

Н.А. КАРПУК¹, С.П. РУБНИКОВИЧ², И.В. ЖИЛЬЦОВ¹,
О.С. МАЗУР³, И.Ю. КАРПУК¹, Е.П. МИХАЛЕНКО³



СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА

УО «Витебский государственный медицинский университет»¹, г. Витебск,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»², г. Минск,
ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»³, г. Минск,
Республика Беларусь

Количество случаев рака слизистой оболочки ротовой полости в мире ежегодно увеличивается. При этом прогнозирование развития и ранняя диагностика рака слизистой оболочки ротовой полости являются важными проблемами здравоохранения.

Цель исследования. Используя метод высокопроизводительного ДНК-секвенирования, идентифицировать патогенные соматические мутации у пациентов с плоскоклеточным раком слизистой оболочки ротовой полости.

Методы. Материалом для исследования являлись 24 образца измененного эпителия пациентов с плоскоклеточным раком слизистой оболочки ротовой полости. Для выделения ДНК из образцов использовали набор «QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» (Qiagen, Германия). ДНК-секвенирование выполняли при помощи секвенатора Illumina NextSeq 550 с использованием набора реагентов TruSight 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 опытным специалистом с использованием специализированного программного обеспечения Illumina BaseSpace и Galaxy Project и в соответствии с актуальными рекомендациями.

Результаты. Выявленные в настоящем исследовании патогенные и вероятно патогенные варианты генов ERCC3, HOXB13, KRAS, MSH3, MSH6, PIK3CA и TP53 с высокой вероятностью (ОР 90-22000) ассоциированы с развитием плоскоклеточного рака слизистой оболочки ротовой полости.

Заключение. Данная информация позволяет разработать ПЦР- и NGS-тест-системы для прогнозирования развития и ранней диагностики плоскоклеточного рака слизистой оболочки ротовой полости.

Ключевые слова: ДНК-секвенирование, соматические мутации, плоскоклеточный рак

Objective. The number of cases of oral squamous cell carcinoma (OSCC) is increasing annually all over the world. At the same time, the prediction of the development and early diagnosis of OSCC are considered to be the most important health problems. By using high throughput DNA sequencing (DNA-seq) technologies, it is possible to identify genetic variants that play a role in human health.

Methods. The samples (n=48) of altered oral mucosal epithelium of patients with oral mucosal leukoplakia (n=24) and oral squamous cell carcinomas (n=24) were the material for the study. The QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Germany) was used to isolate DNA from the samples. DNA sequencing was performed with Illumina NextSeq 550 sequencer and TruSight Oncology 500 DNA Kit, For Use with NextSeq (Illumina, USA). All operations for DNA extraction from biological samples, preparation of DNA libraries, and sequencing were performed step by step in strict accordance with the instructions supplied with the reagent kits. The bioinformatic analysis was performed by an experienced professional using Illumina BaseSpace and Galaxy Project specialized software and in accordance with current guidelines.

Results. Identified pathogenic and probably pathogenic variants in ERCC3, HOXB13, KRAS, MSH3, MSH6, PIK3CA, and TP53 genes are associated with a high probability (RR 90-22000) of oral squamous cell carcinomas development.

Conclusion. This information allows working out PCR and NGS test systems for predicting the development and early diagnosis of oral squamous cell carcinomas.

Keywords: DNA sequencing, somatic mutations, oral squamous cell carcinomas

Novosti Khirurgii. 2023 Mar-Apr; Vol 31 (2): 137-145

The articles published under CC BY NC-ND license

Somatic Mutations in Oral Squamous Cell Carcinomas

N.A. Karpuk, S.P. Rubnikovich, I.V. Zhylytsou, O.C. Mazur, I.Yu. Karpuk, A.P. Mikhalenka



Научная новизна статьи

Показано, что все или большинство патогенных и вероятно патогенных вариантов генов ERCC3 (2:g.128044348G>A), HOXB13 (17:g.46805705C>T0), KRAS (12:g.25398284C>T, 12:g.25398281C>T, 12:g.25380275T>A), MSH3 (5:g.79970914CA>C), MSH6 (2:g.48030639A>AC), PIK3CA (3:g.178936091G>A,

3:g.178936096G>T) и TP53 (17:g.7578431G>A), описанных в настоящем исследовании, с высокой вероятностью (OR 90-22000) ассоциированы с развитием плоскоклеточного рака слизистой оболочки ротовой полости.

What this paper adds

It has been shown that all or the most pathogenic and probably pathogenic variants in ERCC3 genes (2:g.128044348G>A), HOXB13 (17:g.46805705C>T0), KRAS (12:g.25398284C>T, 12:g.25398281C>T, 12:g.25380275T>A), MSH3 (5:g.79970914CA>C), MSH6 (2:g.48030639A>AC), PIK3CA (3:g.178936091G>A, 3:g.178936096G>T) and TP53 (17:g.7578431G>A) described in this study, with high probability (HR 90-22000) associated with the development of oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Введение

Количество случаев рака слизистой оболочки рта (СОР) в мире ежегодно увеличивается [1, 2].

Количество исследований, посвященных молекулярно-генетическим механизмам развития плоскоклеточного рака СОР (ПРСОР), невелико. Согласно опубликованным результатам таких исследований, плоскоклеточный рак СОР может быть ассоциирован с мутациями в генах семейства NOTCH [3, 4], Msm2 (с сопутствующей повышенной экспрессией данного гена) [5], TP53 (описана патогенная мутация данного гена TP53Arg72Pro) [6], в генах FBXL5, UGT2B15, UGT2B28, KANSL1, GSTT1 и DUSP22 [7], в семействе генов RAS (Ha-ras, Ki-ras и N-ras) [8], в генах FAT1 и COL9A1 (генетические варианты rs28647489 и rs550675 соответственно) [9] и др.

Вышеперечисленные исследования немногочисленны, характеризуются небольшим количеством изученных пациентов, а также противоречивостью полученных результатов.

Анализ индивидуального профиля мутаций в генах, ответственных за различную степень дисплазии эпителия СОР, позволил бы подбирать персонализированные схемы терапии пациентов, избегая назначения заведомо неэффективных лекарственных препаратов и позволяя добиваться максимальной эффективности лечения. Однако в Республике Беларусь исследований подобного рода ранее не предпринималось. Можно предполагать, что существуют региональные особенности генетических вариантов, ассоциированных ПРСОР. Знание подобных вариантов позволило бы разработать ПЦР- и NGS-тест-системы для выявления клинически значимых генетических вариантов, что, в свою очередь, позволило бы расширить и дополнить существующие протоколы по оказанию помощи пациентам с заболеваниями СОР, прежде всего – в аспекте ранней диагностики указанных заболеваний и прогнозирования особенностей их течения и исхода.

Цель: используя метод высокопроизводительного ДНК-секвенирования, идентифицировать патогенные соматические мутации у пациентов с ПРСОР.

Материал и методы

Характеристика пациентов, включенных в исследование

В исследование было включено 24 пациента с установленным диагнозом рака СОР (13 мужчин, 11 женщин). Средний возраст пациентов составил 60,5 года (min – 38 лет, max – 75 лет, 95% ДИ: 55-65 лет). Во всех случаях имела место первичная опухоль; у 100% пациентов был диагностирован ПРСОР.

Лабораторные методы исследования

Выполнение биопсии слизистой оболочки ротовой полости

Перед проведением биопсии проводили инфильтрационную анестезию, 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 СОР на 1-3 мм. Иссечение участка СОР осуществляли скальпелем двумя сходящимися полуовальными разрезами. Размер биоптата зависел от размера очага поражения. При невозможности получения полноценного биоптата пациента исключали из исследования.

Биоптат СОР 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, например, буфером 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.

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

Для выделения ДНК использовали набор

«QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» (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 Tissue Kit» [10]. 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 (Illumina, Inc., США) к набору реагентов TruSight Oncology 500 DNA Kit, For Use with NextSeq (48 samples) [11].

Биоинформационный анализ

Биоинформационный анализ результатов ДНК-секвенирования был выполнен опытным специалистом с использованием специализированных комплексов программного обеспечения Illumina BaseSpace и Galaxy Project и в соответствии с актуальными методическими рекомендациями [12-14].

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных выполнялась при помощи специализированных программных пакетов STATISTICA (версия 12) и MedCalc (версия 18.9.1). Центральная 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 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 $p \leq 5 \times 10^{-8}$ [15].

Результаты

Всего в группе из 24 изученных пациентов с плоскоклеточным раком СОР было выявлено 8940 приобретенных генетических вариантов (соматических мутаций). При этом 62 генетических варианта (0,69%) являлись патогенными либо вероятно патогенными, 408 генетических вариантов (4,56%) имели неопределенное клиническое значение, остальные генетические варианты являлись предположительно доброкачественными ($n=4553$; 50,93%) либо доброкачественными ($n=3917$; 43,81%).

атогенные соматические мутации, которые были выявлены в ходе таргетного секвенирования, перечислены и охарактеризованы в таблице 1

Как видно из таблицы 1, патогенные генетические варианты, выявляемые у пациентов с ПРСОР, включают как широко известные гены, мутантные варианты которых играют роль в патогенезе многих типов опухолей, поскольку указанные гены отвечают за базисные механизмы регуляции роста и деления клеток эукариот (TP53, PTEN, KRAS), так и гены, участие которых в формировании плоскоклеточного рака СОР ранее не описывалось (APC, ERCC3, SMARCA4, семейство генов MSH 2,3,6). Почти все указанные гены (кроме APC) так или иначе связаны с процессами репарации поврежденной ДНК, прежде всего – с исправлением неправильно сформированных пар нуклеотидов. Ген APC, в свою очередь, кодирует белок-опухолевый супрессор, который действует как антагонист сигнального пути Wnt [16].

омимо вышеперечисленных патогенных генетических вариантов, в ходе анализа данных таргетного секвенирования нами были также выявлены вероятно патогенные варианты, которые тоже могут быть ассоциированы с формированием ПРСОР (таблица 2).

Как следует из таблицы 2, нами были выявлены вероятно патогенные генетические варианты ранее упомянутых генов KRAS и TP53, а также гена PIK3CA, мутантные формы которых участвуют в патогенезе многих онкологических заболеваний. Тем не менее, были также

Таблица 1

Патогенные генетические варианты, выявленные в ходе таргетного секвенирования образцов тканей плоскоклеточного рака слизистой оболочки ротовой полости

Ген	Тип мутации	Последствия мутации
APC	5:g.112175423C>T	p.Gln1378Ter (формирование стоп-кодона, терминация синтеза белка)
TP53	17:g.7577538C>T	p.Arg248Gln (замена одной аминокислоты в кодируемом белке)
MSH2	2:g.47657020C>T	p.Arg406Ter (формирование стоп-кодона, терминация синтеза белка)
MSH3	5:g.79970914CA>C	p.Lys383ArgfsTer32 (сдвиг рамки чтения с образованием аномального белкового продукта в ходе трансляции гена)
MSH6	2:g.48030639A>AC	p.Phe1088LeufsTer5 (сдвиг рамки чтения с образованием аномального белкового продукта в ходе трансляции гена)
PTEN	10:g.89720726G>T	p.Gly293Ter (формирование стоп-кодона, терминация синтеза белка)
KRAS	12:g.25398284C>T 12:g.25398281C>T	p.Gly13Asp, p.Gly12Asp (замена одной аминокислоты в кодируемом белке)
ERCC3	2:g.128044348G>A	p.Arg425Ter (формирование стоп-кодона, терминация синтеза белка)
SMARCA4	19:g.11130337C>T	p.Thr859Met (замена одной аминокислоты в кодируемом белке)

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

Таблица 2

Вероятно патогенные генетические варианты, выявляемые у пациентов с плоскоклеточным раком слизистой оболочки ротовой полости

Ген	Тип мутации	Последствия мутации
PIK3CA	3:g.178936091G>A 3:g.178936096G>T	p.Glu545Lys, p.Gln546His (замена одной аминокислоты в кодируемом белке)
KRAS	12:g.25380275T>A	p.Gln61His (замена одной аминокислоты в кодируемом белке)
TP53	17:g.7578431G>A	p.Gln167Ter (формирование стоп-кодона, терминация синтеза белка)
HOXB13	17:g.46805705C>T	p.Gly84Glu (замена одной аминокислоты в кодируемом белке)
PTCH1	9:g.98209362GT>G	p.Asn1392ThrfsTer60 (сдвиг рамки чтения с образованием аномального белкового продукта в ходе трансляции)
NOTCH3	19:g.15302831G>T	p.Arg207Ser (замена одной аминокислоты в кодируемом белке)

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

выявлены мутации в генах HOXB13, PTCH1, SDHA и NOTCH3, которые теоретически могут принимать участие в онкогенезе, но, как считалось ранее, не связаны с неопластическими процессами в эпителии слизистой оболочки рта [17-21]. При этом особый интерес представляют аномальные варианты гена HOXB13, белковый продукт которого играет важную роль в эмбриональном развитии и регенерации эпителия и эпидермиса, а также действует как супрессор опухолей [22, 23].

Было также выявлено значительное количество (134) генетических вариантов с неопределенной патогенностью, которые, вероятно, не влияли на развитие ПРСОП. Такие варианты зарегистрированы в генах TP53, SDHA, CHEK2, KDR, ERCC1, ERCC2, ERCC5, PAX3, PAX5, TSHR, RECQL4, NTRK1, CDKN2A, FAS, MLH1, FANCD2, PIK3CA, NF2, EGFR, FANCE, RET, BLM, ALK, KRAS, BRCA2, MET, APC, ATM, POLE, SLX4, BRIP1, AR,

PALB2. Многие из указанных генов могут быть вовлечены в онкогенез, но их варианты, выявленные в ходе исследования, согласно информации из общедоступных баз данных (GENCODE, ClinVar, UniProtKB, dbNSFP, Pfam, CancerHotspots, CancerMine, OncoTree и др.), с очень высокой вероятностью не являются патогенными и не участвуют в развитии ПРСОП [24, 25].

Среди перечисленных выше генетических вариантов существенно преобладают мононуклеотидные полиморфизмы, приводящие к замене в транслируемом белке одной аминокислоты на другую; значительно реже при этом образовывался стоп-кодон. При доброкачественных мутациях нередко случалась синонимичная замена нуклеотидов, при которой кодон, соответствующий определенной аминокислоте, трансформировался в другой кодон, кодирующий ту же самую аминокислоту. Еще реже происходил сдвиг рамки чтения, что

практически всегда приводило к формированию патогенного генетического варианта. Во всех описанных нами случаях к формированию сдвига рамки чтения приводила делеция части нуклеотидов.

Таким образом, патогенные и вероятно патогенные соматические мутации, выявленные в образцах тканей ПРСОР, являлись вариантами генов APC (p.Glu853Ter, p.Gln1378Ter), TP53 (p.Arg248Gln, p.Gln167Ter), PTEN (p.Gly293Ter), MSH2 (p.Arg406Ter), MSH3 (p.Lys383ArgfsTer32), MSH6 (p.Phe1088LeufsTer5), KRAS (p.Gly13Asp, p.Gly12Asp, p.Gln61His), ERCC3 (p.Arg425Ter), PIK3CA (p.Glu545Lys, p.Gln546His), SMARCA4 (p.Thr859Met), PTCH1 (p.Asn1392ThrfsTer60), NOTCH3 (p.Arg207Ser), HOXB13 (p.Gly84Glu), SDHA (p.Leu649GlufsTer4). Все перечисленные гены либо отвечают за базисные механизмы регуляции роста и деления клеток, либо так или иначе связаны с процессами репарации поврежденной ДНК.

Как следует из представленной выше информации, количество патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов, выявленных в ходе таргетного секвенирования ДНК образцов тканей ПРСОР, относительно

невелико (62 генетических варианта, принадлежащих к 17 разновидностям). При этом ни одна из описанных соматических мутаций не встречалась у каждого из пациентов в изученной выборке; количество патогенных генетических вариантов на одного пациента составляло от 1 до 4 (медиана – 1), количество вероятно патогенных генетических вариантов, приходящееся на одного пациента, – от 0 до 2 (медиана – 1). Максимальное количество генетических вариантов одной разновидности, выявленное в изучаемой выборке, – 7 (29,2% от общего объема выборки). Таким образом, нельзя утверждать, что какой-либо из описанных патогенных или вероятно патогенных генетических вариантов однозначно ассоциирован с развитием плоскоклеточного рака слизистой оболочки рта; можно говорить только о наличии той или иной степени взаимосвязи с наличием данной патологии.

В таблице 3 приведена информация о частоте встречаемости найденных патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов в человеческой популяции по данным gnomAD [26], а также отношения шансов и рисков, указывающие на возможную взаимосвязь отдельных соматических мутаций с развитием ПРСОР.

Таблица 3

Сравнительная частота встречаемости выявленных патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов в выборке пациентов с плоскоклеточным раком слизистой оболочки ротовой полости и в человеческой популяции в целом

Ген	Тип мутации	Частота gnomAD, %	Частота в выборке, n (%)	Отношение рисков (95% ДИ) Отношение шансов (95% ДИ)
APC	5:g.112175423C>T	Нет данных	6 (40,0)	–
ERCC3	2:g.128044348G>A	0,0008	2 (8,3)	6346 (595-67680) 6923 (605-79161)
HOXB13	17:g.46805705C>T	0,1843	4 (16,7)	92,6 (37,3-230,2) 111,0 (37,4-328,9)
KRAS	12:g.25380275T>A	Нет данных	4 (16,7)	–
	12:g.25398281C>T	Нет данных	3 (12,5)	–
	12:g.25398284C>T	0,0004	5 (20,8)	15866 (1924-130795) 20041 (2235-197728)
MSH2	2:g.47657020C>T	Нет данных	3 (12,5)	–
MSH3	5:g.79970914CA>C	0,00121	4 (16,7)	12693 (1472-109458) 15231 (1630-142323)
MSH6	2:g.48030639A>AC	0,00641	1 (4,2)	609,2 (73,8-5030) 634,6 (71,4-5636)
PIK3CA	3:g.178936091G>A	0,0004	7 (29,2)	22212 (2840-173713) 31358 (3658-268823)
	3:g.178936096G>T	Нет данных	4 (16,7)	–
PTEN	10:g.89720726G>T	Нет данных	4 (16,7)	–
SMARCA4	19:g.11130337C>T	Нет данных	2 (8,3)	–
TP53	17:g.7577538C>T	0,00119	7 (29,2)	22212 (2840-173713) 31358 (3658-268823)
	17:g.7578431G>A	Нет данных	3 (12,5)	–
NOTCH3	19:g.15302831G>T	Нет данных	2 (8,3)	–
PTCH1	9:g.98209362GT>G	Нет данных	1 (4,2)	–

Примечания: «нет данных» – сведения о частоте данной мутации в человеческой популяции в базе данных gnomAD отсутствуют (т.е. отношение рисков и отношение шансов рассчитать невозможно).

Как видно из таблицы 3, выявленные в ходе исследования патогенные и вероятно патогенные генетические варианты в человеческой популяции встречаются достаточно редко, вследствие чего для многих из них вообще нет данных по частоте встречаемости; можно констатировать, что все патогенные соматические мутации, описанные в изученной выборке, встречаются среди пациентов с ПРСОР в десятки, сотни и тысячи раз чаще, чем в человеческой популяции в целом, и данная разница частот имеет высокую статистическую значимость. Таким образом, можно с высокой вероятностью предположить, что все или большинство патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов, описанных в данном исследовании, ассоциированы с развитием ПРСОР. Множественность вариантов выявленных соматических мутаций, а также то, что ни одна из них не наблюдается у всех пациентов из изученной выборки одновременно, наводят на мысль, что формирование гистологически однородных форм ПРСОР может быть обусловлено наличием нескольких разновидностей альтернативных мутаций в различных генах, имеющих отношение к восстановлению поврежденной ядерной ДНК, а также к регуляции механизмов роста и деления клеток, каковой феномен уже был описан для ряда других онкологических заболеваний [27, 28, 29, 30].

Выводы

Все или большинство патогенных и вероятно патогенных вариантов генов ERCC3 (2:g.128044348G>A), HOXB13 (17:g.46805705C>T), KRAS (12:g.25398284C>T, 12:g.25398281C>T, 12:g.25380275T>A), MSH3 (5:g.79970914CA>C), MSH6 (2:g.48030639A>AC), PIK3CA (3:g.178936091G>A, 3:g.178936096G>T) и TP53 (17:g.7578431G>A), описанных в настоящем исследовании, с высокой вероятностью (ОР 90–22000) ассоциированы с развитием ПРСОР.

Информация об источнике поддержки в виде грантов, оборудования, лекарственных препаратов

Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «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).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

- van der Waal I. Oral leukoplakia, the ongoing discussion on definition and terminology. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20(6):e685-e692. Published 2015 Nov 1. doi:10.4317/medoral.21007
- Kalavrezos N, Scully C. Mouth Cancer for Clinicians. Part 1: Cancer. *Dent Update*. 2015;42(3):250-60. doi:10.12968/denu.2015.42.3.250
- Izumchenko E, Sun K, Jones S, Brait M, Agrawal N, Koch W, McCord CL, Riley DR, Angiuoli SV, Velculescu VE, Jiang WW, Sidransky D. Notch1 mutations are drivers of oral tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015 Apr;8(4):277-86. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0257
- Новикова МВ, Рыбко ВА, Хромова НВ, Фармаковская МД, Копнин ПБ. Роль белков Notch в процессах канцерогенеза. *Успехи Молекулярной Онкологии*. 2015;(3):30-42. <https://doi.org/10.17650/2313-805X.2015.2.3.30-42>
- Razavi SM, Jafari M, Heidarpour M, Khalesi S. Minichromosome maintenance-2 (MCM2) expression differentiates oral squamous cell carcinoma from precancerous lesions. *Malays J Pathol*. 2015 Dec;37(3):253-58.
- Ribeiro IP, Marques F, Barroso L, Rodrigues J, Caramelo F, Melo JB, Carreira IM. Genomic profile of oral squamous cell carcinomas with an adjacent leukoplakia or with an erythroleukoplakia that evolved after the treatment of primary tumor: A report of two cases. *Mol Med Rep*. 2017 Nov;16(5):6780-86. doi: 10.3892/mmr.2017.7428
- Núñez F, Domínguez O, Coto E, Suárez-Nieto C, Pérez P, López-Larrea C. Analysis of ras oncogene mutations in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Surg Oncol*. 1992 Dec;1(6):405-11. doi: 10.1016/0960-7404(92)90043-k
- Chung CM, Hung CC, Lee CH, Lee CP, Lee KW, Chen MK, Yeh KT, Ko YC. Variants in FAT1 and COL9A1 genes in male population with or without substance use to assess the risk factors for oral malignancy. *PLoS One*. 2019 Jan 18;14(1):e0210901. doi: 10.1371/journal.pone
- QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook [Electronic resource]. Publication February 2020. [дата обращения: 2022 Октябрь 27]. Available from: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-ffpe-tissue-kit/>
- Illumina TruSight Oncology 500 Reference Guide [Electronic resource] [дата обращения: 2021 Май 26]. Available from: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/trusight/oncology-500/trusight-oncology-500-reference-guide-1000000067621_07.pdf
- 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 Oct 23;11:544162. doi: 10.3389/fgene.2020.544162
- Каюмов АР. Молекулярный анализ генома. Казань, РФ: КФУ; 2016. 60 с.

13. 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 Sep 20;(115):52758. doi: 10.3791/52758
14. Buzdugan L, Kalisch M, Navarro A, Schunk D, Fehr E, Böhlmann P. Assessing statistical significance in multivariable genome wide association analysis. *Bioinformatics*. 2016 Jul 1;32(13):1990-2000. doi: 10.1093/bioinformatics/btw128
15. Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 May 1;4(5):a008052. doi: 10.1101/cshperspect.a008052
16. Ouhtit A, Al-Kindi MN, Kumar PR, Gupta I, Shanmuganathan S, Tamimi Y. Hoxb13, a potential prognostic biomarker for prostate cancer. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2016 Jan 1;8(1):40-45. doi: 10.2741/E749
17. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018 Feb 20;18(1):8-20. doi: 10.17305/bjms.2018.2756
18. Aburjania Z, Jang S, Whitt J, Jaskula-Stzul R, Chen H, Rose JB. The Role of Notch3 in Cancer. *Oncologist*. 2018 Aug;23(8):900-11. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0677
19. Ibrahim A, Chopra S. Succinate Dehydrogenase-Deficient Gastrointestinal Stromal Tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2020 May;144(5):655-60. doi: 10.5858/arpa.2018-0370-RS
20. Mercado-Asis LB, Wolf KI, Jochmanova I, Taneb D. Pheochromocytoma: a genetic and diagnostic update. *Endocr Pract*. 2018 Jan;24(1):78-90. doi: 10.4158/EP-2017-0057
21. Liu B, Wang T, Wang H, Zhang L, Xu F, Fang R, Li L, Cai X, Wu Y, Zhang W, Ye L. Oncoprotein HBXIP enhances HOXB13 acetylation and co-activates HOXB13 to confer tamoxifen resistance in breast cancer. *J Hematol Oncol*. 2018 Feb 23;11(1):26. doi: 10.1186/s13045-018-0577-5
22. Ouhtit A, Al-Kindi MN, Kumar PR, Gupta I, Shanmuganathan S, Tamimi Y. Hoxb13, a potential prognostic biomarker for prostate cancer. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2016 Jan 1;8(1):40-45. doi: 10.2741/E749
23. Griffith M, Spies NC, Krysiak K, McMichael JF, Coffman AC, Danos AM, Ainscough BJ, Ramirez CA, Rieke DT, Kujan L, Barnell EK, Wagner AH, Skidmore ZL, Wollam A, Liu CJ, Jones MR, Bilski RL, Lesurf R, Feng YY, Shah NM, Bonakdar M, Trani L, Matlock M, Ramu A, Campbell KM, Spies GC, Graubert AP, Gangavarapu K, Eldred JM, Larson DE, Walker JR, Good BM, Wu C, Su AI, Dienstmann R, Margolin AA, Tamborero D, Lopez-Bigas N, Jones SJ, Bose R, Spencer DH, Wartman LD, Wilson RK, Mardis ER, Griffith OL. CIViC is a community knowledgebase for expert crowdsourcing the clinical interpretation of variants in cancer. *Nat Genet*. 2017 Jan 31;49(2):170-74. doi: 10.1038/ng.3774
24. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehml HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30
25. The Genome Aggregation Database (gnomAD) [Electronic resource]. [Дата обращения: 2022 Июль 25]. Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org>
26. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 4;100(3):776-81. doi: 10.1073/pnas.0334858100
27. Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):379-85. doi: 10.1093/carcin/21.3.379
28. Saito Y, Koya J, Kataoka K. Multiple mutations within individual oncogenes. *Cancer Sci*. 2021 Feb;112(2):483-89. doi: 10.1111/cas.14699
29. Nussinov R, Tsai CJ, Jang H. How can same-gene mutations promote both cancer and developmental disorders? *Sci Adv*. 2022 Jan 14;8(2):eabm2059. doi: 10.1126/sciadv.abm2059

REFERENCES

- van der Waal I. Oral leukoplakia, the ongoing discussion on definition and terminology. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20(6):e685-e692. Published 2015 Nov 1. doi:10.4317/medoral.21007.
- Kalavrezos N, Scully C. Mouth Cancer for Clinicians. Part 1: Cancer. *Dent Update*. 2015;42(3):250-260. doi:10.12968/denu.2015.42.3.250.
- Izumchenko E, Sun K, Jones S, Brait M, Agrawal N, Koch W, McCord CL, Riley DR, Angiuoli SV, Velculescu VE, Jiang WW, Sidransky D. Notch1 mutations are drivers of oral tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015 Apr;8(4):277-286. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0257. Epub 2014 Nov 18.
- Novikova MV, Rybko VA, Hromova NV, Farmakovskaja MD, Kopnin PB. The role of Notch proteins in the processes of carcinogenesis. *Uspehi molekularnoj onkologii*. 2015;(3):30-42. (in Russ)
- Razavi SM, Jafari M, Heidarpour M, Khalesi S. Minichromosome maintenance-2 (MCM2) expression differentiates oral squamous cell carcinoma from pre-cancerous lesions. *Malays J Pathol*. 2015 Dec;37(3):253-8.
- Ribeiro IP, Marques F, Barroso L, Rodrigues J, Caramelo F, Melo JB, Carreira IM. Genomic profile of oral squamous cell carcinomas with an adjacent leukoplakia or with an erythroleukoplakia that evolved after the treatment of primary tumor: A report of two cases. *Mol Med Rep*. 2017 Nov;16(5):6780-6786. doi: 10.3892/mmr.2017.7428. Epub 2017 Sep 5.
- Núñez F, Domínguez O, Coto E, Suárez-Nieto C, Pérez P, López-Larrea C. Analysis of ras oncogene mutations in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Surg Oncol*. 1992 Dec;1(6):405-11. doi: 10.1016/0960-7404(92)90043-k.
- Chung CM, Hung CC, Lee CH, Lee CP, Lee KW, Chen MK, Yeh KT, Ko YC. Variants in FAT1 and COL9A1 genes in male population with or without substance use to assess the risk factors for oral malignancy. *PLoS One*. 2019 Jan 18;14(1):e0210901. doi: 10.1371/journal.pone.0210901.
- QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook [Electronic resource]. Published February 2020 [cited 2022 October 27]. Available from: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-ffpe-tissue-kit/>
- Illumina TruSight Oncology 500 Reference Guide [Electronic resource]. [cited 2021 May 26]. Available from: <https://support.illumina.com>

com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/trusight/oncology-500/trusight-oncology-500-reference-guide-1000000067621_07.pdf

11. 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 Oct 23;11:544162. doi: 10.3389/fgene.2020.544162.
12. Kajumov AR. Мolekuljarnyj analiz genoma [Molecular analysis of the genome]. Kazan: Kazan Federal University; 2016. 60 p. (in Russ)
13. FoxAJ, Hiemenz MC, Lieberman DB, Sukhadia S, Li B, Grubb J, Candrea P, Ganapathy K, Zhao J, Roth D, Alley E, Loren A, Morrissette JJ. Next Generation Sequencing for the Detection of Actionable Mutations in Solid and Liquid Tumors. *J Vis Exp.* 2016 Sep 20;(115):52758. doi: 10.3791/52758.
14. Buzdugan L, Kalisch M, Navarro A, Schunk D, Fehr E, Bhlmann P. Assessing statistical significance in multivariable genome wide association analysis. *Bioinformatics.* 2016 Jul 1;32(13):1990-2000. doi: 10.1093/bioinformatics/btw128. Epub 2016 Mar 7.
15. Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 May 1;4(5):a008052. doi: 10.1101/cshperspect.a008052
16. Ouhtit A, Al-Kindi MN, Kumar PR, Gupta I, Shanmuganathan S, Tamimi Y. Hoxb13, a potential prognostic biomarker for prostate cancer. *Front Biosci (Elite Ed).* 2016 Jan 1;8(1):40-5. doi: 10.2741/E749. PMID: 26709644
17. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2018 Feb 20;18(1):8-20. doi: 10.17305/bjbms.2018.2756
18. Aburjania Z, Jang S, Whitt J, Jaskula-Stzul R, Chen H, Rose JB. The Role of Notch3 in Cancer. *Oncologist.* 2018 Aug;23(8):900-911. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0677. Epub 2018 Apr 5.
19. Ibrahim A, Chopra S. Succinate Dehydrogenase-Deficient Gastrointestinal Stromal Tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2020 May;144(5):655-660. doi: 10.5858/arpa.2018-0370-RS. Epub 2019 Jun 6.
20. Mercado-Asis LB, Wolf KI, Jochmanova I, Tanev D. Pheochromocytoma: a genetic and diagnostic update. *Endocr Pract.* 2018 Jan;24(1):78-90. doi: 10.4158/EP-2017-0057. Epub 2017 Nov 16.
21. Liu B, Wang T, Wang H, Zhang L, Xu F, Fang R, Li L, Cai X, Wu Y, Zhang W, Ye L. Oncoprotein

HBXIP enhances HOXB13 acetylation and co-activates HOXB13 to confer tamoxifen resistance in breast cancer. *J Hematol Oncol.* 2018 Feb 23;11(1):26. doi: 10.1186/s13045-018-0577-5

22. Ouhtit A, Al-Kindi MN, Kumar PR, Gupta I, Shanmuganathan S, Tamimi Y. Hoxb13, a potential prognostic biomarker for prostate cancer. *Front Biosci (Elite Ed).* 2016 Jan 1;8(1):40-5. doi: 10.2741/E749. PMID: 26709644.
23. Griffith M, Spies NC, Krysiak K, McMichael JF, Coffman AC, Danos AM, Ainscough BJ, Ramirez CA, Rieke DT, Kujan L, Barnell EK, Wagner AH, Skidmore ZL, Wollam A, Liu CJ, Jones MR, Bilski RL, Lesurf R, Feng YY, Shah NM, Bonakdar M, Trani L, Matlock M, Ramu A, Campbell KM, Spies GC, Graubert AP, Gangavarapu K, Eldred JM, Larson DE, Walker JR, Good BM, Wu C, Su AI, Dienstmann R, Margolin AA, Tamborero D, Lopez-Bigas N, Jones SJ, Bose R, Spencer DH, Wartman LD, Wilson RK, Mardis ER, Griffith OL. CIViC is a community knowledgebase for expert crowdsourcing the clinical interpretation of variants in cancer. *Nat Genet.* 2017 Jan 31;49(2):170-174. doi: 10.1038/ng.3774.
24. Richards S, Aziz N, Bale S, BickD, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehml HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5.
25. The Genome Aggregation Database (gnomAD) [Electronic resource]. [cited 2022 July 25]. Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org>
26. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 4;100(3):776-81. doi: 10.1073/pnas.0334858100. Epub 2003 Jan 27.
27. Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis.* 2000 Mar;21(3):379-85. doi: 10.1093/carcin/21.3.379.
28. Saito Y, Koya J, Kataoka K. Multiple mutations within individual oncogenes. *Cancer Sci.* 2021 Feb;112(2):483-489. doi: 10.1111/cas.14699. Epub 2021 Jan 11.
29. Nussinov R, Tsai CJ, Jang H. How can same-gene mutations promote both cancer and developmental disorders? *Sci Adv.* 2022 Jan 14;8(2):eabm2059. doi: 10.1126/sciadv.abm2059. Epub 2022 Jan 14.

Адрес для корреспонденции

210009, Республика Беларусь
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
Витебский государственный
медицинский университет,
тел.: +375 29 711-97-36,
e-mail: ikarpuk@mail.ru,
Карпук Наталья Анатольевна

Сведения об авторах

Карпук Наталья Анатольевна, к.м.н, доцент, доцент кафедры общей и ортопедической стоматологии с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск,

Address for correspondence

210009, Republic of Belarus,
Vitebsk, Frunze Ave., 27,
Vitebsk State Medical University,
tel.: +375-29-596-10-83,
e-mail: ms.karpuk@mail.ru,
Karpuk Natalia A.

Information about the authors

Karpuk Natalia A., PhD, Associate Professor, Associate Professor of the Department of General and Orthopedic Dentistry with the Course of FAT and RP Vitebsk State Medical University, , Vitebsk, Republic of Belarus.

Республика Беларусь.

<http://orcid.org/0000-0001-9991-7034>

Рубникович Сергей Петрович, член-корреспондент, д.м.н., профессор, ректор Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск, Республика Беларусь.

<http://orcid.org/0000-0002-7450-3757>

Жильцов Иван Викторович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой доказательной медицины и клинической диагностики ФПК и ПК, Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь.

<http://orcid.org/0000-0002-4912-2880>

Мазур Оксана Чеславовна, науч. сотрудник, лаборатория экологической генетики и биотехнологии, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь.

<http://orcid.org/0000-0002-6093-4548>

Карпук Иван Юрьевич, д.м.н., доцент, декан стоматологического факультета, профессор кафедры общей и ортопедической стоматологии с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь.

<http://orcid.org/0000-0001-9991-7035>

Михаленко Елена Петровна, к.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория экологической генетики и биотехнологии, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь.

<http://orcid.org/0000-0003-4543-2862>

Информация о статье

Поступила 25 ноября 2022 г.

Принята в печать 11 декабря 2023 г.

Доступна на сайте 18 декабря 2023 г.

<http://orcid.org/0000-0001-9991-7034>

Rubnikovich Sergey P. Corresponding Member of NASB, MD, Professor, Rector of Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus.

<http://orcid.org/0000-0002-7450-3757>

Zhylytsou Ivan V, MD, Professor, Head of the Department of Evidence-Based Medicine and Clinical Diagnostics of the Faculty of Advanced Training and Retraining of Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus.

<http://orcid.org/0000-0002-4912-2880>

Mazur Oksana C., Researcher, Laboratory of Environmental Genetics and Biotechnology, Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

<http://orcid.org/0000-0002-6093-4548>

Karpuk Ivan Yu., MD, Dean of the Faculty of Dentistry, Professor of the Department of General Dentistry with the Course of Prosthodontic Dentistry of Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus.

<http://orcid.org/0000-0001-9991-7035>

Mikhalenka Alena P., PhD (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Environmental Genetics and Biotechnology, Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.

<http://orcid.org/0000-0003-4543-2862>

Article history

Arrived: 25 November 2022

Accepted for publication: 11 December 2023

Available online: 18 December 2023