

СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ ПРИ ЛЕЙКОПЛАКИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ

КАРПУК НАТАЛЬЯ АНАТОЛЬЕВНА, ORCID ID: 0000-0001-9991-7034; канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры общей и ортопедической стоматологии с курсом ФПК и ПК. Витебский государственный медицинский университет, 210009, Республика Беларусь, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27; e-mail: ms.karpuk@mail.ru

РУБНИКОВИЧ СЕРГЕЙ ПЕТРОВИЧ, ORCID ID: 0000-0002-7450-3757; член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, ректор Белорусского государственного медицинского университета, 220116, Республика Беларусь, г. Минск, пр. Дзержинского, 83; e-mail: rubnikovich@mail.ru

ЖИЛЬЦОВ ИВАН ВИКТОРОВИЧ, ORCID ID: 0000-0002-4912-2880; д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой доказательной медицины и клинической диагностики ФПК и ПК. Витебский государственный медицинский университет, 210009, Республика Беларусь, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27; e-mail: zhylytsou@tut.by

МАЗУР ОКСАНА ЧЕСЛАВОВНА, ORCID ID: 0000-0002-6093-4548; науч. сотрудник, лаборатория экологической генетики и биотехнологии, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, д. 27; e-mail: terezia@mail.ru

КАРПУК ИВАН ЮРЬЕВИЧ, ORCID ID: 0000-0001-9991-7035; докт. мед. наук, профессор кафедры общей и ортопедической стоматологии с курсом ФПК и ПК, декан стоматологического факультета Витебского государственного медицинского университета, 210009, Беларусь, Витебск, пр. Фрунзе, 27; e-mail: ikarpuk@mail.ru

МИХАЛЕНКО ЕЛЕНА ПЕТРОВНА, ORCID ID: 0000-0003-4543-2862; канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория экологической генетики и биотехнологии, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, д. 27; e-mail: michalenko75@mail.ru

Реферат. Введение. Подавляющее количество 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 патогенные соматические мутации у пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки ротовой полости и дисплазией эпителия 1 степени. **Материалы и методы исследования:** материалом для исследования являлись 24 образца измененного эпителия слизистой оболочки ротовой полости пациентов с лейкоплакией. Для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты из образцов использовали набор «QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» (Qiagen, Германия). 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 дезоксирибонуклеиновой кислоты из биологических образцов, пробоподготовке и секвенированию выполняли пошагово в строгом соответствии с инструкциями, прилагаемыми к соответствующим наборам реагентов. Биоинформационный анализ был выполнен с использованием специализированного программного обеспечения Illumina BaseSpace и Galaxy Project в соответствии с актуальными рекомендациями. **Результаты и обсуждение.** Выявленные в ходе настоящего исследования патогенные соматические мутации в генах TP53, KRAS, APC, NRAS и BRAF, как поодиночке, так и в сочетании, с высокой вероятностью (отношения рисков 3000-11000) ассоциированы с развитием лейкоплакии слизистой оболочки ротовой полости с дисплазией эпителия 1 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. **Выводы.** Патогенные и вероятно патогенные варианты генов TP53, KRAS, APC, NRAS и BRAF, как поодиночке, так и в сочетаниях, с высокой вероятностью (отношения рисков 3000-11000) ассоциированы с развитием лейкоплакии слизистой оболочки ротовой полости с дисплазией эпителия 1 степени.

Ключевые слова: секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты, соматические мутации, лейкоплакия, слизистая оболочка ротовой полости.

Для ссылки: Карпук Н.А., Рубникович С.П., Жильцов И.В., и др. Соматические мутации при лейкоплакии слизистой оболочки ротовой полости // Вестник современной клинической медицины. – 2023. – Т.16, вып.3. – С.30-36.

DOI: 10.20969/VSKM.2023.16(3).30-36.

SOMATIC MUTATIONS IN PATIENTS WITH LEUKOPLAKIA OF THE ORAL MUCOSA

KARPUK NATALIA A., ORCID ID: 0000-0001-9991-7034; Associate Professor, Associate Professor of the Department of General and Orthopedic Dentistry with the course of FAT and RP Vitebsk State Medical University, 210009, Republic of Belarus, Vitebsk, Frunze Ave., 27; e-mail: ms.karpuk@mail.ru

RUBNIKOVICH SERGEY P., ORCID ID: 0000-0002-7450-3757; Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Rector. Belarusian State Medical University, 220116, Republic of Belarus, Minsk, Dzerzhinski Ave., 83; e-mail: rubnikovichs@mail.ru

ZHYLYTSOU IVAN V., ORCID ID: 0000-0002-4912-2880; D. Sc. (Med.), 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, 210009, Republic of Belarus, Vitebsk, Frunze Ave., 27; e-mail: zhylytsou@tut.by

MAZUR OKSANA S., ORCID ID: 0000-0002-6093-4548; Researcher, Laboratory of Environmental Genetics and Biotechnology, Institute of Genetics and Cytology of the Belarusian National Academy of Sciences, 220072, Republic of Belarus, Minsk, Akademicheskaya st., 27; e-mail: terezia@mail.ru

KARPUK IVAN Yu., ORCID ID: 0000-0001-9991-7035; D. Sc. (Med.), dean of the Faculty of Dentistry, Professor of the Department of General Dentistry including the course of Prosthodontic Dentistry of Vitebsk State Medical University, 210009, Republic of Belarus, Vitebsk, Frunze Ave., 27; e-mail: ikarpuk@mail.ru

Abstract. Introduction. Genetic basis for the development of leukoplakia of the oral mucosa is not well understood. Early prediction of oral mucosa cancer development is an important public health problem, which results in the importance of studying the pathogenesis of precancerous diseases. Malignant neoplasms of oral mucosa are mainly the cases of squamous cell carcinoma which commonly develops as the outcome of previous potentially malignant diseases, the leading of which is oral mucosa leukoplakia. **Aim.** The goal of study is to determine pathogenic somatic mutations in patients with oral mucosa leukoplakia and grade 1 epithelial dysplasia. **Material and methods.** We have studied 24 samples of altered epithelium of patients with oral mucosa leukoplakia. The QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Germany) was used to isolate deoxyribonucleic acid from the samples. Sequencing was performed with Illumina NextSeq 550 sequencer and TruSight™ Oncology 500 DNA Kit (Illumina, USA). All operations for deoxyribonucleic acid extraction, sampling and sequencing were performed step by step in strict accordance with the instructions supplied with the reagent kits. Bioinformatic analysis was performed using Illumina BaseSpace and Galaxy Project software in accordance with current guidelines. **Results and discussion.** Pathogenic and probably pathogenic somatic mutations identified during this study in TP53, KRAS, APC, NRAS and BRAF genes, both singly and in combination, are reliably (risk ratios 3000-11000) associated with the development of leukoplakia of the oral mucosa with epithelial dysplasia of 1st degree. The multiplicity of genetic variants associated with epithelial dysplasia, as well as the fact that a number of variants do not occur in all patients simultaneously, suggests that the same histotype of oral mucosa dysplasia may develop under the influence of various mutations. **Conclusion.** Pathogenic and probably pathogenic variants of TP53, KRAS, APC, NRAS and BRAF genes, both singly and in combinations, are reliably associated with the development of leukoplakia of the oral mucosa with epithelial dysplasia of 1st degree (risk ratios 3000-11000).

Key words: deoxyribonucleic acid sequencing, somatic mutations, leukoplakia of the oral mucosa, oral mucosa.

For reference: Karpuk NA, Rubnikovich SP, Zhyltsou IV, et al. Somatic mutations in patients with leukoplakia of the oral mucosa. The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine. 2023; 16(3): 30-36. **DOI:** 10.20969/VSKM.2023.16(3).30-36.

Введение. Подавляющее количество 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 СОРП (ЛСОРП) не проводилось. Можно предполагать, что существуют региональные особенности генетических вариантов, ассоциированных с развитием ЛСОРП. Знание подобных вариантов позволило бы разработать тест-системы для выявления клинически значимых генетических вариантов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и высокопроизводительного секвенирования (new generation sequencing, NGS). 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]. 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]. Общая частота злокачественной трансформации ЛСОРП составляет 3,5%, однако в различных исследованиях, включённых в обзор, она варьировала от 0,13% до 34% [7].

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: определить патогенные соматические мутации у пациентов с ЛСОРП и дисплазией эпителия 1 степени.

Материалы и методы исследования. В исследование было включено 24 пациента с морфологически верифицированным диагнозом лейкоплакии слизистой оболочки полости рта с дисплазией эпителия 1 степени (15 мужчин, 9 женщин). От каждого участника при включении в выборку было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании. Средний возраст пациентов составил 59 лет (min – 42 года, max – 72 года, 95% ДИ: 57-65 лет). Во всех случаях имела место плоская форма лейкоплакии, наиболее распространенная в популяции.

Перед проведением биопсии проводили инфильтрационную анестезию, вводя 0,3-1 мл анестетика под неизмененную 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 пораженный участок 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, например, буфером VXL (Qiagen, Германия), инактивирующим нуклеазы, после чего транспортировали в молекулярно-генетическую лабораторию для экстракции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

Послеоперационная рана промывалась раствором антисептика, накладывались 2-3 отдельных узловых шва.

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». 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).

Биоинформационный анализ результатов ДНК-секвенирования был выполнен с использованием специализированных комплексов программного обеспечения Illumina BaseSpace и Galaxy Project и в соответствии с актуальными методическими рекомендациями [8, 9, 10].

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 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 $p \leq 5 \times 10^{-8}$.

Результаты исследования. В ходе биоинформационного анализа результатов таргетного секвенирования 24 образцов тканей ЛСОРП с плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазией эпителия 1 степени нами было выявлено 2439 видов генетических вариантов. Из них 13 разновидностей генетических вариантов (0,53%) являлись патогенными или вероятно патогенными; ещё 1280 генетических вариантов (52,48%) имели неопределённое 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 неизменённым генотипом, в частности, интактные эпителиальные клетки), так и особенностями использованного для таргетного секвенирования набора реагентов. Как указывалось ранее, набор TruSight™ Oncology 500 DNA Kit, 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 целостности (например, путём прямого метилирования ДНК либо подавления трансляции вследствие взаимодействия информационной рибонуклеино-

Патогенные и вероятно патогенные генетические варианты,
выявленные в образцах тканей пациентов с ЛСОРП

Pathogenic and probably pathogenic genetic variants
identified in tissue samples of patients with LOM

Ген	Тип мутации, её хромосомная локализация	Последствия мутации
KRAS proto-oncogene, GTPase (KRAS)	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 (NRAS)	МНП 1:g.114716126C>T	Миссенс: p.Gly12Asp
B-Raf proto-oncogene, serine/ threonine kinase (BRAF)	МНП 7:g.140753336A>T	Миссенс: p.Val640Glu
Tumor protein p53 (TP53)	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 (CTNNB1)	МНП 3:g.41224633A>G	Миссенс: p.Thr41Ala
ASXL transcriptional regulator 1 (ASXL1)	Делеция 20:g.32433361TC>T	Сдвиг рамки чтения: p.Pro389GlnfsTer73
	МНП 20:g.32433573G>T	Миссенс: p.Ala459Ser

Примечание: 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».

вой кислоты (иРНК) с микроРНК), альтернативно-го 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 [11], и было вручную отобрано ещё 14 генетических вариантов с неопределённой 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 учётом 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 использо-

ванием набора реагентов TruSight™ Oncology 500 DNA Kit, 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 и рисков, указывающие на возможную взаимосвязь отдельных соматических мутаций с развитием лейкоплакий 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.

Генетические варианты с неопределённой патогенностью, выявленные при секвенировании образцов тканей ЛСОРП, которые могут быть ассоциированы с развитием дисплазии эпителия

Genetic variants with uncertain pathogenicity identified by sequencing of LOM tissue samples that may be associated with the development of epithelial dysplasia

Ген	Тип мутации, её хромосомная локализация	Последствия мутации
Tumor protein p53 (TP53)	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 (APC)	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 (PTEN)	МНП 10:g.87952142C>T	Миссенс p.Arg173Cys
MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase (MET)	МНП 7:g.116771936C>T	Миссенс p.Thr992Ile
ALK receptor tyrosine kinase (ALK)	МНП 2:g.29193615T>C	Миссенс p.Lys1491Arg
NRAS proto-oncogene, GTPase (NRAS)	МНП 1:g.114713908T>A	Миссенс p.Gln61Leu
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA)	МНП 3:g.179234302G>C	Миссенс p.Gly1049Arg

Примечание: 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».

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, причём 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 сочетании, ассоциированы с развитием дисплазии при ЛСОРП.

Обсуждение. Множественность патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов, ас-

социированных 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 и рака СОРП может развиваться под воздействием различных приобретённых патогенных мутаций, каковой феномен уже был описан многими исследователями для ряда других онкологических заболеваний [12, 13, 14].

Как известно, 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 вслед-

Сравнительная частота встречаемости патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов, выявленных в выборке пациентов с ЛСОРП и в человеческой популяции в целом

Table 3

Comparative frequency of occurrence of pathogenic and probably pathogenic genetic variants identified in a sample of patients with LOM and in the human population as a whole

Ген	Тип мутации	Частота gnomAD, %	Частота в выборке, n (%)	ОР (95% ДИ) ОШ (95% ДИ)
KRAS	12:g.25245347C>T (p.Gly13Asp)	Нет данных	1 (4,17)	-
	12:g.25245350C>T (p.Gly12Asp)	0,0004	3 (12,50)	9519 (1026-88314) 10879 (1087-108869)
	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)	-
TP53	17:g.7673803G>A (p.Arg273Cys)	0,0012	2 (8,33)	6346 (595-67680) 6923 (605-79161)
	17:g.7675088C>T (p.Arg175His)	0,0004	2 (8,33)	6346 (595-67680) 6923 (605-79161)
	17:g.7674220C>T (p.Arg248Gln)	0,00119	1 (4,17)	3173 (204-49281) 3311 (201-54550)
	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 (204-49281) 3311 (201-54550)
APC	5:g.112839606C>T (p.Gln1338Ter)	0,0004	1 (4,17)	3173 (204-49281) 3311 (201-54550)
	5:g.112828889C>T (p.Arg554Ter)	Нет данных	1 (4,17)	-
	5:g.112839942C>T (p.Arg1450Ter)	Нет данных	1 (4,17)	-
ASXL1	20:g.32433361TC>T (p.Pro389GlnfsTer73)	Нет данных	1 (4,17)	-
	20:g.32433573G>T (p.Ala459Ser)	Нет данных	1 (4,17)	-
NRAS	1:g.114716126C>T (p.Gly12Asp)	0,0008	1 (4,17)	3173 (204-49281) 3311 (201-54550)
	1:g.114713908T>A (p.Gln61Leu)	Нет данных	1 (4,17)	-
BRAF	7:g.140753336A>T (p.Val640Glu)	0,0004	2 (8,33)	6346 (595-67680) 6923 (605-79161)
ALK	2:g.29193615T>C (p.Lys1491Arg)	27,9	1 (4,17)	0,15 (0,022-1,017)* 0,11 (0,015-0,83)
CTNNB1	3:g.41224633A>G (p.Thr41Ala)	Нет данных	1 (4,17)	-
MET	7:g.116771936C>T (p.Thr992Ile)	0,7891	1 (4,17)	5,28 (0,77-36,03)* 5,47 (0,74-40,54)*

Ген	Тип мутации	Частота gnomAD, %	Частота в выборке, n (%)	ОР (95% ДИ) ОШ (95% ДИ)
PIK3CA	3:g.179234302G>C (p.Gly1049Arg)	Нет данных	1 (4,17)	-
PTEN	10:g.87952142C>T (p.Arg173Cys)	Нет данных	1 (4,17)	-

Примечание: 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).

ствии соматических мутаций могут лежать в основе онкогенеза.

Вывод. 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 3000-11000) ассоциированы с развитием ЛСОРП с дисплазией эпителия 1 степени.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях. 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).

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Прозрачность исследования. Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- 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
- van der Waal I. Oral leukoplakia, the ongoing discussion on definition and terminology. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2015; 20 (6): e685-e692. DOI: 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 [Maxillofacial Mouth Surgery]. 2002; 6(6): 410-414 (in German). DOI: 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. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2009.00767.x
- Reddy VM, Kamath A, Radhakrishnan RA. p53 immunoprofiling of potentially malignant oral disorders: a case series analysis. Indian J Cancer. 2012; 49(1): 27-32. DOI: 10.4103/0019-509X.98913
- Izumchenko E, Sun K, Jones S, et al. Notch1 mutations are drivers of oral tumorigenesis. Cancer Prev. Res. (Phila). 2015; 8 (4): 277-286. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0257
- Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. J Oral Pathol Med. 2016; 45(3): 155-166. DOI: 10.1111/jop.12339
- Kanzi AM, San JE, Chimukangara B, et al. Next Generation Sequencing and Bioinformatics Analysis of Family Genetic Inheritance. Front Genet. 2020; 11: 544162. DOI: 10.3389/fgene.2020.544162
- Fox AJ, Hiemenz MC, Lieberman DB, et al. Next Generation Sequencing for the Detection of Actionable Mutations in Solid and Liquid Tumors. J Vis Exp. 2016; 20(115): 52758. DOI: 10.3791/52758
- Buzdugan L, Kalisch M, Navarro A, et al. Assessing statistical significance in multivariable genome wide association analysis. Bioinformatics. 2016; 32(13): 1990-2000. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw128
- Landrum MJ, Chitipiralla S, Brown GR, et al. ClinVar: improvements to accessing data. Nucleic Acids Res. 2020; 48(D1): D835-D844. DOI: 10.1093/nar/gkz972
- Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(3): 776-781. DOI: 10.1073/pnas.0334858100
- Saito Y, Koya J, Kataoka K. Multiple mutations within individual oncogenes. Cancer Sci. 2021; 112(2): 483-489. DOI:10.1111/cas.14699
- Nussinov R, Tsai CJ, Jang H. How can same-gene mutations promote both cancer and developmental disorders? Sci Adv. 2022; 8(2): eabm2059. DOI: 10.1126/sciadv.abm2059