rs2268177 и rs10175462.

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 **

Анализ для генотипа ТТ rs22681772 показал, что коэффициент изменения логорифма шансов составил 1.2560. Чтобы получить отношение шансов (odds ratio, OR), нужно взять экспоненту: $OR=e^{1.2560}\approx 3.51$. Это значит, что наличие генотипа ТТ увеличивает шансы положительного исхода примерно в 3.5 раза по сравнению с референсным генотипом.

Выводы

1. В исследуемом регионе России среди женщин в возрасте 30-39 лет частота инфицирования ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) составила 10,3%, при этом средний показатель вирусной нагрузки достиг 287,9 RLU/COV, что соответствует высокой вирусной нагрузке.
2. Более половины инфицированных женщин были носителями не менее трёх различных типов вируса. Прямая зависимость между вирусной нагрузкой, элиминацией вируса и количеством типов ВПЧ в образце выявлена не была. В работе сделан акцент на необходимости расширения предсказательных инструментов для течения ВПЧ-инфекции, одним из таких инструментов является панель предикторов, основанная на генетическом тестировании.
3. В результате исследования полиморфизмов, связанных с риском развития рака шейки матки (РШМ) и выявленных ранее методом GWAS, были подтверждены статистически значимые ассоциации с рисковым аллелем G локуса rs27069 гена CLPTM1L, а также с аллелем T и генотипом TT локуса rs2268177 гена CDC42.
4. В ходе исследования выявлена группа редких патогенных герминальных мутаций у пациенток с РШМ: p.Ser836Ter (ген APC), p.Arg3052Trp (ген BRCA2), p.Trp531Leu (ген BRAF), p.Trp117Ter (ген MSH2) и p.Phe1088LeufsTer5 (ген MSH6).
5. Для ряда редких вариантов неясной клинической значимости, выявленных с помощью NGS-анализа, как p.Arg988Cys (ген MET) и p.Cys324Trp (ген CHEK2), были обнаружены ранее не описанные связи с риском рака шейки матки. Применение *in silico* методов показало, что варианты p.Arg1040Trp (ген ABL1), p.Arg680Gln (ген EGFR), p.Gly2245Ser (ген ROS1), p.Gly1299Arg (ген MET) и p.Pro399Leu (ген MSH6) являются вероятно патогенными, поскольку большинство биоинформатических инструментов указывает на их патогенность.
6. Кроме того, выявлены новые ассоциации с полиморфными вариантами p.Pro1170Ala (ген ERBB2), p.Arg268Lys и p.Ile114Thr (ген NAT2).
7. Установлена также связь полиморфизмов p.Pro72Arg гена P53 и p.Glu429Ala гена MTHFR с течением рака шейки матки.

8. Были разработаны прогностические модели риска рака шейки матки, которые подтвердили значимую прогностическую роль варианта rs2268177 гена CDC42.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ СТАТЕЙ

1. Lenkova K. et al. Germline variants in proto-oncogenes and tumor suppressor genes in women with cervical cancer // *Biomedicines*. – 2024. – Т. 12. – №. 11. – С. 2454.
2. Ленкова К. В. и др. Поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов MTHFR, MET, SNEK2, идентифицированных в ходе секвенирования нового поколения, с раком шейки матки // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2025. – Т. 12. – №. 1. – С. 84-95.
3. Ленкова К.В., Лялина Г.З., Минязева Р.К., Ахметова В.Л., Ялаев Б.И., Гилязова И.Р., Хусаинова Р.И., Миннихметов И.Р. Поиск генов предрасположенности к раку шейки матки с оценкой распространённости онкогенных типов вируса папилломы человека у женщин из Республики Башкортостан // *Российский онкологический журнал*. - 2025. - Т. 30. - №1. - С. 5-16.
4. Ленкова К.В., Хусаинова Р.И., Миннихметов И.Р. Молекулярно-генетические основы рака шейки матки // *Молекулярная медицина*. – 2023. – Т. 4. – С. 25-33.
5. Ленкова К.В., Минязева Р.К., Хусаинова Р.И., Гилязова И.Р., Миннихметов И.Р. Поиск генетической предрасположенности к раку шейки матки // *Эндокринная хирургия*. – 2023. – Т. 17. - № 4. - С. 47.
6. Изучение спектра и частоты ВПЧ у женщин из Республики Башкортостан. Ленкова К.В., Миннихметов И.Р. Конференция «Ломоносов-2022». Секция «Генетика». (Тезис).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou L. et al. Global cervical cancer elimination: quantifying the status, progress, and gaps //BMC medicine. – 2025. – Т. 23. – №. 1. – С. 67.
2. Довлетханова Э. Р., Прилепская В. Н. Опыт применения противовирусного препарата растительного происхождения у пациентов с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями //ОППОНЕНТ. – 2023. – С. 42.
3. Wang R. et al. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge //Cancer letters. – 2020. – Т. 471. – С. 88-102.
4. Bowden S. J. et al. Risk factors for human papillomavirus infection, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: an umbrella review and follow-up Mendelian randomisation studies //BMC medicine. – 2023. – Т. 21. – №. 1. – С. 274.
5. Ramachandran D., Dörk T. Genomic risk factors for cervical cancer //Cancers. – 2021. – Т. 13. – №. 20. – С. 5137.
6. Миннихметов И. Р. и др. Пилотный проект по скринингу рака шейки матки с применением ВПЧ тестирования //Вопросы онкологии. – 2020. – Т. 66. – №. 6. – С. 618-624.
7. Koel M. et al. GWAS meta-analyses clarify the genetics of cervical phenotypes and inform risk stratification for cervical cancer //Human Molecular Genetics. – 2023. – Т. 32. – №. 12. – С. 2103-2116.
8. Qiu L. et al. Characterization of the genomic landscape in cervical cancer by next generation sequencing //Genes. – 2022. – Т. 13. – №. 2. – С. 287.
9. Tyner J. W. et al. MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity //Cancer research. – 2010. – Т. 70. – №. 15. – С. 6233-6237.