

<https://doi.org/10.25207/1608-6228-2023-30-4-37-47>

УДК: 616.31-002.189



Клиническое значение патогенности соматических мутаций при лейкоплакии слизистой оболочки ротовой полости: проспективное наблюдательное исследование

Н.А. Карпук¹, С.П. Рубникович², И.В. Жильцов¹, О.Ч. Мазур³, И.Ю. Карпук¹, Е.П. Михаленко³

¹ Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», пр-т Фрунзе, д. 27, г. Витебск, 210009, Республика Беларусь

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», пр. Дзержинского, д. 83, г. Минск, 220116, Республика Беларусь

³ Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», ул. Академическая, д. 27, г. Минск, 220072, Республика Беларусь

АННОТАЦИЯ

Введение. Подавляющее большинство злокачественных новообразований слизистой оболочки ротовой полости приходится на плоскоклеточный рак. Плоскоклеточный рак слизистой оболочки ротовой полости развивается, как правило, в исходе предшествующих потенциально злокачественных заболеваний, ведущим из которых является лейкоплакия слизистой оболочки ротовой полости. **Цель исследования** — определить клиническое значение патогенности соматических мутаций при лейкоплакии слизистой оболочки ротовой полости. **Методы.** Материалом для исследования являлись 24 образца измененного эпителия слизистой оболочки ротовой полости пациентов с лейкоплакией. Для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из образцов использовали набор QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия). ДНК-секвенирование выполняли при помощи секвенатора Illumina Next Seq 550 с использованием набора реагентов Tru Sight™ Oncology 500 DNA Kit, For Use with NextSeq (Illumina, США). Все операции по экстракции ДНК из биологических образцов, подготовке ДНК-библиотек и их секвенированию выполняли пошагово в строгом соответствии с инструкциями, прилагаемыми к соответствующим наборам реагентов. Биоинформационный анализ был выполнен с использованием специализированного программного обеспечения Illumina Base Space (Illumina, США) и Galaxy Project (The Galaxy Community, некоммерческий международный проект) в соответствии с актуальными рекомендациями. Желаемая мощность исследования составила 90%. Для расчета необходимого размера выборки использовалась функция Sample Size Calculation программы Statistica 12 (StatSoft, Inc., США) (Two Proportions, Z test) с установленной опцией «односторонняя гипотеза» (1 tailed hypothesis), поскольку исходно предполагалось, что патогенные (онкогенные) генетические варианты встречаются в ткани лейкоплакий СОРП намного чаще, чем в референсном геноме человека, по которому производилось выравнивание рядов. **Результаты.** Выявленные в ходе настоящего исследования патогенные соматические мутации в генах TP53, KRAS, APC, NRAS и BRAF как поодиночке, так и в сочетаниях с высокой вероятностью (отношение рисков 3000–11 000) ассоциированы с развитием лейкоплакии слизистой оболочки ротовой полости с дисплазией эпителия 1-й степени. Множественность патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов, ассоциированных с дисплазией эпителия, а также то, что ряд вариантов имеет место не у всех пациентов, позволяет предположить, что один и тот же гистотип дисплазии слизистой оболочки ротовой полости может развиваться под воздействием различных мутаций. **Заключение.** Выявленные в настоящем исследовании патогенные и вероятно патогенные варианты генов TP53, KRAS, APC, NRAS и BRAF как поодиночке, так и в сочетаниях с высокой вероятностью (отношение рисков 3000–11 000) ассоциированы с развитием лейкоплакии с дисплазией эпителия 1-й степени.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК-секвенирование, соматические мутации, лейкоплакия, слизистая оболочка ротовой полости

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Карпук Н.А., Рубникович С.П., Жильцов И.В., Мазур О.Ч., Карпук И.Ю., Михаленко Е.П. Клиническое значение патогенности соматических мутаций при лейкоплакии слизистой оболочки ротовой полости. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2023;30(4):37–47. <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2023-30-4-37-47>

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: один из авторов — профессор, доктор медицинских наук Рубникович С.П. является членом редакционной коллегии журнала «Кубанский научный медицинский вестник». Авторам неизвестно о каком-либо другом потенциальном конфликте интересов, связанном с этой рукописью.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ: работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований Республики Беларусь «Установить спектр мутаций эпителия у пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки рта» (№ ГР 20200246 от 2.03.2020) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (№ ГР 20221321 от 1.08.2022).

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ: Проведение исследования было одобрено комитетом по этике клинических испытаний при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (пр-т Фрунзе, д. 27, г. Витебск, Республика Беларусь) протокол № 2 от 18.01.2019 г.

ВКЛАД АВТОРОВ: Н.А. Карпук, С.П. Рубникович, И.В. Жильцов., О.Ч. Мазур, И.Ю. Карпук, Е.П. Михаленко — разработка концепции и дизайна исследования; Н.А. Карпук, О.Ч. Мазур, И.Ю. Карпук, Е.П. Михаленко — сбор данных; Н.А. Карпук, С.П. Рубникович, И.В. Жильцов — анализ и интерпретация результатов; Н.А. Карпук, И.В. Жильцов, И.Ю. Карпук, Е.П. Михаленко — обзор литературы, проведение статистического анализа; Н.А. Карпук, О.Ч. Мазур — составление черновика рукописи и формирование его окончательного варианта; С.П. Рубникович, И.В. Жильцов, И.Ю. Карпук, Е.П. Михаленко — критический

© Карпук Н.А., Рубникович С.П., Жильцов И.В., Мазур О.Ч., Карпук И.Ю., Михаленко Е.П., 2023

пересмотр черновика рукописи с внесением ценного замечания интеллектуального содержания. Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой части работы.

✉ **КОРРЕСПОНДИРУЮЩИЙ АВТОР:** Карпук Наталья Анатольевна; e-mail: ikarpuk@mail.ru; пр-т Фрунзе, 27, г. Витебск, 210009, Республика Беларусь

Получена: 30.01.2023 / Получена после доработки: 22.05.2023 / Принята к публикации: 10.07.2023

Clinical Significance of Pathogenicity of Somatic Mutations in Oral Leukoplakia: a Prospective Observational Study

Natalia A. Karpuk¹, Sergey P. Rubnikovich², Ivan V. Zhyltsov¹, Oksana Ch. Mazur³,
Ivan Yu. Karpuk¹, Alena P. Mikhalenka³

¹Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Frunze Ave., 27, Vitebsk, 210009, the Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University, Dzerzhinskogo str., 83, Minsk, 220116, the Republic of Belarus

³Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, the Republic of Belarus

ABSTRACT

Background. The vast majority of malignant neoplasms of the oral mucosa refer to squamous cell carcinomas. The development of squamous cell carcinoma of the oral mucosa is often promoted by previous potentially malignant diseases, with oral leukoplakia dominating among them. **Objective.** To determine the clinical significance of the pathogenicity of somatic mutations in oral mucosal leukoplakia. **Methods.** The study material included 24 samples of abnormal epithelium of the oral mucosa from leukoplakia patients. QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Germany) was used for deoxyribonucleic acid (DNA) extraction from the samples. DNA sequencing was performed using IlluminaNextSeq 550 sequencer and TruSight™ Oncology 500 DNA Kit For Use with NextSeq (Illumina, USA). All DNA extractions from biological samples, preparation and sequencing of DNA libraries were performed step-by-step in strict accordance with the guidelines provided with the respective reagent kits. Bioinformatics analysis was carried out using specific software Illumina Base Space (Illumina, USA) and Galaxy Project (The Galaxy Community, a non-profit international project) according to current guidelines. The desired power of the study accounted for 90%. Two Proportions Z test was performed by means of The Sample Size Calculation of Statistica 12 (StatSoft, Inc.) with the set option “one-tailed hypothesis”, because it was initially assumed that pathogenic (oncogenic) genetic variants occur in the tissue of oral leukoplakia much more frequently than in the human reference genome used for sequence alignment. **Results.** The pathogenic somatic mutations in the *TP53*, *KRAS*, *APC*, *NRAs* and *BRAF* genes, identified in this study, alone or in combination, are highly likely (hazard ratio 3000-11000) to be associated with the development of oral mucosal leukoplakia and low-grade epithelial dysplasia. The multiplicity of pathogenic and likely pathogenic genetic variants associated with epithelial dysplasia, as well as the fact that a number of variants do not occur in all patients, suggests that the same histotype of oral mucosal dysplasia may develop under the influence of different mutations. **Conclusion.** The pathogenic and likely pathogenic variants of the *TP53*, *KRAS*, *APC*, *NRAS* and *BRAF* genes, identified in this study, alone or in combination, are highly likely (hazard ratio 3000–11000) to be associated with the development of leukoplakia and low-grade epithelial dysplasia.

KEYWORDS: DNA sequencing, somatic mutations, leukoplakia, oral mucosa

FOR CITATION: Karpuk N.A., Rubnikovich S.P., Zhyltsov I.V., Mazur O.Ch., Karpuk I.Yu., Mikhalenka A.P. Clinical significance of pathogenicity of somatic mutations in oral leukoplakia: a prospective observational study. *Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2023;30(4):37–47. <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2023-30-4-37-47>

CONFLICT OF INTEREST: one of the authors — Sergey P. Rubnikovich, Dr. Sci. (Med.), Prof., is a member of editorial board of *Kuban Scientific Medical Bulletin*. The authors are not aware of any other potential conflict of interest relating to this manuscript.

FUNDING. The study was carried out within the framework of the State Research Program of the Republic of Belarus “Determine the range of epithelial mutations in patients with oral mucosal leukoplakia” (No. GR 20200246 of March 2, 2020) and the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (No. GR 20221321 of August 1, 2022).

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS. The study was approved by the Ethics Committee for Clinical Trials of Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (27 Frunze Ave., Vitebsk, 210009, the Republic of Belarus), Minutes No. 2 of January 18, 2019.

AUTHOR CONTRIBUTIONS: N.A. Karpuk, S.P. Rubnikovich, I.V. Zhyltsov, O.Ch. Mazur, I.Yu. Karpuk, A.P. Mikhalenka — concept statement and scientific layout; N.A. Karpuk, O.Ch. Mazur, I.Yu. Karpuk, A.P. Mikhalenka — data collection; N.A. Karpuk, S.P. Rubnikovich, I.V. Zhyltsov — analysis and interpretation of the results; N.A. Karpuk, I.V. Zhyltsov, I.Yu. Karpuk, A.P. Mikhalenka — literature review, statistical analysis; N.A. Karpuk, O.Ch. Mazur — drafting the manuscript and preparing its final version; S.P. Rubnikovich, I.V. Zhyltsov, I.Yu. Karpuk, A.P. Mikhalenka — critical review of the manuscript with introduction of valuable intellectual content. All authors approved the final version of the paper before publication and assumed responsibility for all aspects of the work, which implies proper study and resolution of issues related to the accuracy and integrity of any part of the work.

✉ **CORRESPONDING AUTHOR:** Natalia A. Karpuk; e-mail: ikarpuk@mail.ru; 27 Frunze Ave., Vitebsk, 210009, the Republic of Belarus

Received: 30.01.2023 / Revised: 22.05.2023 / Accepted: 10.07.2023

ВВЕДЕНИЕ

Подавляющее большинство злокачественных новообразований слизистой оболочки ротовой полости (СОРП) приходится на плоскоклеточный рак. Плоскоклеточный рак СОРП развивается, как правило, в исходе предшествующих потенциально злокачественных заболеваний, ведущим из которых является лейкоплакия [1, 2].

В Республике Беларусь исследований молекулярно-генетических механизмов развития лейкоплакии слизистой оболочки ротовой полости (ЛСОРП) не проводилось. Можно предполагать, что существуют региональные особенности генетических вариантов, ассоциированных с развитием ЛСОРП. Знание подобных вариантов позволило бы разработать ПЦР- и NGS-тест-системы для выявления клинически значимых генетических вариантов. Имеющиеся крайне немногочисленные исследования показывают, что в клетках некоторых лейкоплакий были выявлены патогенные мутации гена *tp53*; они особенно часто обнаруживались при диспластических процессах эпителия и у лиц, курящих и злоупотребляющих алкоголем [3, 4]. Есть указания на то, что количество одновременно выявляемых при ЛСОРП мутаций гена *tp53* напрямую связано со степенью эпителиальной дисплазии, ввиду чего подобные мутации являются ранними событиями канцерогенеза СОРП [5, 6]. Существуют также свидетельства возможной роли мутаций гена *NOTCH1* в патогенезе злокачественного перерождения оральных лейкоплакий. Указанные мутации, по данным авторов, обнаруживаются в 60% случаев предраковых заболеваний эпителия СОРП [6–8]. Общая частота злокачественной трансформации ЛСОРП составляет 3,5%, однако в различных исследованиях, включенных в обзор, она варьировала от 0,13 до 34% [9].

Таким образом, ЛСОРП с метаплазией эпителия, являясь предраковыми заболеваниями, представляют большой интерес для здравоохранения ввиду необходимости оценки вероятности их злокачественной трансформации, вследствие чего исследования молекулярно-генетических механизмов формирования лейкоплакий СОРП остаются актуальными.

Цель исследования — определить клиническое значение патогенности соматических мутаций при лейкоплакии слизистой оболочки ротовой полости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проспективное, основанное на наблюдении, поперечное (cross-sectional), без контрольной группы, 24 образца ткани с пораженного участка слизистой оболочки ротовой полости пациентов с морфологически верифицированным диагнозом лейкоплакии слизистой оболочки полости рта с дисплазией эпителия 1-й степени (15 мужчин, 9 женщин).

Условия проведения исследования

Забор ткани слизистой оболочки ротовой полости производился на приеме стоматолога в учреждении здравоохранения «Витебский областной клинический стоматологический центр». Генетическое исследование полученного биологического материала осуществлялось на базе Центра

коллективного пользования «Геном» Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси с привлечением высококвалифицированных специалистов из лаборатории молекулярной генетики, лаборатории генетики человека и группы биоинформатики данного государственного научного учреждения. Сроки проведения исследования: с апреля 2020 по декабрь 2022 г.

Критерии соответствия

Критерии включения

Пациенты любого пола 18 лет и старше с морфологически верифицированным диагнозом ЛСОРП с плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазией эпителия 1-й степени, подписавшие информированное согласие об участии в исследовании.

Критерии невключения

Пациенты моложе 18 лет, беременные женщины, пациенты с тяжелым течением либо декомпенсацией сопутствующих соматических заболеваний, а также пациенты, отказавшиеся подписать информированное согласие об участии в исследовании.

Критерии исключения

Изменение диагноза, выявление беременности либо развитие декомпенсации одного или нескольких сопутствующих соматических заболеваний у пациентов из сформированной выборки, произошедшее в ходе исследования.

Описание критериев соответствия (диагностические критерии)

Диагностические критерии для пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки ротовой полости с плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазией эпителия 1-й степени: основной морфологический элемент — бляшка серовато-белого цвета с четкими краями, перламутровым блеском на видимо не измененной СОРП, которая представляет собой неравномерное помутнение эпителия; не выступает над уровнем окружающих участков СОРП; не снимается при поскабливании; слизистая оболочка на участках поражения берется в складку; гистологически — явления гиперкератоза, слабо выраженного акантоза, атипичная трансформация плоскоклеточного эпителия, затрагивающая не более трети его толщины; при люминесцентном исследовании — голубое свечение участка поражения; при оптической когерентной томографии (ОКТ-исследовании) изображение слоистое, дифференцируются два горизонтально ориентированных слоя.

Подбор участников в группы

В ходе исследования было отобрано 24 образца ткани слизистой оболочки ротовой полости с пораженного участка пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки ротовой полости.

Целевые показатели исследования

Основной показатель исследования

Количество найденных патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов, ассоциированных с развитием ЛСОРП с плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазией эпителия 1-й степени.

Дополнительные показатели исследования

Настоящим исследованием не предусмотрены.

Методы измерения целевых показателей

Лабораторные методы исследования

Выделение ДНК из биопсийного материала слизистой оболочки ротовой полости и крови, секвенирование ДНК

Для выделения ДНК использовали набор QIAamp DNA FFPE TissueKit (Qiagen, Германия). Все операции по экстракции ДНК из биологических образцов и подготовке ДНК-библиотек к секвенированию выполняли пошагово в строгом соответствии с инструкциями по применению, прилагаемыми производителем (QIAGEN, Германия) к набору реагентов для экстракции ДНК QIAamp DNA FFPE TissueKit¹. Таргетное ДНК-секвенирование выполняли при помощи высокопроизводительного секвенатора Illumina NextSeq 550 с применением набора реагентов для таргетного секвенирования TruSight™ Oncology 500 DNA Kit, For Use with NextSeq (48 samples), который позволяет устанавливать первичные нуклеотидные последовательности 523 генов, ассоциированных с канцерогенезом. Процедура секвенирования выполнялась пошагово в строгом соответствии с инструкцией, прилагаемой производителем к набору реагентов TruSight™ Oncology 500 DNA Kit, For Use with NextSeq (48 samples) (Illumina, Inc., США)².

Выполнение биопсии СОРП

Перед проведением биопсии проводили инфильтрационную анестезию препаратами артикаина гидрохлорид (40 мг/1 мл) + эпинефрин (0,005 мг/1 мл), вводя 0,3–1 мл анестетика под неизменную слизистую оболочку на расстоянии 2–3 мм от элемента поражения на глубину приблизительно 2 мм, и продвигали иглу под элементом поражения под слизистой оболочкой на протяжении 5 мм, приподнимая за счет давления анестетика пораженного участка СОРП на 1–3 мм. Иссечение участка СОРП осуществляли скальпелем двумя сходящимися полуовальными разрезами. Размер биоптата зависел от размера очага поражения. При невозможности получения полноценного биоптата пациента исключали из исследования. Биоптат СОРП делили на две равные части, одну из которых погружали в 10% забуференный формалин (для получения гистологических и иммуногистохимических препаратов), а вторую переносили в пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл, заполненную буфером-стабилизатором нуклеиновых кислот VXL (Qiagen, Германия), инактивирующим нуклеазы, после чего транспортировали в молекулярно-генетическую лабораторию для экстракции ДНК. Послеоперационная рана промывалась раствором антисептика, накладывались 2–3 отдельных узловых шва.

Биоинформационный анализ

Биоинформационный анализ результатов ДНК-секвенирования был выполнен с использованием специализированных комплексов программного обеспечения Illumi-

na Base Space (Illumina, Inc., США) и Galaxy Project (The Galaxy Community, некоммерческий международный проект) и в соответствии с актуальными методическими рекомендациями [10–12].

Переменные (предикторы, конфаундеры, модификаторы эффекта)

Единственными предикторами развития ЛСОРП, изучаемыми в настоящем исследовании, являются патогенные и вероятно патогенные соматические генетические варианты, выявляемые в ткани пациентов с ЛСОРП. Модификаторами эффекта могут являться патогенные варианты регуляторных генов, а также эпигенетические модификации генов (например, их метилирование), не учитываемые в данном исследовании. Также модификатором эффекта может являться наличие у пациента нескольких патогенных вариантов генов одновременно. Конфаундерами в данном исследовании могут являться неучтенные внешние воздействия (например, действие вируса папилломы человека или привычка курить трубку), которые могут вызывать злокачественную трансформацию клеток эпителия без образования патогенных вариантов генов, в частности путем их эпигенетических модификаций либо повреждения регуляторных генов.

Статистические процедуры

Принципы расчета размера выборки

Расчет должного размера выборки производился исходя из стандартного для биомедицинских исследований уровня вероятности ошибки I рода (α) $\leq 0,05$. Желаемая мощность исследования составила 90%. Мы также исходили из предположения, что патогенные генетические варианты, ассоциированные с развитием неоплазм, встречаются в клетках патологически измененных тканей. Указанные варианты должны встречаться не реже чем в 30% образцов. Для расчета необходимого размера выборки использовалась функция Sample Size Calculation программы Statistica 12 (StatSoft, Inc., США) (Two Proportions, Z-test) с установленной опцией «односторонняя гипотеза» (1-tailed hypothesis), поскольку исходно предполагалось, что патогенные (онкогенные) генетические варианты встречаются в ткани лейкоплакий СОРП намного чаще, чем в референсном геноме человека, по которому производилось выравнивание рядов. Подсчитанный таким образом размер выборки составил 23 пациента; он был увеличен до 24 человек, так как такой размер выборки лучше соответствовал возможностям использованного нами набора реагентов для таргетного секвенирования TruSight™ Oncology 500 DNA Kit, For Use with NextSeq (48 samples).

Статистические методы

Статистическая обработка данных выполнялась при помощи специализированных программных пакетов Statistica (версия 12) (StatSoft, Inc., США) и Med Calc (версия 18.9.1) (Med Calc Software Ltd, Бельгия). Центральная

¹ QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook (February 2020). Available: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-ffpe-tissue-kit>

² Illumina TruSight Oncology 500 Reference Guide. Available: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/trusight/oncology-500/trusight-oncology-500-reference-guide-1000000067621_07.pdf

тенденция и разброс значений анализируемых количественных показателей описывались в виде медианно-квартильных характеристик: медианы, 25-го и 75-го квартилей. Сравнение категориальных переменных выполнялось с использованием критерия χ^2 и точного теста Фишера, выявление статистической значимости различий количественных признаков производилось при помощи U -теста Манна — Уитни. Для выявления генетических вариантов, статистически значимо ассоциированных с развитием плоскоклеточного рака СОР, использовался корреляционный анализ Спирмена, а также логистический регрессионный анализ. В регрессионный анализ включались показатели с уровнем значимости $p < 0,1$. Для оценки влияния отдельных генетических вариантов на вероятность развития изучаемой патологии рассчитывались отношения шансов (ОШ) и отношения рисков (ОР), а также их 95% доверительные интервалы (ДИ). Во всех случаях выявленные закономерности считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$, при этом оптимальным уровнем значимости, общепризнанным среди биоинформатиков и однозначно указывающим на наличие взаимосвязи между генетическим вариантом и фенотипом, являлся $p \leq 5 \times 10^{-8}$ [13, 14].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Формирование выборки исследования

В выборку включались пациенты с установленными и подтвержденными диагнозами ЛСОПП с плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазией эпителия 1-й степени, обращавшиеся за медицинской помощью в учреждение здравоохранения «Витебский областной клинический стоматологический центр». Включение пациентов осуществлялось в порядке их обращения при соответствии критериям включения и отсутствии критериев невключения, без каких-либо дополнительных условий. Блок-схема дизайна исследования представлена на рисунке.

Характеристики выборки (групп) исследования

Всего в исследование были включены 24 пациента с морфологически верифицированным диагнозом лейкоплакии слизистой оболочки полости рта с плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазией эпителия 1-й степени (15 мужчин, 9 женщин). Средний возраст пациентов составил 59 лет (min — 42 года, max — 72 года, 95% ДИ: 57–65 лет).

Основные результаты исследования

Оценка качества выполнения таргетного секвенирования

Доля оснований GC в распознанных генетических последовательностях колеблется от 50 до 56%, составляя в среднем 52,5%; средняя длина ридов ≈ 108 оснований, что соответствует возможностям прибора Illumina NextSeq 550 и особенностям использованной тест-системы Tru Sight™ Oncology 500 DNA Kit, For Use with NextSeq (48 samples); медиана покрытия нуклеотидных последовательностей прочтениями составляет 462X, среднее покрытие — 584,4X, доля успешно выровненных нуклеотидных последовательностей от общего объема

сиквенса — 100%. С учетом того что целью настоящего исследования являлось выявление соматических мутаций, для надежного их обнаружения необходимо избыточное покрытие нуклеотидных последовательностей прочтениями (минимально достаточное — 300X, оптимальное — не менее 500X); видно, что в ходе секвенирования были достигнуты оптимальные показатели кратности покрытия нуклеотидных последовательностей прочтениями.

Средняя доля нуклеотидных последовательностей, прочитанных хотя бы 1 раз, составляет 99,7%, ≥ 5 раз — 99,5%,

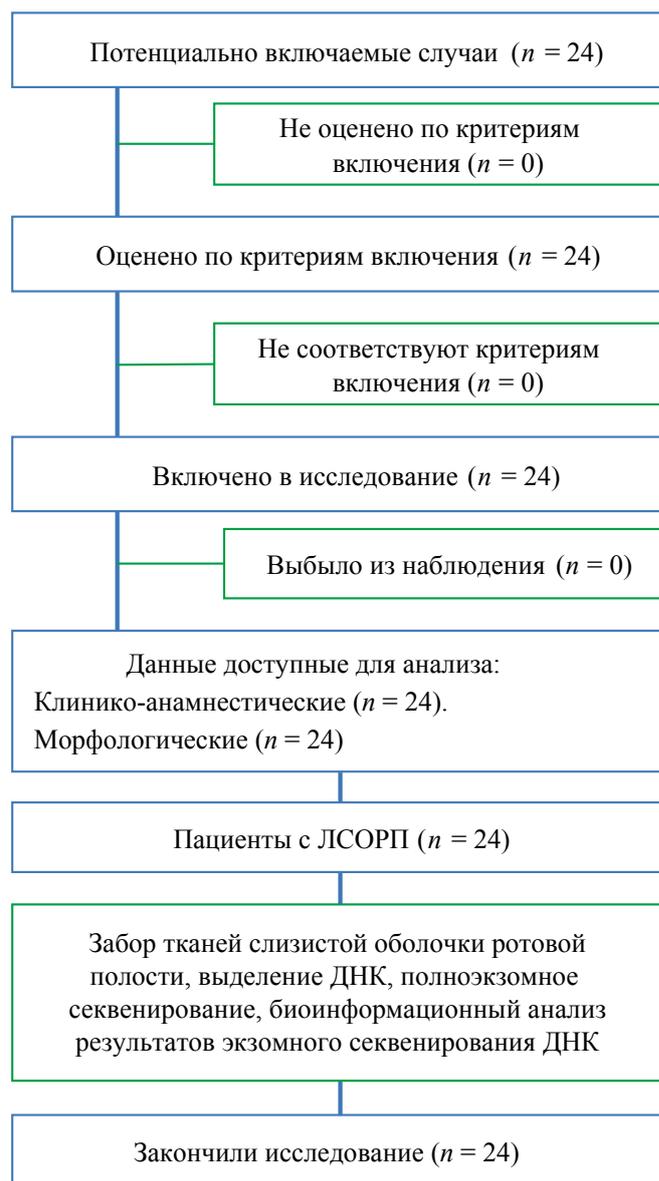


Рис. Блок-схема дизайна проведенного исследования
Примечание: блок-схема выполнена авторами (согласно рекомендациям STROBE). Сокращения: ЛСОПП — лейкоплакия слизистой оболочки ротовой полости; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

Fig. Schematic diagram of the scientific layout
Note: performed by the authors (according to STROBE recommendations). Abbreviations: ЛСОПП — oral mucosal leukoplakia; ДНК — deoxyribonucleic acid.

≥ 10 раз — 99,2%, ≥ 30 раз — 97,6%, ≥ 50 раз — 95,6%. Важным показателем качества таргетного секвенирования является средняя доля нуклеотидных последовательностей, прочитанных 30 и более раз — она должна быть не ниже 95% [14]. В нашем случае указанный показатель равен 97,6%, что свидетельствует о достаточно высоком качестве полученных нами результатов таргетного секвенирования.

Результаты биоинформационного анализа данных таргетного секвенирования образцов ткани пациентов с ЛСОРП

В ходе биоинформационного анализа результатов таргетного секвенирования 24 образцов тканей ЛСОРП с плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазией эпителия 1-й степени нами было выявлено 2439 видов генетических вариантов. Из них 13 разновидностей генетических вариантов (0,53%) являлись патогенными или вероятно патогенными; еще 1280 генетических вариантов (52,48%) имели неопределенное клиническое значение; наконец, оставшиеся 1146 генетических вариантов (46,99%) были доброкачественными.

Выявленные патогенные и вероятно патогенные генетические варианты перечислены и охарактеризованы в таблице 1.

Генетические варианты, расцененные как патогенные и вероятно патогенные, затрагивают в первую очередь гены, ответственные за реализацию различных сигнальных путей, регуляцию процессов транскрипции и клеточного апоптоза. При этом общее количество патогенных и вероятно патогенных соматических мутаций всех типов, выявленных в образцах тканей ЛСОРП, отобранных у пациентов из изученной выборки, составило всего 24. Так, у 6 пациентов не было выявлено ни одного патогенного генетического варианта, у 15 пациентов было выявлено по 1 патогенному генетическому варианту и у 3 пациентов имелось по 2 патогенных генетических варианта (медиана — 1). Факт отсутствия патогенных соматических мутаций в части образцов тканей ЛСОРП можно объяснить как случайностью (например, в конкретном образце преобладали нормальные клетки с неизменным генотипом, в частности, интактные эпителиальные клетки), так и особенностями использованного для таргетного секвенирования набора реагентов. Как указывалось ранее, набор Tru Sight™ Oncology 500 DNAKit, For Use with NextSeq (48 samples) предназначен для секвенирования 523 генов, которые, по данным ранее проведенных исследований, ассоциированы с патогенезом различных злокачественных новообразований.

Тем не менее нельзя исключить вероятность того, что соматические мутации, ответственные за формирование дисплазии эпителия при ЛСОРП, могут располагаться в каких-либо иных генах, которые не могли быть секвенированы с использованием вышеупомянутого набора. Помимо этого, ЛСОРП, будучи доброкачественными образованиями, теоретически могут формироваться под влиянием различных *эпигенетических факторов*, в частности, инактивации генов без нарушения их целост-

ности (например, путем прямого метилирования ДНК либо подавления трансляции вследствие взаимодействия иРНК с микроРНК), альтернативного сплайсинга либо посттрансляционных модификаций белков, что не представлялось возможным проверить в рамках настоящего исследования.

С целью увеличения числа потенциальных патогенных генетических вариантов нами был проведен поиск в базе данных ClinVar, содержащей сведения о выявленных ассоциациях между какими-либо генетическими вариантами и различными заболеваниями [15, 16], и было вручную отобрано еще 14 генетических вариантов с неопределенной патогенностью, про которые имелась информация, что они могут быть связаны с развитием каких-либо онкологических заболеваний. Указанные генетические варианты перечислены и охарактеризованы в таблице 2.

Даже с учетом 14 дополнительных генетических вариантов у 4 пациентов не было выявлено никаких патогенных и вероятно патогенных соматических мутаций — по крайней мере, в 523 генах, секвенирование которых может быть выполнено с использованием набора реагентов Tru Sight™ Oncology 500 DNAKit, For Use with NextSeq (48 samples).

В таблице 3 приведена информация о частоте встречаемости отобранных нами патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов в человеческой популяции по данным gnomAD, а также отношения шансов (ОШ) и рисков (ОР), указывающие на возможную взаимосвязь отдельных соматических мутаций с развитием лейкоплакии СОР.

Как следует из таблицы 3, варианты генов *ALK* и *MET*, выявленные в настоящем исследовании, встречаются в популяции очень часто (это особенно справедливо для варианта g.29193615T>C гена *MET*, которая встречается у трети населения земного шара, ввиду чего с очень высокой вероятностью является доброкачественной), вследствие чего разница между частотами их встречаемости в изученной выборке пациентов с ЛСОРП и в генеральной совокупности статистически незначима; соответственно, данные генетические варианты не могут быть ассоциированы с ЛСОРП.

Напротив, выявленные в нашем исследовании генетические варианты генов *TP53* ($n = 11$), *KRAS* ($n = 10$), *APC* ($n = 3$), *NRAS* ($n = 2$) и *BRAF* ($n = 2$) очень редко (тысячные доли процента) встречаются в человеческой популяции, ввиду чего частоты их встречаемости в изученной выборке в тысячи и десятки тысяч раз превышают таковые в генеральной совокупности, причем указанная разница статистически значима. Таким образом, можно с высокой вероятностью предположить, что выявленные в ходе настоящего исследования соматические мутации в генах *TP53*, *KRAS*, *APC*, *NRAS* и *BRAF* как поодиночке, так и в сочетаниях ассоциированы с развитием дисплазии при ЛСОРП.

Дополнительные результаты исследования

Все результаты, полученные в ходе исследования, были изложены в предыдущих разделах.

Таблица 1. Патогенные и вероятно патогенные генетические варианты, выявленные в образцах тканей пациентов с ЛСОП

Table 1. Pathogenic and likely pathogenic genetic variants identified in the tissue samples from patients with oral mucosal leukoplakia

Ген	Тип мутации, ее хромосомная локализация	Последствия мутации
KRAS proto-oncogene, GTPase (<i>KRAS</i>)	МНП 12:g.25245347C>T	Миссенс: p.Gly13Asp
	МНП 12:g.25245350C>T	Миссенс: p.Gly12Asp
	МНП 12:g.25245350C>A	Миссенс: p.Gly12Val
	МНП 12:g.25245351C>A	Миссенс: p.Gly12Cys
	МНП 12:g.25245284G>T	Миссенс: p.Pro34Gln
NRAS proto-oncogene, GTPase (<i>NRAS</i>)	МНП 1:g.114716126C>T	Миссенс: p.Gly12Asp
B-Raf proto-oncogene, serine/ threonine kinase (<i>BRAF</i>)	МНП 7:g.140753336A>T	Миссенс: p.Val640Glu
Tumor protein p53 (<i>TP53</i>)	МНП 17:g.7673803G>A	Миссенс: p.Arg273Cys
	МНП 17:g.7675088C>T	Миссенс: p.Arg175His
	МНП 17:g.7674220C>T	Миссенс: p.Arg248Gln
Catenin beta 1 (<i>CTNNB1</i>)	МНП 3:g.41224633A>G	Миссенс: p.Thr41Ala
ASXL transcriptional regulator 1 (<i>ASXL1</i>)	Делеция 20:g.32433361TC>T	Сдвиг рамки чтения: p.Pro389GlnfsTer73
	МНП 20:g.32433573G>T	Миссенс: p.Ala459Ser

Примечания: таблица составлена авторами. 1. МНП — мононуклеотидный полиморфизм. 2. Тип мутации обозначен как «номер хромосомы: номер позиции нуклеотида в геноме по номенклатуре HUGO, соответствующей началу генетического варианта: вид нуклеотидной замены или сдвига». 3. Изменения в белковых продуктах соответствующих генов вследствие мононуклеотидных полиморфизмов обозначены как «исходная аминокислота: номер позиции этой аминокислоты в белковой молекуле: аминокислота, заменившая исходную».

Notes: compiled by the authors. 1. МНП — single nucleotide polymorphism; 2. Type of mutation is designated as “chromosome number: nucleotide position in the genome according to HUGO nomenclature corresponding to the beginning of the genetic variant: type of nucleotide substitution or shift”; 3. Changes in protein products of corresponding genes due to single nucleotide polymorphisms are designated as “initial amino acid: position of this amino acid in the protein molecule: amino acid that substituted the initial one”.

ОБСУЖДЕНИЕ

Резюме основного результата исследования

Можно с высокой вероятностью предположить, что выявленные в ходе настоящего исследования соматические мутации в генах *TP53*, *KRAS*, *APC*, *NRAS* и *BRAF* как поодиночке, так и в сочетаниях ассоциированы с развитием лейкоплакий СОР.

Множественность патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов, ассоциированных с дисплазией эпителия, а также то, что ряд вариантов имеет место не у всех пациентов в изученной выборке, позволяет предположить, что один и тот же гистотип дисплазии СОРП может развиваться под воздействием различных приобретенных патогенных мутаций, каковой феномен уже был

описан многими исследователями для ряда других онкологических заболеваний [16–18].

Обращает на себя внимание, что гены *TP53*, *KRAS*, *APC*, *NRAS* и *BRAF* отвечают за реализацию различных сигнальных путей, регуляцию процессов транскрипции и клеточного апоптоза; так, например, ген *TP53* — ключевое звено сигнального пути p53, ответственного за регуляцию клеточного цикла. Соответственно, нарушения транскрипции и/или трансляции данных генов вследствие соматических мутаций могут лежать в основе онкогенеза.

Ограничения исследования

Невозможность существенно увеличить размер изученной выборки пациентов ввиду высокой стоимости исследования, из-за чего выявленные взаимосвязи между

Таблица 2. Генетические варианты с неопределенной патогенностью, выявленные при секвенировании образцов тканей ЛСОП, которые могут быть ассоциированы с развитием дисплазии эпителия
 Table 2. Genetic variants with uncertain pathogenicity identified by sequencing of oral leukoplakia tissue samples that may be associated with the development of epithelial dysplasia

Ген	Тип мутации, ее хромосомная локализация	Последствия мутации
Tumor protein p53 (<i>TP53</i>)	МНП 17:g.7675085C>A	Миссенс p.Cys176Phe
	МНП 17:g.7673704G>A	Стоп-кодон p.Arg306Ter
	Делеция 17:g.7673717TG>T	Сдвиг рамки чтения p.Pro301GlnfsTer44
	МНП 17:g.7670685G>A	Стоп-кодон p.Arg342Ter
	МНП 17:g.7674894G>A	Стоп-кодон p.Arg213Ter
	МНП 17:g.7673824C>T	Миссенс p.Gly266Arg
APC Regulator of WNT Signaling Pathway (<i>APC</i>)	МНП 5:g.112839606C>T	Стоп-кодон p.Gln1338Ter
	МНП 5:g.112828889C>T	Стоп-кодон p.Arg554Ter
	МНП 5:g.112839942C>T	Стоп-кодон p.Arg1450Ter
Phosphatase and tensin homolog (<i>PTEN</i>)	МНП 10:g.87952142C>T	Миссенс p.Arg173Cys
MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase (<i>MET</i>)	МНП 7:g.116771936C>T	Миссенс p.Thr992Ile
ALK receptor tyrosine kinase (<i>ALK</i>)	МНП 2:g.29193615T>C	Миссенс p.Lys1491Arg
NRAS proto-oncogene, GTPase (<i>NRAS</i>)	МНП 1:g.114713908T>A	Миссенс p.Gln61Leu
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (<i>PIK3CA</i>)	МНП 3:g.179234302G>C	Миссенс p.Gly1049Arg

Примечания: таблица составлена авторами. 1. МНП — мононуклеотидный полиморфизм. 2. Тип мутации обозначен как «номер хромосомы: номер позиции нуклеотида в геноме по номенклатуре HUGO, соответствующей началу генетического варианта: вид нуклеотидной замены или сдвига». 3. Изменения в белковых продуктах соответствующих генов вследствие мононуклеотидных полиморфизмов обозначены как «исходная аминокислота: номер позиции этой аминокислоты в белковой молекуле: аминокислота, заменившая исходную».

Notes: compiled by the authors. 1. MNP — single nucleotide polymorphism; 2. Type of mutation is designated as “chromosome number: nucleotide position in the genome according to HUGO nomenclature corresponding to the beginning of the genetic variant: type of nucleotide substitution or shift”; 3. Changes in protein products of corresponding genes due to single nucleotide polymorphisms are designated as “initial amino acid: position of this amino acid in the protein molecule: amino acid that substituted the initial one”.

патогенными генетическими вариантами соматических мутаций и развитием ЛСОП могут носить неоднозначный характер. В настоящем исследовании не изучались патогенные варианты регуляторных генов, а также эпигенетические модификации генов на всех уровнях, что исключает анализ влияния указанных феноменов на развитие ЛСОП. Высокая стоимость таргетного секвенирования и сложность биоинформационного анализа полученных данных ограничивают применение использованного метода исследования в клинической практике даже при выявлении однозначных ассоциаций между определенными патогенными вариантами генов и развитием дисплазии при ЛСОП.

Интерпретация результатов исследования

Качество выполненного нами таргетного секвенирования образцов ДНК, выделенных из патологически измененных тканей лейкоплакий СОП, достаточно высоко для уверенного выявления соматических мутаций, встречающихся в $\leq 10\%$ клеток анализируемого образца, что удовлетворяет цели и задачам настоящего исследования.

Количество выявленных у пациентов с ЛСОП вариантов соматических мутаций генов по сравнению с референсным геномом человека весьма велико, но, вероятно, большая часть этих вариантов относится к доброкачественным и не влияет на развитие изучаемых заболеваний.

Таблица 3. Сравнительная частота встречаемости патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов, выявленных в выборке пациентов с ЛСОПИ и в человеческой популяции в целом

Table 3. Comparative frequency of pathogenic and likely pathogenic genetic variants identified in the cohort of patients with oral leukoplakia and in the general human population

Ген	Тип мутации	Частота gnomAD, %	Частота в выборке, n (%)	ОР (95% ДИ) ОШ (95% ДИ)
<i>KRAS</i>	12:g.25245347C>T (p.Gly13Asp)	Нет данных	1 (4,17)	–
	12:g.25245350C>T (p.Gly12Asp)	0,0004	3 (12,50)	9519 (1026–88 314) 10 879 (1087–108 869)
	12:g.25245350C>A (p.Gly12Val)	Нет данных	4 (16,67)	–
	12:g.25245351C>A (p.Gly12Cys)	Нет данных	1 (4,17)	–
	12:g.25245284G>T (p.Pro34Gln)	Нет данных	1 (4,17)	–
<i>TP53</i>	17:g.7673803G>A (p.Arg273Cys)	0,0012	2 (8,33)	6346 (595–67 680) 6923 (605–79 161)
	17:g.7675088C>T (p.Arg175His)	0,0004	2 (8,33)	6346 (595–67 680) 6923 (605–79 161)
	17:g.7674220C>T (p.Arg248Gln)	0,00119	1 (4,17)	3173 (204–49 281) 3311 (201–54 550)
	17:g.7673704G>A (p.Arg306Ter)	Нет данных	1 (4,17)	–
	17:g.7673717TG>T (p.Pro301GlnfsTer44)	Нет данных	1 (4,17)	–
	17:g.7670685G>A (p.Arg342Ter)	Нет данных	1 (4,17)	–
	17:g.7674894G>A (p.Arg213Ter)	Нет данных	1 (4,17)	–
	17:g.7673824C>T (p.Gly266Arg)	Нет данных	1 (4,17)	–
	17:g.7675085C>A (p.Cys176Phe)	0,0004	1 (4,17)	3173 (204–49 281) 3311 (201–54 550)
<i>APC</i>	5:g.112839606C>T (p.Gln1338Ter)	0,0004	1 (4,17)	3173 (204–49 281) 3311 (201–54 550)
	5:g.112828889C>T (p.Arg554Ter)	Нет данных	1 (4,17)	–
	5:g.112839942C>T (p.Arg1450Ter)	Нет данных	1 (4,17)	–
<i>ASXL1</i>	20:g.32433361TC>T (p.Pro389GlnfsTer73)	Нет данных	1 (4,17)	–
	20:g.32433573G>T (p.Ala459Ser)	Нет данных	1 (4,17)	–
<i>NRAS</i>	1:g.114716126C>T (p.Gly12Asp)	0,0008	1 (4,17)	3173 (204–49 281) 3311 (201–54 550)
	1:g.114713908T>A (p.Gln61Leu)	Нет данных	1 (4,17)	–
<i>BRAF</i>	7:g.140753336A>T (p.Val640Glu)	0,0004	2 (8,33)	6346 (595–67 680) 6923 (605–79 161)
<i>ALK</i>	2:g.29193615T>C (p.Lys1491Arg)	27,9	1 (4,17)	0,15 (0,022–1,017)* 0,11 (0,015–0,83)
<i>CTNNB1</i>	3:g.41224633A>G (p.Thr41Ala)	Нет данных	1 (4,17)	–

Таблица 3. Продолжение
Table 3. Continuation

Ген	Тип мутации	Частота gnomAD, %	Частота в выборке, n (%)	ОР (95% ДИ) ОШ (95% ДИ)
<i>MET</i>	7:g.116771936C>T (p.Thr992Ile)	0,7891	1 (4,17)	5,28 (0,77–36,03)* 5,47 (0,74–40,54)*
<i>PIK3CA</i>	3:g.179234302G>C (p.Gly1049Arg)	Нет данных	1 (4,17)	–
<i>PTEN</i>	10:g.87952142C>T (p.Arg173Cys)	Нет данных	1 (4,17)	–

Примечания: таблица составлена авторами. 1. ОР — отношение рисков, ОШ — отношение шансов, «нет данных» — сведения о частоте данной мутации в человеческой популяции в базе данных gnomAD отсутствуют (т. е. ОР и ОШ рассчитать невозможно). 2. * — показатель статистически незначим (диапазон значений доверительного интервала включает в себя 1).

Notes: compiled by the authors; 1. OR — hazard ratio, OSH — odds ratio, «нет данных» — information on the frequency of this mutation in the human population is not available in the gnomAD database (i.e., hazard and odds ratio cannot be calculated); 2. * — the indicator is statistically insignificant (the range of confidence interval values includes 1).

Тем не менее выявленные в ходе настоящего исследования патогенные и вероятно патогенные варианты генов *TP53*, *KRAS*, *APC*, *NRAS* и *BRAF* как поодиночке, так и в сочетаниях с высокой вероятностью ассоциированы с лейкоплакиями СОР с плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазией эпителия 1-й степени. В первую очередь это касается патогенных и вероятно патогенных вариантов генов *KRAS* и *TP53* ввиду наличия большого разнообразия указанных вариантов, а также их значительной распространенности в изученной выборке пациентов с ЛСОРП.

Взаимосвязь патогенных генетических вариантов именно генов *TP53*, *KRAS*, *APC*, *NRAS* и *BRAF* с развитием плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазии эпителия 1-й степени неслучайна: данные гены отвечают за реализацию различных сигнальных путей, участвующих в обновлении и дифференцировке эпителия, регуляции процессов транскрипции и клеточного апоптоза. Соответственно повреждение указанных генов может являться триггерным

фактором как для развития кератоза и дисплазии, так и для злокачественного перерождения эпителиоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные в настоящем исследовании патогенные и вероятно патогенные варианты генов:

TP53 (17:g.7673803G>A, 17:g.7675088C>T, 17:g.7674220C>T, 17:g.7675085C>A, 17:g.7673704G>A, 17:g.7673717TG>T, 17:g.7670685G>A, 17:g.7674894G>A, 17:g.7673824C>T);
KRAS (12:g.25245347C>T, 12:g.25245350C>T, 12:g.25245350C>A, 12:g.25245351C>A, 12:g.25245284G>T),
APC (5:g.112839606C>T, 5:g.112828889C>T, 5:g.112839942C>T);
NRAS (1:g.114716126C>T, 1:g.114713908T>A) и *BRAF* (7:g.140753336A>T) как поодиночке, так и в сочетаниях с высокой вероятностью (ОР 3000–11 000) ассоциированы с развитием ЛСОРП с дисплазией эпителия 1-й степени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Kalavrezos N, Scully C. Mouth Cancer for Clinicians. Part 1: Cancer. *Dent Update*. 2015;42(3):250–252, 255–256, 259–260. <https://doi.org/10.12968/denu.2015.42.3.250>
- van der Waal I. Oral leukoplakia, the ongoing discussion on definition and terminology. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20(6):e685–e692. <https://doi.org/10.4317/medoral.21007>
- Scheifele C, Schlechte H, Bethke G, Reichart PA. Nachweis von TP53-Mutationen mittels Exfoliativzytologie (brush biopsy) oraler Leukoplakien [Detection of TP53-mutations in brush biopsies from oral leukoplakias]. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 2002;6(6):410–414. German. <https://doi.org/10.1007/s10006-002-0425-0>
- Ogmundsdóttir HM, Hilmarsdóttir H, Björnsson J, Holbrook WP. Longitudinal study of TP53 mutations in eight patients with potentially malignant oral mucosal disorders. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(9):716–721. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2009.00767.x>
- Suwasini S, Chatterjee K, Purkait SK, Samaddar D, Chatterjee A, Kumar M. Expression of P53 Protein and Ki-67 Antigen in Oral Leukoplakia with Different Histopathological Grades of Epithelial Dysplasia. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2018;8(6):513–522. https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_241_18
- Deshmukh AV, Gupta A, Chaudhari AG, Gangane NM. Correlation of p53 expression with Clinical Presentation and Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma Patients: A Pilot Study. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2022;74(Suppl 2):1836–1840. <https://doi.org/10.1007/s12070-020-01859-0>
- Izumchenko E, Sun K, Jones S, Brait M, Agrawal N, Koch W, McCord CL, Riley DR, Angioli SV, Velculescu VE, Jiang WW, Sidransky D. Notch1 mutations are drivers of oral tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015;8(4):277–286. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0257>
- Broner EC, Trujillo JA, Korzinkin M, Subbannayya T, Agrawal N, Ozerov IV, Zhavoronkov A, Rooper L, Kotlov N, Shen L, Pearson AT, Rosenberg AJ, Savage PA, Mishra V, Chatterjee A, Sidransky D, Izumchenko E. Doublecortin-Like Kinase 1 (DCLK1) Is a Novel NOTCH Pathway Signaling Regulator in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol*. 2021;11:677051. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.677051>
- Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(3):155–166. <https://doi.org/10.1111/jop.12339>
- Kanzi AM, San JE, Chimukangara B, Wilkinson E, Fish M, Ramsuran V, de Oliveira T. Next Generation Sequencing and Bioinformatics Analysis of Family Genetic Inheritance. *Front Genet*. 2020;11:544162. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.544162>
- Feltes BC, Poloni JF, Nunes IJG, Faria SS, Dorn M. Multi-Approach Bioinformatics Analysis of Curated Omics Data Provides a Gene Expression Panorama for Multiple Cancer Types. *Front Genet*. 2020;11:586602. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.586602>
- Fox AJ, Hiemenz MC, Lieberman DB, Sukhadia S, Li B, Grubb J, Candrea P, Ganapathy K, Zhao J, Roth D, Alley E, Loren A, Morrisette JJ. Next Generation Sequencing for the Detection of Actionable Mutations

- in Solid and Liquid Tumors. *J Vis Exp*. 2016;(115):52758. <https://doi.org/10.3791/52758>
13. Buzdugan L, Kalisch M, Navarro A, Schunk D, Fehr E, Bühlmann P. Assessing statistical significance in multivariable genome wide association analysis. *Bioinformatics*. 2016;32(13):1990–2000. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw128>
 14. Mai TT, Turner P, Corander J. Boosting heritability: estimating the genetic component of phenotypic variation with multiple sample splitting. *BMC Bioinformatics*. 2021;22(1):164. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04079-7>
 15. Ajay SS, Parker SC, Abaan HO, Fajardo KV, Margulies EH. Accurate and comprehensive sequencing of personal genomes. *Genome Res*. 2011;21(9):1498–1505. <https://doi.org/10.1101/gr.123638.111>
 16. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W, Karapetyan K, Katz K, Liu C, Maddipatla Z, Malheiro A, McDaniel K, Ovetsky M, Riley G, Zhou G, Holmes JB, Kattman BL, Maglott DR. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D1062–D1067. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153>
 17. Landrum MJ, Chitipiralla S, Brown GR, Chen C, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W, Kaur K, Liu C, Lyoshin V, Maddipatla Z, Maiti R, Mitchell J, O’Leary N, Riley GR, Shi W, Zhou G, Schneider V, Maglott D, Holmes JB, Kattman BL. ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D835–D844. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz972>
 18. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(3):776–781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0334858100>. Epub 2003 Jan 27. PMID: 12552134; PMCID: PMC298677
 19. Saito Y, Koya J, Kataoka K. Multiple mutations within individual oncogenes. *Cancer Sci*. 2021;112(2):483–489. <https://doi.org/10.1111/cas.14699>
 20. Nussinov R, Tsai CJ, Jang H. How can same-gene mutations promote both cancer and developmental disorders? *Sci Adv*. 2022;8(2):eabm2059. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm2059>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Карпук Наталья Анатольевна — кандидат медицинских наук, доцент; доцент кафедры общей и ортопедической стоматологии с курсом факультета повышения квалификации и переподготовки кадров учреждения образования «Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет». <https://orcid.org/0000-0002-1482-9376>

Рубникович Сергей Петрович — доктор медицинских наук, член-корреспондент; профессор; ректор учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет». <https://orcid.org/0000-0002-7450-3757>

Жильцов Иван Викторович — доктор медицинских наук, профессор; заведующий кафедрой доказательной медицины и клинической диагностики факультета повышения квалификации и переподготовки кадров учреждения образования «Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет». <https://orcid.org/0000-0002-4912-2880>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalia A. Karpuk — Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof.; General Dentistry and Prosthodontic Dentistry Department with a course at the Faculty of Advanced Training and Retraining, Vitebsk State Order of Peoples’ Friendship Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-1482-9376>

Sergey P. Rubnikovich — Dr. Sci. (Med.), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus; Prof.; Rector of Belarusian State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-7450-3757>

Ivan V. Zhyltsov — Dr. Sci. (Med.), Prof.; Head of the Department for Evidence-Based Medicine and Clinical Diagnostics at the Faculty of Advanced Training and Retraining, Vitebsk State Order of Peoples’ Friendship Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-4912-2880>

Мазур Оксана Чеславовна — научный сотрудник лаборатории экологической генетики и биотехнологии государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси». <https://orcid.org/0000-0002-6093-4548>

Карпук Иван Юрьевич — доктор медицинских наук, доцент; декан стоматологического факультета, профессор кафедры доказательной медицины и клинической диагностики факультета повышения квалификации и переподготовки кадров учреждения образования «Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет». <https://orcid.org/0000-0001-9991-7035>

Михаленко Елена Петровна — кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории экологической генетики и биотехнологии государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси». <https://orcid.org/0000-0003-4543-2862>

Oksana Ch. Mazur — Researcher, Laboratory of Ecological Genetics and Biotechnology, Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus. <https://orcid.org/0000-0002-6093-4548>

Ivan Yu. Karpuk — Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof.; Dean of the Dental Faculty, Prof. at the Department for Evidence-Based Medicine and Clinical Diagnostics at the Faculty of Advanced Training and Retraining, Vitebsk State Order of Peoples’ Friendship Medical University. <https://orcid.org/0000-0001-9991-7035>

Alena P. Mikhalenka — Cand. Sci. (Biol.); Leading Researcher, Laboratory of Ecological Genetics and Biotechnology, Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus. <https://orcid.org/0000-0003-4543-2862>