

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ И ГЕМАТОЛОГИИ**

**КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ им. И. К. АХУНБАЕВА**

Диссертационный совет Д 14.22.655

На правах рукописи
УДК 618.1-006.6-056.7(575.2)(0.43.3)

ЮСУФОВА МӨЛТҮР АНВАРОВНА

**РОЛЬ ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ В РАЗВИТИИ РАКА
РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ У ЖЕНЩИН КЫРГЫЗСКОЙ
НАЦИОНАЛЬНОСТИ**

14.01.12 – онкология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Бишкек - 2024

Работа выполнена на кафедре онкологии и лучевой терапии Кыргызско-Российского славянского университета имени Б. Н. Ельцина.

- Научный руководитель:** **Макимбетов Эмил Кожошевич**
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой онкологии и лучевой
терапии Кыргызско-Российского Славянского
университета имени Б. Н. Ельцина
- Официальные оппоненты:** **Сатылганов Ишенбек Жусуевич**
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой патологической
анатомии Кыргызской государственной
медицинской академии имени И. К. Ахунбаева
- Батырканова Чынара Жээнбековна**
кандидат медицинских наук, заведующая
отделением онкогинекологии Национального
центра онкологии и гематологии Министерства
здравоохранения Кыргызской Республики
- Ведущая организация:** Казахский научно-исследовательский институт
онкологии и радиологии, ученый совет
(050000, Республика Казахстан, г. Алматы, пр.
Абая 91).

Защита диссертации состоится «27» июня 2024 года в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 14.22.61 55 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора (кандидата) медицинских наук при Национальном центре онкологии и гематологии Министерства здравоохранения Кыргызской Республики, соучредитель Кыргызская государственная медицинская академия имени И. К. Ахунбаева по адресу: 720064, Кыргызская Республика, Бишкек, ул. Ахунбаева, 92, 2 этаж, конференц-зал. Ссылка на видеоконференцию защиты диссертации: <https://vc.vak.kg/b/142-tct-cmy-dx6>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеках Национального центра онкологии и гематологии Министерства здравоохранения Кыргызской Республики (720064, г. Бишкек, ул. Ахунбаева, 92), Кыргызской государственной медицинской академии имени И. К. Ахунбаева (720020, г. Бишкек, ул. Ахунбаева, 92) и на сайте <https://vak.kg>

Автореферат разослан 16 мая 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук

У. А. Тургунбаев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Рак шейки матки – одна из важнейших медико-социальных проблем здравоохранения практически всех стран мира [М.И. Давыдов, Д.Г. Заридзе, 2014; A. Buskwofie, et al., 2020], а также важной медицинской и социальной проблемой в экономически развитых странах мира [Л.В. Пикалова, 2019; A.D. Shrestha, et al. 2018]. Несмотря на многочисленные исследования, патогенез РШМ до сих пор остается во многом неясным. В настоящее время доказана роль вирусов папилломы человека (ВПЧ), особенно 16 и 18 типов, в развитии рака шейки матки [M. Arbyn et al., 2020]. Однако для развития рака шейки матки недостаточно только иметь позитивный статус по ВПЧ высокого онкогенного риска.

К настоящему времени известно более 30 генов, предположительно связанных с генетической предрасположенностью к раку шейки матки [Е.Н. Имянитов, 2014; H. Cai et al., 2020]. Хорошо изучены полиморфные варианты генов, вовлечённые в механизмы репарации ДНК или контроля клеточного цикла, которые принимают непосредственное участие в развитии неопластического процесса [Т. М. Грицко, 2000; H. Jin et al., 2017]. Роль других генов, например семейства глутатион-S-трансфераз, исследована в меньшей степени.

Для рака шейки матки характерен свой специфический набор генов предрасположенности, но в то же время неизвестно, взаимодействием скольких генов определяется развитие данного заболевания. С использованием метода полногеномного поиска ассоциаций уже идентифицировано множество генов-кандидатов рака шейки матки [Н.А. Петрусенко и др., 2019; M. Abbas et al., 2018]. Среди генов, полиморфизм которых ассоциирован с повышенным риском развития рака шейки матки, особое место занимают гены семейства глутатионтрансфераз GSTM1, GSTP1 и GSTT1 [O. Gorukmez et al., 2016; J. Klusek et al., 2018]. Ферменты метаболизма ксенобиотиков (ФМК), которые кодируются данными генами, составляют основу II фазы детоксикации ксенобиотиков.

Глутатионтрансферазы (GST, Glutathione S-transferase) катализируют взаимодействие глутамата с электрофильными атомами (C, N, S, O) широкого спектра соединений. GST катализирует реакцию глутамата с различными алифатическими, ароматическими, эпоксидными и гетероциклическими радикалами экзогенных повреждающих веществ. В зависимости от типа субстрата в семействе GST выделяют четыре класса: альфа (α), мю (μ), пи (π) и тета (θ). Глутатион опосредованная детоксикация играет ключевую роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению жиров, свободным радикалам, алкилированию белков и др. (M. Matic, et al, 2013; M. R. Safarinejad, et al., 2013)

Ген *GSTM1* (glutathione S-transferase mu 1, NCBI Gene ID – 2944), локализованный на хромосоме 1, существует в трех аллельных вариантах – *GSTM1a*, *GSTM1b* и *GSTM1* null. Последний вариант характеризуется протяженной (около 10 тыс п.н.) делецией, в результате чего белковые продукты вообще не синтезируются. Установлено, что в большинстве групп мирового населения частота нулевой аллели гена *GSTM1* может достигать 55% и выше (Y. I. Stepanova, et al., 2021).

Ген *GSTP1* (glutathione S-transferase pi 1, NCBI Gene ID – 2950) локализован на хромосоме 11. Одним из наиболее изученных полиморфизмов гена *GSTP1* является p.Ile105Val (rs1695) – замена нуклеотидов в 313-м положении гена (с.313A> G), которая приводит к замене аминокислоты изолейцин на валин в 105 кодоне. В зависимости от генотипа по гену *GSTP1* может наблюдаться почти семикратное изменение каталитической активности фермента по отношению к полициклическим ароматическим соединениям (Z. H. Chen et al., 2017).

Ген *GSTT1* (glutathione S-transferase theta 1, NCBI Gene ID – 2952) картирован на хромосоме 22 (W. Settheetham-Ishida, et al., 2009). Как и в случае *GSTM1*, благодаря высокой частоте распространенности обширной делеции в структурной части гена, 15–30% европеоидов оказываются гомозиготными по нулевой аллели *GSTT1*. У таких индивидуумов зарегистрирована повышенная предрасположенность к развитию различного рода неоплазий (M. Moghimi, et al., 2019).

Принято считать, что данные полиморфные варианты глутатионтрансфераз – *GSTM1* null, rs1696 (*GSTP1*) и *GSTT1* null, – увеличивают восприимчивость человека к различным заболеваниям, в том числе к различным нозологическим формам рака [K. Ott et al., 2008; F. Kargar Shouroki et al., 2019].

Сочетанное носительство отдельных полиморфных вариантов генов *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1* также может обуславливать индивидуальные особенности предрасположенности к развитию рака шейки матки. Таким образом, изучение генетической основы развития рака шейки матки необходимо как для построения целостной картины патогенеза заболевания, так и для ранней оценки риска предрасположенности к раку шейки матки. На современном этапе борьбы с онкопатологией, когда терапия её не столь эффективна, ранняя оценка риска предрасположенности к раку шейки матки имеет решающее значение, так как позволяет уменьшить бремя рака путём изменения или предотвращения основных факторов риска.

Связь темы диссертации с приоритетными научными направлениями, крупными научными программами (проектами), основными научно-исследовательскими работами, проводимыми образовательными и научными учреждениями. Тема входит в план научных направлений Министерства образования и науки Кыргызской Республики.

Цель исследования. Изучить межгенные взаимодействия и вклад полиморфных вариантов генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* в формирование

предрасположенности к раку шейки матки у женщин кыргызской национальности.

Задачи исследования:

1. Изучить генетический профиль кыргызской популяции по полиморфизмам генов *GSTM1*/rs366631, *GSTP1*/rs1695 и *GSTT1*/rs17856199.
2. Оценить роль однонуклеотидных полиморфизмов генов *GSTM1*/rs366631, *GSTP1*/rs1695 и *GSTT1*/rs17856199 при раке шейки матки в кыргызской популяции.
3. Изучить межгенные взаимодействия и вклад полиморфных вариантов генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* в формирование предрасположенности к раку шейки матки у женщин кыргызской национальности.

Научная новизна полученных результатов:

1. Впервые в Кыргызстане определена роль полиморфизмов *GSTM1*/rs366631, *GSTP1*/rs1695 и *GSTT1*/rs17856199 в генезе рака шейки матки.
2. Впервые охарактеризована связь исследуемых полиморфизмов с некоторыми клинико-морфологическими характеристиками опухоли.
3. Впервые определено влияние обозначенных генотипов на развитие рака шейки матки в кыргызской этнической группе, что впоследствии можно использовать для профилактики и ранней диагностики заболевания.

Практическая значимость полученных результатов:

1. Метод поможет выявлять группы высокого онкологического риска, проводить профилактические мероприятия в этих группах и, таким образом, существенно снижать заболеваемость.
2. Полученные результаты работы могут внести вклад в создание «генетической карты» рака шейки матки в кыргызской популяции и послужить дальнейшему изучению молекулярно-генетического разнообразия опухоли, ведь насчитывается множество генов предрасположенности к раку шейки матки. Более того, некоторые из этих изученных генов могут в дальнейшем стать новой мишенью для терапевтического воздействия.
3. Результаты молекулярно-генетических исследований рекомендуются к использованию при подготовке студентов высших учебных заведений биологического и медицинского профиля, а также в учреждениях здравоохранения и академических лабораториях молекулярно-генетической направленности при формировании групп риска рака шейки матки (акт внедрения от 25.04.2023 г.).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Делеция участка гена *GSTM1* является генетическим маркером, ассоциированным с повышенной вероятностью развития рака шейки матки – ОШ=2,02, 95% ДИ (1,28–3,20), $p=0,002$.
2. Делеция участка полиморфизма null в гене *GSTT1* – может рассматриваться как генетический маркер, ассоциированным с повышенной

вероятностью развития рака шейки матки – ОШ=3,04, 95% ДИ (2,00-4,64), $p<0,0001$.

3. Сочетанное носительство конкретных вариантов полиморфных локусов в генах *GSTM1* и *GSTT1* ассоциировано с повышенной вероятностью развития рака шейки матки у женщин кыргызской национальности.

Личный вклад автора. Все материалы, необходимые для проведения данного исследования были проработаны непосредственно автором: на этапах постановки цели и задач, проведения исследования. Статистическая обработка и анализ полученных данных были выполнены автором лично.

Апробации результатов диссертации. Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на: Международной научно-практической конференции Международной высшей школы медицины, посвященной 70-летию проф. Ш. М. Чынгышпаева (Бишкек, 2018); Международной конференции «Вопросы науки и практики – 2019 (2 сессия)», (Москва, 2019); Ежегодной научно-практической конференции преподавателей Кыргызско-Российского Славянского университета (Бишкек, 2020, 2021, 2022); Межотделенческой конференции кафедры хирургических болезней Международной высшей школы медицины, кафедры онкологии и лучевой терапии Кыргызско-Российского Славянского университета (Бишкек, 2022).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, из них 2 статьи - в периодическом научном издании, индексируемой системой «Scopus» и 5 статей - в периодических научных изданиях, индексируемых системой РИНЦ с импакт-фактором не ниже 0,1.

Структура и объём диссертации. Работа состоит из введения; двух глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования; одной главы собственных наблюдений; заключения; выводов; практических рекомендаций и списка использованных источников (114), из которых 38 на русском, 76 на иностранных языках и приложения. Диссертация изложена на 93 страницах, иллюстрирована 6 таблицами и 6 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении представлена актуальность темы диссертации, ее цели и задачи, научная новизна, практическая значимость, основные положения диссертации, выносимые на защиту.

В главе 1 «Обзор литературы» представлены и анализированы отечественные и зарубежные источники, связанные с темой диссертации: представлены данные о распространенности рака шейки матки (РШМ) в мире и в

Кыргызской Республике, а также описаны гены, ассоциированные с развитием РШМ.

1.1 Полиморфизмы различных генов при раке шейки матки. В данном разделе изучены полиморфизмы различных генов при РШМ, таких как цитохрома P450 (CYP), Ile462Val, EXO1 K589G, Fas, MspI и др.

1.2 Роль ферментов глутатион S-трансферазы (GST) в генезе злокачественных опухолей человека. Показано, что для различных видов онкологических заболеваний наличие полиморфизма в генах GST является сильным и однозначным фактором риска для возникновения рака мочевого пузыря, колоректального рака, лейкозах, неходжскинской лимфоме, а также РШМ.

Глава 2. Материал и методы исследования.

2.1 Характеристика обследованных групп. Объект исследования: В исследование включены 191 женщина кыргызской национальности, из них 95 женщин кыргызской национальности с морфологически верифицированным диагнозом рак шейки матки (группа случая) и 96 здоровых женщин (контрольная группа) (таблица 2.1.1).

Предмет исследования: клинические, морфологические, лабораторные и генетические характеристики лиц в основной и контрольной группах. Исследование проведено по типу «случай/контроль».

В общую группу исследования вошли женщины кыргызской национальности, постоянно проживающих на территории Кыргызской Республики. Пациенты основной группы с гистологически верифицированным диагнозом РШМ, в период 2014–2016 гг. находились на стационарном лечении в отделении гинекологии Национального центра онкологии и гематологии Министерства здравоохранения Кыргызской Республики. В группу сравнения вошли здоровые женщины, которые на момент забора крови не имели онкологической патологии в анамнезе и не состояли в родстве с пациентами из основной группы.

Таблица 2.1.1 – Средний возраст пациенток РШМ в основной и контрольной группах

Группа	Средний возраст, лет ($M \pm m$)	Ранг, лет
Основная (n=95)	51 \pm 17,8	29 - 76
Контрольная (n=96)	45,9 \pm 8,8	35 - 74

2.2 Молекулярно-генетические исследования. Забор крови и выделение ДНК: после разъяснительной беседы и добровольного согласия в письменной форме у всех обследуемых пациентов сделан забор 5 мл венозной крови для проведения молекулярно-генетических исследований. Для сбора периферической крови использовались пробирки BD Vacutainer K2E.

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови пациентов. Выделение ДНК проводили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. После лизирования эритроцитов буфером, содержащим сахарозу, MgCl₂ (5mM), тритон X-100 (1 %), трис HCl (10mM), лейкоциты осаждали центрифугированием 40 мин при 7000 об./мин. Лейкоциты лизировали додецил сульфатом натрия (SDS), деградацию белков осуществляли протеинкиназой K. Депротеинизацию лизата осуществляли добавлением равного объема смеси фенол, смесь фенол/хлороформ и хлороформа с последующим центрифугированием при 10000 g 10 минут. После центрифугирования отбирали водную фазу и повторяли процедуру депротеинизации 2–3 раза. ДНК осаждали преципитацией с использованием 4М NaCl и холодного 96% этанола. ДНК промывали 70% спиртом дважды, затем сушили при комнатной температуре. После высушивания ДНК растворяли в деионизированной воде. ДНК хранили в низкотемпературном морозильнике при минус 86 градусов.

2.3 Исследование полиморфизмов генов *GSTM1/rs366631*, *GSTP1/rs1695* и *TP53 (rs104252)* и *GSTT1/rs17856199*: идентификацию генотипа в полиморфных локусах *GSTM1/rs366631*, *GSTP1/rs1695* и *GSTT1/rs17856199* проводили методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Краткая характеристика исследованных однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) представлена в таблице 2.3.1.

Таблица 2.3.1 - Краткая характеристика исследованных полиморфных вариантов

Ген/rs	Хромосомная локализация гена*	Аминокислотная замена / делеция (null)
<i>GSTM1/rs366631</i>	Chr.1 (NC_000001.11):109,687,201 – 109,694,340	null
<i>GSTP1/rs1695</i>	Chr.11 (NC_000011.10):67,583,289 – 67,586,959	p.Ile105Val (rs1695)
<i>GSTT1/rs17856199</i>	Chr.22 (NT_187633.1):269,490 – 279,304	null

Информация о последовательностях олигонуклеотидов для анализируемых полиморфных вариантов, а также об используемой эндонуклеазе рестрикции представлены в таблице 2.3.2.

Таблица 2.3.2 – Структура праймеров для амплификации фрагментов в полиморфных вариантах генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1*

Полиморфизм (ген)	Последовательность олигонуклеотида 5'>3'	Эндонуклеаза рестрикции	Ссылка
null (<i>GSTM1</i>)	F: 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' R: 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'	-	[19]
p.Ile105Val (<i>GSTP1</i>)	F: 5'-TATGGGAAGGACCAGCAGGA-3' R: 5'-CAAGCCACCTGAGGGGTAAG-3'	TaiI (HpyCH4IV)	исследование
null (<i>GSTT1</i>)	F: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' R: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGC-3'	-	[19]

Результаты электрофоретического разделения ампликонов или продуктов реакции рестрикции для исследуемых полиморфных вариантов представлены на рисунке 2.3.1.

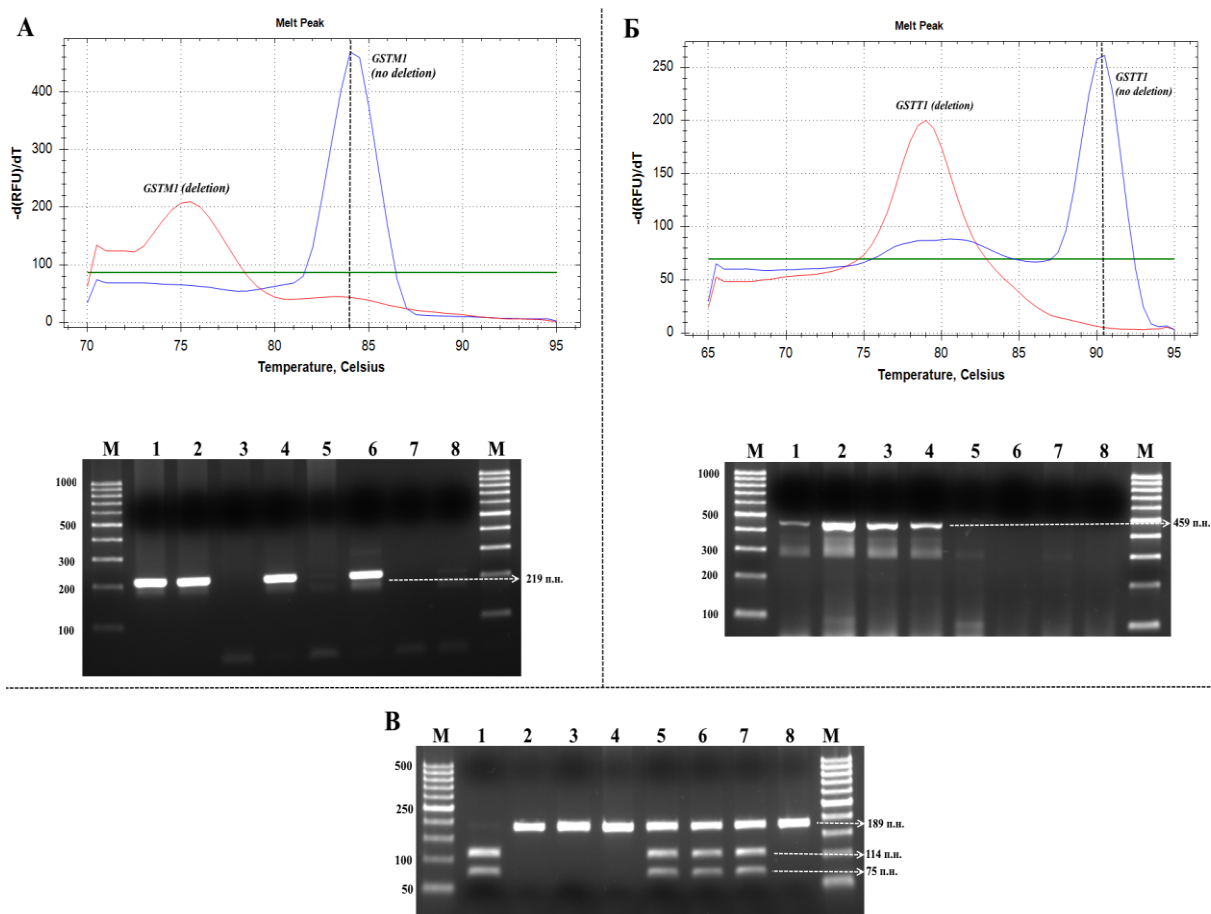


Рисунок 2.3.1 – Электрофореграммы и профиль плавления ампликонов: А – null (ген *GSTM1*): №№ 3, 5, 7, 8 – делеция, №№ 1, 2, 4, 6 – делеция отсутствует; Б – null (ген *GSTT1*): №№ 5-8 – делеция, №№ 1-4 – делеция отсутствует; В – ОНП p.Ile105Val (ген *GSTP1*) – №№ 2-4, 8 – генотип AA, №№ 5-7 – AG, № 1 – GG; М – маркер молекулярного веса (Jena Bioscience M-214 и M-213).

2.4 Статистический анализ проводился с использованием SPSS v.20.0 (IBM, США) и GraphPad Prism версии 5.0. Для нахождения различий между номинальными показателями использовали метод χ -квадрат. Уровень статистической значимости p при множественных сравнениях вычислялся экспериментально для каждого конкретного случая (сравнения) в процессе моделирования в пакете SPSS v.20.0. Использовали точный критерий Фишера, основанный на пермутации (англ. permutation) – уровень p вычисляется по формулам комбинаторной теории вероятностей. Анализ ассоциации генотипов с риском развития заболевания проводился путем вычисления показателя отношения шансов (ОШ) для аллелей каждого анализируемого полиморфного варианта (с расчетом 95% ДИ).

Анализ межгенных взаимодействий проводился биоинформатическим методом многофакторного сокращения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) с использованием размещенного в открытом доступе (англ. open-source software) ПО MDR v.3.0.2. (<http://www.multifactor dimensionality reduction.org/>). В процессе моделирования были использованы строгие настройки поиска конфигурации модели, которые позволили однозначно дифференцировать наличие/отсутствие статистически значимых эффектов: количество атрибутов – от 1 до n (где n – количество переменных в модели); воспроизводимость модели – 100; анализ топ-моделей – 1000; поиск конфигурации модели – всесторонний; метод сравнения – точный тест Фишера; классификация ячеек – неклассифицированные. Математической базой данной программы является непараметрический кластерный анализ для обнаружения и описания нелинейного типа взаимодействия между дискретными генетическими атрибутами.

Глава 3. Результаты собственных исследований.

3.1 Оценка роли однонуклеотидных полиморфизмов генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* в возникновении злокачественных новообразований шейки матки у лиц кыргызской этнической группы. Нами изучено распределение аллелей для трех полиморфных вариантов генов: *GSTM1* (null), *GSTP1* (p.Ile105Val), *GSTT1* (null) – у женщин с РШМ и в группе сравнения.

Анализ полиморфизма гена *GSTM1* (null) выявил статистически значимые различия в распределении частот аллелей между пациентами в основной (больные раком шейки матки) и группе сравнения (здоровые лица) показал статистически значимые различия. Статистическая достоверность была высокой и составила $p = 0,002$. В контрольной группе наблюдалось достоверное увеличение частоты делеционного полиморфизма по отношению к группе сравнения – 34,7% и 20,8% соответственно. Таким образом, у женщин кыргызской национальности делеция участка гена *GSTM1* является генетическим маркером, ассоциированным с повышенной вероятностью развития рака шейки матки (ОШ = 2,02, 95% ДИ 1,28 – 3,20, $p = 0,002$), тогда как отсутствие протяженной делеции в данном гене, напротив, ассоциировано с протективным эффектом, даже при наличии одной функциональной аллели, что отражено в таблице 3.1.1.

Таблица 3.1.1 - Характеристика генотипирования по полиморфизму гена глутатионтрансферазы null (*GSTM1*) исследуемых группах

Полиморфизм (ген)	Генотип /аллель	Больные РШМ, % (абс)	Группа сравнения, % (абс)	р	ОШ (95% ДИ)
null (<i>GSTM1</i>)	Делеция	34,7% (33)	20,8% (20)	0,002	2,02 (1,28- 3,20)
	Нет делеции	65,3% (62)	79,2% (76)		0,49 (0,31- 0,78)

Аналогичные результаты были получены для полиморфизма null в гене *GSTT1* – у женщин кыргызской национальности делеция участка гена *GSTT1* служила генетическим маркером, ассоциированным с повышенной вероятностью развития рака шейки матки – ОШ = 3,04, 95% ДИ (2,00-4,64), $\chi^2=27,57$, $p < 0,0001$, тогда как отсутствие протяженной делеции в данном гене, напротив, было ассоциировано с протективным эффектом (таблица 3.1.2).

Таблица 3.1.2 - Характеристика генотипирования по полиморфизму гена глутатионтрансферазы null (*GSTT1*) исследуемых группах

Полиморфизм (ген)	Генотип /аллель	Больные РШМ, % (абс)	Группа сравнения, % (абс)	р	ОШ (95% ДИ)
null (<i>GSTT1</i>)	Делеция	56,8% (54)	30,2% (29)	<0,001	3,04 (2,00- 4,64)
	Нет делеции	43,2% (41)	69,8% (67)		0,33 (0,22- 0,50)

Далее нами был изучен профиль полиморфного варианта гена p.Ile105Val (*GSTP1*), где никаких статистически значимых различий в распределении частот генотипов или аллелей между больными РШМ и женщинами из группы сравнения не выявилось, что представлено в таблице 3.1.3.

Таблица 3.1.3 - Анализ генотипирования по исследуемым полиморфизмам генов p.Ile105Val(*GSTP1*) в группе больных РШМ и практически здоровых женщин кыргызской национальности

Полиморфизм (ген)	Генотип /аллель	Больные РШМ, % (абс)	Группа сравнения, % (абс)	p	ОШ (95% ДИ)
p.Ile105Val (<i>GSTP1</i>)	Ile/Ile	61,1% (58)	67,7% (65)	0,591	0,75 (0,41-1,35)
	Ile/Val	32,6% (31)	28,1% (27)		1,24 (0,67-2,30)
	Val/Val	6,3% (6)	4,2% (4)		1,55 (0,42-5,68)
	Ile/Ile	61,1% (58)	67,7% (65)	0,342	0,75 (0,41-1,35)
	Ile/Val // Val/Val	38,9% (37)	32,3% (31)		1,34 (0,74-2,42)
	Ile/Ile // Ile/Val	93,7% (89)	95,8% (92)	0,513	0,64 (0,18-2,36)
	Val/Val	6,3% (6)	4,2% (4)		1,55 (0,42-5,68)
	Аллель Ile	77,4%	81,8%	0,290	0,76 (0,46-1,26)
	Аллель Val	22,6%	18,2%		1,31 (0,80-2,16)

3.2 Взаимоотношения между генами полиморфных вариантов глутатионтрансфераз *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* при раке шейки матки. При оценке сочетанного носительства полиморфных вариантов генов *GSTM1* (null), *GSTP1* (p.Ile105Val) и *GSTT1* (null) были выявлены статистически значимые ассоциации совокупности генотипов с повышенной вероятностью развития РШМ. Наиболее значимые парные комбинации, ассоциированные с РШМ, представлены на рисунке 3.2.1.

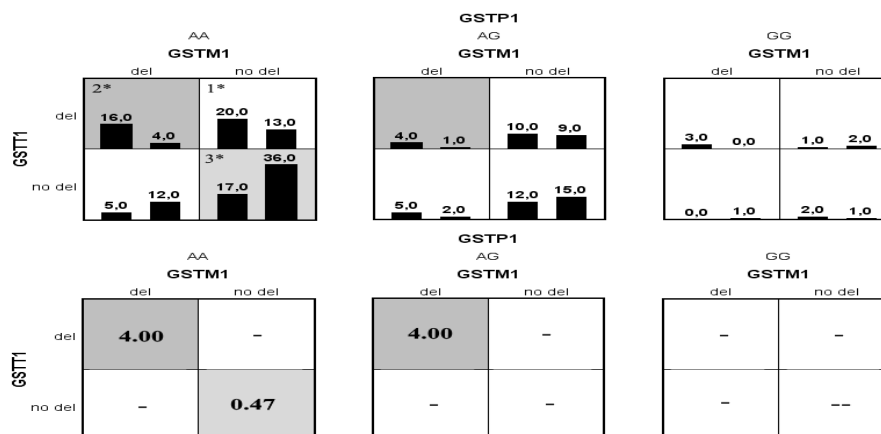


Рисунок 3.2.1 - Комбинации генотипов в рамках моделирования эффекта межгенных взаимодействий для полиморфных вариантов генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* (показаны рассчитанные значения ОШ).

Примечание: 1* (белый цвет) – различия между частотой встречаемости генотипа в основной группе и группе сравнения статистически незначимы

2* (темно-серый цвет) – сочетание генотипов, связанное с высокой вероятностью развития РШМ (риск-ассоциированный эффект)

3* (светло-серый цвет) – сочетание генотипов, связанное с высоким риском развития РШМ (протективный эффект).

Так, частота встречаемости сочетаний генотипов del (*GSTT1*) // del (*GSTM1*) // AA/AG (*GSTP1*) была статистически значимо выше у пациентов с РШМ, чем среди женщин из группы сравнения.

Как показывают результаты, среди парных комбинаций, ассоциированных с повышенной вероятностью развития РШМ, преобладали те, которые включали делеционные полиморфизмы генов *GSTM1* и *GSTT1*. Таким образом, у женщин, одновременно имеющих генотипы null (*GSTM1*) и null (*GSTT1*), вероятность развития РШМ возрастала не менее чем в 4,0 раза.

Таким образом, как было отмечено ранее, для женщин кыргызской национальности имеются особенности по наличию сочетанного генетического профиля полиморфных вариантов генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1*, ассоциированных с повышенной вероятностью развития РШМ.

С использованием программы MDR 3.0.2 проведено моделирование межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, отражающее вклад полиморфизма каждого гена в вероятность развития РШМ (выраженный в процентах).

Как видно на радиальной диаграмме (рисунок 3.2.2), среди трех исследованных полиморфных вариантов, наибольший вклад в увеличение вероятности возникновения РШМ вносит делеционный полиморфизм гена *GSTT1*. Показатель энтропии для данного полиморфного варианта составил 5,27%. Показатели энтропии по генам *GSTM1* (null) и *GSTP1* (p.Ile105Val) были значительно меньше и составили 1,75% и 0,40%, соответственно.

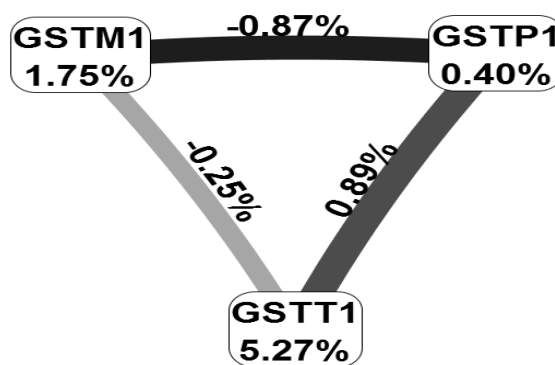


Рисунок 3.2.2 – Графическое изображение результатов анализа взаимодействий между полиморфными вариантами генов GSTM1, GSTP1 и GSTT1 у женщин кыргызской национальности при наличии РШМ.

Также с использованием программы MDR v.3.0.2 нами была построена модель, отражающая характер взаимодействия анализируемых в рамках данной работы полиморфных вариантов при РШМ, связанный, в свою очередь, с хромосомной локализацией полиморфизма (рисунок 3.2.3).

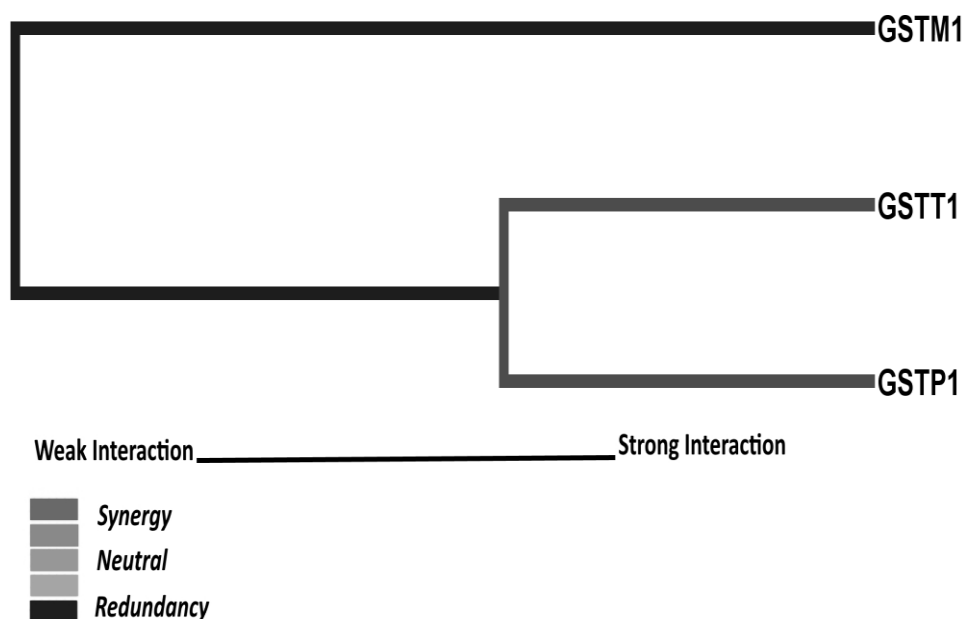


Рисунок 3.2.3 – Оценка дистанции связи (эффекта межгенного взаимодействия) между исследуемыми полиморфными вариантами null (ген GSTM1), p.Ile105Val (ген GSTP1) и null (ген GSTT1) для пациентов с РШМ.

В результате моделирования было выделено 2 кластера: 1. null (ген GSTM1); 2. p.Ile105Val (ген GSTP1) и null (ген GSTT1).

Полученные данные позволяют заключить, что в отношении полиморфных вариантов – p.Ile105Val (ген GSTP1) и null (ген GSTT1), – наблюдаются взаимодействия выраженного синергичного характера (линии темно-серого

цвета). Однако межгенные связи, характеризующиеся их длиной, для данных полиморфных вариантов выражены относительно слабо.

3.3 Характеристика ассоциации полиморфизма генов группы глутатионтрансфераз *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* с некоторыми клиническими и гистологическими данными злокачественных новообразований шейки матки. В данном исследовании проведено сравнение подгрупп в выборке пациентов с РШМ по клинко-морфологическим характеристикам опухоли в зависимости от статуса полиморфных вариантов генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1*. Анализ проводился по таким параметрам, как наличие метастазов в регионарных лимфоузлах (N), степень злокачественности опухоли (G), наличие отдаленных метастазов или рецидивов (M), форма роста опухоли, размер опухоли, SCC, РЭА, ВПЧ16 или ВПЧ18. Однако статистически значимых различий выявлено не было.

3.4 Взаимоотношения между генами группы глутатионтрансфераз, факторов репарации ДНК и контроля клеточного цикла при злокачественных опухолях шейки матки. Дополнительно нами был проведен анализ, направленный на оценку модификации вероятности развития РШМ при носительстве делеционного полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1*, а также ОНП p.Ile105Val гена *GSTP1* в зависимости от генотипа по ОНП p.Arg399Gln (ген *XRCC1*), p.Arg194Trp (ген *XRCC1*), p.Arg72Pro (ген *TP53*).

С использованием MDR-анализа была построена модель, отражающая характер взаимодействия полиморфных вариантов данных генов при РШМ (рисунок 3.4.1).

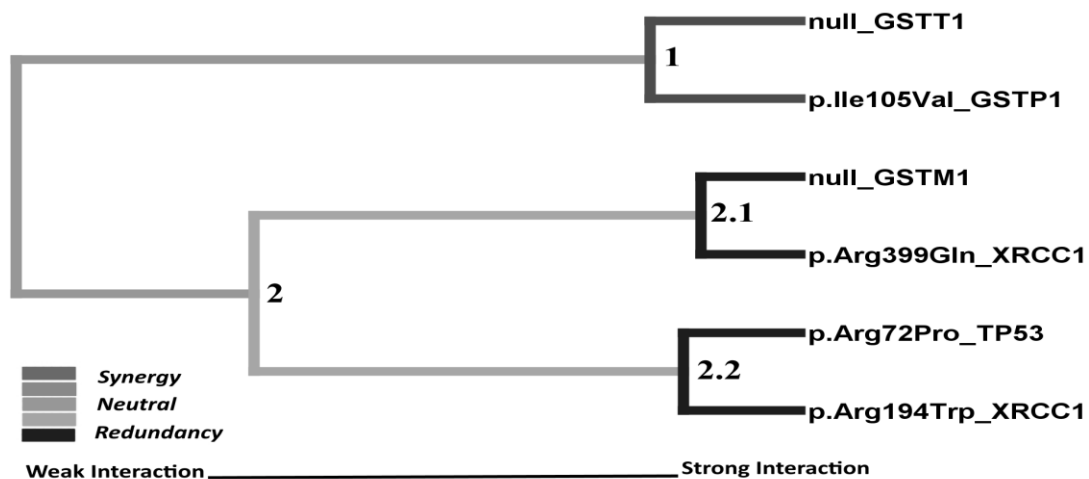


Рисунок 3.4.1 – Оценка дистанции связи (эффекта межгенного взаимодействия) между исследуемыми полиморфными вариантами генов семейства глутатионтрансфераз и генов репарации ДНК и контроля клеточного цикла; 1 и 2 – номера кластеров.

В результате моделирования было выделено 2 кластера:

1. null (ген GSTT1) и p.Ile105Val (ген GSTP1);
2. null (ген GSTM1), p.Arg399Gln (ген XRCC1), p.Arg72Pro (ген TP53) и p.Arg194Trp (ген XRCC1).

В пределах второго кластера представляется возможным выделить два субкластера.

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы: 1. в отношении пары полиморфных вариантов null (ген GSTT1) и p.Ile105Val (ген GSTP1) наблюдается ярко выраженный синергичный эффект – суммарный риск-ассоциированный эффект данных полиморфных вариантов превосходит их вклад при независимом влиянии; 2. в отношении других полиморфных вариантов эффекты взаимодействия имеют среднюю силу и колеблются от слабого дублирующего эффекта в отношении, например, пары null (ген GSTM1) и p.Arg399Gln (ген XRCC1), до почти нейтрального эффекта (отсутствие эффекта эпистаза) на уровне целых кластеров.

Однако стоит отметить, что ни для одной пары полиморфных вариантов генов GSTM1, GSTP1, GSTT1 и TP53, XRCC1 не было выявлено статистически значимых ассоциаций генотипов, увеличивающих вероятность развития РШМ.

Анализ полиморфизма данных генов достаточно широко представлен в научной литературе. В зависимости от этногеографической принадлежности исследуемых выборок, полученные результаты об оценке вклада полиморфизма генов GSTM1, GSTP1 и GSTT1 в увеличение риска развития РШМ значительно варьируют.

Связь делеционных полиморфизмов генов GSTM1 и GSTT1 с увеличением риска развития РШМ является спорным вопросом. Результаты исследований, проведенных в различных этнических регионах мира, таких как Индия и Казахстан, подтвердили роль нулевого полиморфизма генов GSTM1 и GSTT1 как факторов риска РШМ. В то же время, результаты исследований, проведенных в Таиланде, Турции и Сербии, не подтвердили роль полиморфных вариантов генов GSTM1 и GSTT1 в патогенезе РМШ. В исследовании, проведенном в Колумбии, был проведен анализ, направленный на оценку связи нулевого полиморфизма генов GSTM1 и GSTT1 с риском развития интраэпителиальных поражений высокой степени тяжести. Однако роль данных полиморфных вариантов оказалась существенно ниже, чем для таких факторов, как инфицирование высокоонкогенными типами ВПЧ, наличие мутаций или риск-ассоциированных полиморфизмов в некоторых генах метаболизма ксенобиотиков, например, CYP2E1.

Таким образом, полученные нами данные согласуются с результатами проведенных мета-анализов, однако имеются и региональные особенности. В

частности, оба делеционных полиморфизма в генах GSTM1 и GSTT1 оказались вовлеченными в увеличение вероятности развития РШМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Присутствие делеции локуса гена глутатион-S-трансферазы (GSTM1) рассматривается как генетический маркер, который статистически достоверно связан с увеличением риска рака шейки матки у лиц кыргызской национальности (отношение шансов равно 2,02, с 95% ДИ 1,28–3,20, $p=0,002$).

2. Хромосомная перестройка участка полиморфизма нулевого генотипа гена глутатион-S-трансферазы (GSTT1) является маркером при генетическом исследовании, который связан с повышенным риском развития плоскоклеточного рака шейки матки (отношение шансов = 3,04, 95% ДИ (2,00–4,64), $p < 0,0001$).

3. Сочетанное носительство конкретных вариантов полиморфных локусов в генах GSTM1 и GSTT1 и их генетическая манифестация способствуют повышению риска рака шейки матки у женщин кыргызской национальности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ:

1. Для формирования групп повышенного риска возникновения рака шейки матки в этнических группах населения необходимо проводить генетические исследования полиморфизма с исследованием генов глутатион-S-трансфераз.

2. Выявление групп повышенного риска рака шейки матки будет способствовать снижению заболеваемости и смертности.

3. Результаты молекулярно-генетических исследований рекомендуются к использованию при подготовке студентов высших учебных заведений биологического и медицинского профиля, а также в учреждениях здравоохранения и академических лабораториях молекулярно-генетической направленности при формировании групп риска рака шейки

4. Результаты исследования должны стать основой создания генетического атласа или карты рака шейки матки в определенной этнической группе для выявления генетической предрасположенности к злокачественным новообразованиям.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Анализ заболеваемости и смертности рака молочной железы и рака шейки матки в Кыргызстане [Текст] / [К. Б. Макиева, Б. Б. Султангазиева, М. А. Султангазиева (Юсуфова) и др.] // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета. - 2018. - Т. 18, № 6. - С. 51-54; То же: [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://vestnik.krsu.edu.kg/archive/6/642>
2. **Юсуфова, М. А.** Эпигенетика рака шейки матки (обзор литературы) [Текст] / М. А. Юсуфова, Э. К. Макимбетов // Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. - 2020. - № 2. - С. 79-84; То же: [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://science-journal.kg/ru/journal/1/archive/13322>
3. Вклад полиморфизма генов семейства глутатионтрансфераз gstm1, gstp1, gstt1 в формирование предрасположенности к раку молочной железы у женщин кыргызской национальности [Текст] / [Ж. Т. Исакова, В. Н. Кипень, М. М. А. Юсуфова и др.] // Вопросы онкологии. - Санкт-Петербург, 2020. - Т. 66, № 5. - С. 514-523; То же: [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://voprosyonkologii.ru/index.php/journal/article/view/1138>
4. Тренды заболеваемости раком шейки матки в Кыргызской Республике [Текст] / [Н. М. Букуев, Б. Б. Султангазиева, М. А. Юсуфова и др.] // Международный журнал гуманитарных и естественных наук. – Новосибирск, 2021. - № 4-2 (55). - С. 135–138; То же: [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://intjournal.ru/wp-content/uploads/2021/08/Bukuev2.pdf>
5. **Юсуфова, М. А.** Статистика онкогинекологических заболеваний в Кыргызской Республике [Текст] / [Н. М. Букуев, М. А. Юсуфова, Б. Б. Султангазиева и др.] // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета. - 2021. - Т. 21, № 9. - С. 32-36; То же: [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://vestnik.krsu.edu.kg/archive/169/7047>
6. Вклад вариантов генов семейства глутатионтрансфераз GSTM1, GSTP1, GSTT1 в формирование предрасположенности к раку шейки матки у женщин кыргызской национальности [Текст] / [Ж. Т. Исакова, В. Н. Кипень, М. А. Юсуфова и др.] // Вопросы онкологии. - Санкт-Петербург, 2022. - Том 68, № 6. - С. 805-813; То же: [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://voprosyonkologii.ru/index.php/journal/article/view/1515/1474>

Юсуфова Мөлтүр Анваровнанын «Кыргыз улутундагы аялдардын репродуктивдүү системасынын рак оорусунун өрчүшүндө биотрансформациялык гендердин ролу» деген темадагы 14.01.12 – онкология адистиги боюнча медицина илимдеринин кандидаты окумуштуулук даражасын изденип алуу үчүн жазылган диссертациясынын РЕЗЮМЕСИ

Негизги сөздөр: жатын моюнчасынын рагы, гендер, полиморфизм, глутатионтрансфераза

Изилдөөнүн максаты: Кыргыз улутундагы аялдардын жатын моюнчасынын рак оорусуна ийкемдүүлүктүн калыптанышына GSTM1, GSTP1, GSTT1 гендердин полиморфтук локустарынын салымын жана гендер аралык өз ара аракеттенүүсүн изилдедик.

Изилдөөнүн объектиси: Изилдөөгө кыргыз улутундагы 191 аял катышкан. Жатын моюнчасынын рак оорусунун морфологиялык такталган диагнозу менен кыргызстандык 95 аял жана 96 дени сак аял (контролдоо тобу).

Изилдөөнүн предмети: негизги жана контролдук топтордогу адамдардын демографиялык, клиникалык, морфологиялык, лабораториялык жана генетикалык өзгөчөлүктөрү. Изилдөө «учур/контроль» тиби боюнча жүргүзүлгөн. Изилдөөнүн бардык катышуучулары маалымдалган макулдук формасына кол коюшту.

Изилдөөнүн методдору: жалгыз нуклеотиддик полиморфизмдердин (SNP) генотиптештирүү rs1695 GSTP1 гени үчүн ПЧР-RFLP аркылуу аткарылган. GSTT1 жана GSTM1 гендеринде делециялык полиморфизмдери аллель-спецификалык ПЧРдин жардамы менен реалдуу убакытта аныкталган. MDR 3.0.2 программалык камсыздоону колдонуу менен жүргүзүлгөн ген аралык өз ара аракеттенүү анализи.

Алынган натыйжалар жана алардын илимий жаңылыгы: салыштыруу тобундагы аялдардын арасында GSTM1 ген аймагынын делециясы ЖМРдин ($OR = 2,02$, 95% ДИ 1,28-3,20), $p = 0,002$) өрчүү ыктымалдыгы менен байланышкан генетикалык маркер болуп саналат. Окшош натыйжалар GSTT1 гениндеги нөлдүк полиморфизм үчүн алынган - салыштыруу тобундагы аялдарда GSTT1 генинин аймагынын делециясы ($OR = 3,04$, 95% ДИ 2,00-4,64), $p = 2,0 \cdot 10^{-7}$) ЖМРдин өрчүү ыктымалдыгы менен байланышкан генетикалык маркер болуп саналат. Полиморфтук вариант p.Ile105Val (GSTP1 ген) анализи жатын моюнчасынын рагы менен ооруган бейтаптар менен салыштыруу тобунун аялдарынын ортосунда генотиптин же аллель жыштыктарынын бөлүштүрүлүшү боюнча статистикалык маанилүү айырмачылыктарды көрсөткөн эмес ($p > 0,05$). Кыргызстанда биринчи жолу GSTM1/rs366631, GSTP1/rs1695 жана GSTT1/rs17856199 полиморфизмдеринин жатын моюнчасынын рагынын генезисиндеги ролу аныкталган. Биринчи жолу изилденген полиморфизмдердин

шишиктин кээ бир клиникалык жана морфологиялык мүнөздөмөлөрү менен байланышы мүнөздөлгөн. Биринчи жолу кыргыз этникалык тобунда ЖМРдин өрчүшүнө белгиленген генотиптердин таасири аныкталды, аны натыйжасында оорунун алдын алуу жана эрте диагностикалоо үчүн колдонууга болот.

Колдонуу чөйрөсү: онкология

РЕЗЮМЕ

диссертации Юсуфовой Мөлтүр Анваровны на тему «Роль генов биотрансформации в развитии рака репродуктивной системы у женщин кыргызской национальности» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология

Ключевые слова: рак шейки матки, гены, полиморфизм, глутатион-трансфераза.

Цель: Изучение межгенных взаимодействий и вклад полиморфных локусов генов GSTM1, GSTP1, GSTT1 в формирование предрасположенности к раку шейки матки (РШМ) у женщин кыргызской национальности.

Объект исследования: В исследование включены 191 женщин кыргызской национальности. 95 женщин кыргызской национальности с морфологически верифицированным диагнозом рак шейки матки (группа случая) и 96 здоровых женщин (контрольная группа).

Предмет исследования: демографические, клинические, морфологические, лабораторные и генетические характеристики лиц в основной и контрольной группах. Исследование проведено по типу «случай/контроль». Все участники исследования подписали форму информированного согласия.

Методы исследования: генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) проводили с помощью ПЦР-RFLP для гена rs1695 GSTP1. Делеционные полиморфизмы в генах GSTT1 и GSTM1 определяли с помощью аллель-специфичной ПЦР в реальном времени. Анализ межгенных взаимодействий, проведенный с помощью программного обеспечения MDR 3.0.2.

Полученные результаты и их научная новизна: среди женщин в группе сравнения делеция области гена GSTM1 является генетическим маркером, ассоциированным с повышенной вероятностью развития РШМ (OR = 2,02, 95% ДИ 1,28-3,20), $p = 0,002$). Аналогичные результаты были получены для нулевого полиморфизма в гене GSTT1 - у женщин из группы сравнения делеция области гена GSTT1 является генетическим маркером, ассоциированным с повышенной вероятностью развития РШМ (OR = 3,04, 95% ДИ 2,00-4,64), $p = 2,0E-7$). Анализ полиморфного варианта p.Ile105Val (ген GSTP1) не выявил статистически значимых различий в распределении частот генотипов или аллелей между больными раком шейки матки и женщинами из группы сравнения ($p > 0,05$).

Впервые в Кыргызстане определена роль полиморфизмов *GSTM1*/rs366631, *GSTP1*/rs1695 и *GSTT1*/rs17856199 в генезе РШМ. Охарактеризована связь исследуемых полиморфизмов с некоторыми клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Определено влияние обозначенных генотипов на развитие РШМ в кыргызской этнической группе, что может быть впоследствии использовано для профилактики и ранней диагностики заболевания.

Область применения: онкология.

SUMMARY

of the dissertation of Iusufova Moltur Anvarovna on the topic "The role of biotransformation genes in the development of reproductive system cancer in kyrgyz women" for the degree of candidate of medical sciences, major 14.01.12 – oncology

Keywords: cervical cancer, genes, polymorphism, glutathione transferase.

Aim: the study of intergenic interactions and the contribution of polymorphic loci of the *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1* genes to the formation of a predisposition to cervical cancer in women of Kyrgyz nationality.

The object of the study: 191 women of Kyrgyz nationality were included in the study. 95 women of Kyrgyz nationality with a morphologically verified diagnosis of cervical cancer (case group) and 96 healthy women (control group).

The subject of the study: demographic, clinical, morphological, laboratory and genetic characteristics of individuals in the main and control groups. The study was conducted according to the "case/control" type. All study participants signed an informed consent form.

Material and methods: genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNP) was performed using PCR-RFLP for the rs1695 *GSTP1* gene. Deletion polymorphisms in the *GSTT1* and *GSTM1* genes were determined using real-time allele-specific PCR. The analysis of intergenic interactions carried out using the MDR 3.0.2 software.

The results obtained and their scientific novelty. Among women in the comparison group, deletion of the *GSTM1* gene region is a genetic marker associated with an increased likelihood of developing breast cancer (HR=2.02, 95% CI 1.28-3.20), $p=0.002$). Similar results were obtained for zero polymorphism in the *GSTT1* gene - in women from the comparison group, deletion of the *GSTT1* gene region is a genetic marker associated with an increased likelihood of developing breast cancer (HR = 3.04, 95% CI 2.00-4.64), $p = 2.0E-7$). Analysis of the polymorphic variant of p.Ile105Val (*GSTP1* gene) did not reveal statistically significant differences in the frequency distribution of genotypes or alleles between patients with cervical cancer and women from the comparison group ($p > 0.05$). For the first time in Kyrgyzstan, the role of polymorphisms *GSTM1*/rs366631, *GSTP1*/rs1695 and *GSTT1*/rs17856199 in

the genesis of breast cancer was determined. For the first time, the relationship of the studied polymorphisms with some clinical and morphological characteristics of the tumor was characterized. For the first time, the influence of the indicated genotypes on the development of breast cancer in the Kyrgyz ethnic group was determined, which can subsequently be used for the prevention and early diagnosis of the disease.

Scope of application: oncology.