



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

## ГЕРМИНАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ ПРИ ЛЕЙКОПЛАКИИ И РАКЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ: ПРОСПЕКТИВНОЕ НАБЛЮДАТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Н.А. Карпук<sup>1</sup>, С.П. Рубникович<sup>2</sup>, О.Ч. Мазур<sup>3</sup>, И.В. Жильцов<sup>1</sup>, И.Ю. Карпук<sup>1</sup>, Е.П. Михаленко<sup>3</sup>

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

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

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

### АННОТАЦИЯ

**Введение.** Количество исследований, посвященных молекулярной генетике лейкоплакии и плоскоклеточного рака слизистой оболочки ротовой полости, невелико, а результаты их, как правило, носят предварительный характер. Можно предполагать, что существуют региональные особенности патогенных генетических вариантов, ассоциированных с развитием лейкоплакии слизистой оболочки ротовой полости и плоскоклеточного рака слизистой оболочки ротовой полости. Знание подобных вариантов позволило бы разработать ПЦР (полимеразной цепной реакции) — и NGS-тест-системы (Next-generation sequencing) для выявления клинически значимых герминальных мутаций. **Цель исследования** — используя метод высокопроизводительного секвенирования, идентифицировать патогенные герминальные генетические варианты у пациентов с лейкоплакиями слизистой оболочки полости рта и дисплазией эпителия 1-й степени, а также с плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта. **Методы.** Дизайн исследования: проспективное, основанное на наблюдении, поперечное (cross-sectional), без контрольной группы. В выборку включены пациенты (48 человек), любого пола 18 лет и старше с установленными и морфологически подтвержденными диагнозами: лейкоплакия слизистой оболочки ротовой полости с плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазией эпителия 1-й степени (24 человека) и плоскоклеточный рак слизистой оболочки ротовой полости (24 человека), обратившиеся за медицинской помощью в учреждения здравоохранения «Витебский областной клинический стоматологический центр» и «Витебский областной клинический онкологический диспансер» в 2019–2020 гг. Проведена количественная оценка найденных патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов, ассоциированных с развитием данных заболеваний. Исследование выполнялось на базе Центра коллективного пользования «Геном» Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. Для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из образцов крови использовали диагностический набор QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия). Подготовку ДНК-библиотек и секвенирование выполняли при помощи секвенатора Illumina Next Seq 550 (Illumina, Inc, США) с использованием набора реагентов для полноэкзомного секвенирования Illumina Nextera DNA Exome (США). Биоинформационный анализ был выполнен с использованием специализированного программного обеспечения Illumina Base Space (США) и Galaxy Project (The Galaxy Community, некоммерческий международный проект) в соответствии с актуальными рекомендациями. Статистическая обработка данных выполнялась при помощи специализированных программных пакетов Statistica (версия 12) (StatSoft, Inc., США) и MedCalc (версия 18.9.1) (Med Calc Software Ltd, Бельгия). **Результаты.** Впервые в Республике Беларусь выполнено высокопроизводительное полноэкзомное секвенирование образцов дезоксирибонуклеиновой кислоты, выделенных из крови пациентов с лейкоплакиями и плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта. Показано, что общее количество уникальных герминальных генетических вариантов в экзоме пациентов с обоими заболеваниями весьма велико, но большая их часть не является патогенными. Установлено, что большинство герминальных мутаций у изученных пациентов локализовано всего в 19 генах экзома: *MAP2K3*, *DNAH5*, *HSPG2*, *OBSCN*, *SYNE1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-A*, *HLA-B*, *PKDIL2*, *TTN*, *AHNAK2*, *PDE4DIP*, *MUC3A*, *MUC4*, *MUC12*, *MUC16*, *MUC17*. Наибольшее количество генетических вариантов (>40% от их общего количества) у пациентов из обеих изученных клинических групп было выявлено в генах *MUC3A*, *MUC4*, *MUC12* и *MUC16*, ответственных за синтез семейства гликопротеидов-муцинов. **Заключение.** Развитие лейкоплакии слизистой оболочки ротовой полости и плоскоклеточного рака слизистой оболочки ротовой полости может быть ассоциировано с патогенными вариантами генов *MUC3A*, *MUC4*, *MUC12* и *MUC16*.

**Ключевые слова:** гены, герминальные мутации, лейкоплакия, рак, слизистая оболочка ротовой полости

**Для цитирования:** Карпук Н.А., Рубникович С.П., Мазур О.Ч., Жильцов И.В., Карпук И.Ю., Михаленко Е.П. Герминальные мутации у пациентов при лейкоплакии и раке слизистой оболочки ротовой полости: проспективное наблюдательное исследование. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2023; 30(2): 15–24. <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2023-30-2-15-24>

**Источники финансирования:** Внебюджетный фонд учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». Государственная программа научных исследований «Трансляционная медицина», подпрограмма 4.3 «Инновационные технологии клинической медицины, тема-задание 3.45 «Установить спектр мутаций эпителия у пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки рта».

**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.

**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:** Карпук Н.А., Рубникович С.П., Мазур О.Ч., Жильцов И.В., Карпук И.Ю., Михаленко Е.П. — разработка концепции и дизайна исследования; Карпук Н.А., Мазур О.Ч., Карпук И.Ю., Михаленко Е.П. — сбор данных; Карпук Н.А., Рубникович С.П., Жильцов И.В. — анализ и интерпретация результатов; Карпук Н.А., Жильцов И.В., Карпук И.Ю., Михаленко Е.П. — обзор литературы, проведение статистического анализа; Карпук Н.А., Мазур О.Ч. — составление черновика рукописи и формирование его окончательного варианта; Рубникович С.П., Жильцов И.В., Карпук И.Ю., Михаленко Е.П. — критический 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, 210009, г. Витебск, Республика Беларусь

Получена: 14.10.2022/ Получена после доработки: 12.01.2023/ Принята к публикации: 03.03.2023

## GERMLINE MUTATIONS IN PATIENTS WITH ORAL MUCOSAL LEUKOPLAKIA AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA: A PROSPECTIVE OBSERVATIONAL STUDY

*Natalia A. Karpuk<sup>1</sup>, Sergey P. Rubnikovich<sup>2</sup>, Oksana Ch. Mazur<sup>3</sup>, Ivan V. Zhyltsov<sup>1</sup>, Ivan Yu. Karpuk<sup>1</sup>, Alena P. Mikhalenka<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Frunze Ave., 27, Vitebsk, 210009, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University, Dzerzhinski Ave., 83, Minsk, 220116, Republic of Belarus

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

### ABSTRACT

**Background.** The number of studies devoted to the molecular genetics of oral mucosal leukoplakia and squamous cell carcinoma is small, while the obtained results are usually preliminary in nature. We can assume the existence of region-specific pathogenic genetic variants involved in the development of oral mucosal leukoplakia and squamous cell carcinoma. With the knowledge of such variants, it would become possible to develop PCR (polymerase chain reaction) and NGS (next-generation sequencing) test systems for the detection of clinically significant germline mutations. **Objectives** — to identify pathogenic germline genetic variants in patients with oral mucosal leukoplakia accompanied by grade 1 epithelial dysplasia, as well as oral mucosal squamous cell carcinoma, using new-generation sequencing. **Methods.** Study design: prospective, observational, cross-sectional, without a control group. The sample included patients (48 persons) of either sex (18 years of age or older) with the following proven and morphologically confirmed diagnoses: oral mucosal leukoplakia accompanied by grade 1 squamous intraepithelial neoplasia of epithelium (24 people) and oral mucosal squamous cell carcinoma (24 people), who sought medical care at the Vitebsk Regional Clinical Dental Center and Vitebsk Regional Clinical Oncological Center in 2019–2020. The identified pathogenic and presumably pathogenic genetic variants involved in the development of these diseases were quantitatively assessed. The study was conducted at the Shareable Core Facilities GENOME of the Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus. In order to isolate deoxyribonucleic acid (DNA) from blood samples, a QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Germany) was used. The preparation of DNA libraries and sequencing were carried out by means of an Illumina NextSeq 550 sequencing system (Illumina, Inc., USA) using an Illumina Nextera DNA Exome kit (USA). Bioinformatic analysis was conducted using Illumina BaseSpace specialized software (USA) and Galaxy Project (Galaxy Community, an international non-profit project) in accordance with current guidelines. The obtained data were statistically processed employing specialized software packages Statistica 12 (StatSoft, Inc., USA) and MedCalc 18.9.1 (MedCalc Software, Ltd, Belgium). **Results.** Next-generation whole-exome sequencing of deoxyribonucleic acid samples isolated from the blood of patients with oral mucosal leukoplakia and squamous cell carcinoma has been conducted in the Republic of Belarus for the first time. The total number of unique germline genetic variants in the exome of both groups of patients was shown to be very high, yet most of them were not pathogenic. In the examined patients, the majority of germline mutations were found to be localized only in 19 exome genes: *MAP2K3*, *DNAH5*, *HSPG2*, *OBSCN*, *SYNE1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQAI*, *HLA-DQBI*, *HLA-A*, *HLA-B*, *PKDIL2*, *TTN*, *AHNAK2*, *PDE4DIP*, *MUC3A*, *MUC4*, *MUC12*, *MUC16*, and *MUC17*. In both clinical groups, the greatest number of genetic variants (> 40% of the total number) was detected in *MUC3A*, *MUC4*, *MUC12*, and *MUC16*, responsible for the synthesis of the glycoprotein mucin family. **Conclusion.** Oral mucosal leukoplakia and squamous cell carcinoma can arise from the pathogenic variants of *MUC3A*, *MUC4*, *MUC12*, and *MUC16*.

**Keywords:** genes, germline mutations, leukoplakia, cancer, oral mucosa

**For citation:** Karpuk N.A., Rubnikovich S.P., Mazur O.Ch., Zhyltsov I.V., Karpuk I.Yu., Mikhalenka A.P. Germline mutations in patients with oral mucosal leukoplakia and squamous cell carcinoma: a prospective observational study. *Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2023; 30(2): 15–24 (In Russ.). <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2023-30-2-15-24>

**Funding:** Extrabudgetary fund of the Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University; State Research Program *Translational Medicine*, subprogram 4.3 *Innovative Technologies in Clinical Medicine*, assignment 3.45 *To Determine the Range of Epithelial Mutations in Patients with Oral Mucosal Leukoplakia*.

**Conflict of interest:** One of the authors (Prof. Rubnikovich, Dr. Sci. (Med.)) is a member of the Editorial Board of the *Kuban Scientific Medical Bulletin*. The authors are unaware of any other potential conflict of interest associated with this manuscript.

**Compliance with ethical standards:**

The study was approved by the Clinical Trial Ethics Committee (Minutes No. 2 of January 18, 2020) of the Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (Frunze Ave., 27, Vitebsk, Republic of Belarus).

**Author contributions:** Karpuk N.A., Rubnikovich S.P., Mazur O.Ch., Zhylytsov I.V., Karpuk I.Yu., Mikhalenka A.P. — concept formulation and study design; Karpuk N.A., Mazur O.Ch., Karpuk I.Yu., Mikhalenka A.P. — data collection; Karpuk N.A., Rubnikovich S.P., Zhylytsov I.V. — analysis and interpretation of the obtained results; Karpuk N.A., Zhylytsov I.V., Karpuk I.Yu., Mikhalenka A.P. — literature review and statistical analysis; Karpuk N.A., Mazur O.Ch. — drafting of the manuscript and preparation of its final version; S.P. Rubnikovich, Zhylytsov I.V., Karpuk I.Yu., Mikhalenka A.P. — critical revision of the manuscript for valuable intellectual content.

All the authors approved the final version of the manuscript prior to publication, agreeing to be accountable for all aspects of the work, meaning that issues related to the accuracy and integrity of any part of the work are appropriately examined and resolved.

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

**Received:** 14.10.2022/ **Received after revision:** 12.01.2023/ **Accepted:** 03.03.2023

## ВВЕДЕНИЕ

Стандартным методом молекулярно-генетической диагностики новообразований считается полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая обладает рядом преимуществ, в частности высокими показателями диагностической чувствительности и специфичности и относительно невысокой стоимостью одного исследования. Тем не менее ПЦР-диагностика позволяет выявить только известные мутации в ограниченном наборе генов, что ограничивает диагностические и прогностические возможности данного метода [1].

Указанных недостатков лишен метод высокопроизводительного секвенирования (NGS — new generation sequencing), который позволяет выявить первичную генетическую последовательность любых генов, интересующих исследователя. Существенным недостатком метода является высокая стоимость одного запуска секвенатора, но указанный недостаток преодолевается путем использования так называемого таргетного секвенирования, т.е. секвенирования заранее выбранного набора генов. Такой вид секвенирования обходится существенно дешевле, чем секвенирование всего генома или его значительной части, и по стоимости выявления одной генетической аномалии может быть дешевле ПЦР-исследования [2, 3].

Согласно данным мировой статистики, на сегодняшний день онкологические заболевания занимают второе место в структуре причин смертности в развитых странах и третье место — в общей структуре смертности развивающихся стран. Рак слизистой оболочки ротовой полости (СОРП) и губ составляет 3% от всех случаев рака. Известно, что 11% всех заболеваний СОРП имеют высокий риск злокачественной трансформации [4]. На начальных этапах своего развития процесс обратим, а своевременное и рациональное лечение заболеваний СОРП при дисплазии эпителия предупреждает развитие злокачественных опухолей СОРП<sup>1</sup> [5]. При этом пятилетняя выживаемость пациентов

со злокачественными новообразованиями СОРП составляет не более 50% [6].

Количество исследований, посвященных молекулярной генетике лейкоплакий и плоскоклеточного рака СОРП, невелико, а результаты их, как правило, носят предварительный характер. Так, показано, что плоскоклеточный рак СОРП (ПРСОРП) может быть ассоциирован с мутациями в генах семейства *NOTCH* [7], *Mcm2* (с сопутствующей повышенной экспрессией данного гена) [8], *TP53* (описана патогенная мутация данного гена *TP53Arg72Pro*) [9], в генах *FBXL5*, *UGT2B15*, *UGT2B28*, *KANSL1*, *GSTT1* и *DUSP22* [10], в семействе генов *RAS* (*Ha-ras*, *Ki-ras* и *N-ras*) [11], в генах *FAT1* и *COL9A1* (генетические варианты rs28647489 и rs550675 соответственно) [12] и др.

В Республике Беларусь исследований подобного рода ранее не предпринималось. Можно предполагать, что существуют региональные особенности патогенных генетических вариантов, ассоциированных с развитием лейкоплакий СОРП (ЛСОРП) и плоскоклеточного рака СОРП. Знание подобных вариантов позволило бы разработать ПЦР- и NGS-тест-системы для выявления клинически значимых мутаций, что, в свою очередь, позволило бы расширить и дополнить существующие протоколы по оказанию помощи пациентам с заболеваниями СОРП, прежде всего в аспекте ранней диагностики диспластических процессов в эпителии СОРП и прогнозирования особенностей их течения и исхода. Анализ индивидуального профиля патогенных мутаций, ассоциированных с диспластическими и неопластическими процессами, в теории дает возможность персонализировать схемы терапии пациентов, позволяя добиваться максимальной эффективности лечения.

**Цель исследования** — используя метод высокопроизводительного секвенирования, идентифицировать патогенные герминальные генетические варианты у пациентов

<sup>1</sup> Губайдулина Е. Я., Цегельник Л. Н., Лузина В. В., Чергештов Ю. И. *Практическое руководство по поликлиническому разделу хирургической стоматологии*. М.: ООО «МИА»; 2007. 136 с.

с лейкоплакией слизистой оболочки ротовой полости и дисплазией эпителия 1-й степени, а также с плоскоклеточным раком слизистой оболочки ротовой полости.

## МАТЕРИАЛЫ

### Дизайн исследования

Проспективное, основанное на наблюдении, поперечное (cross-sectional), без контрольной группы, 48 образцов крови пациентов с онкологическими заболеваниями слизистой оболочки полости рта.

### Условия проведения исследования

Исследование проводилось на базе Центра коллективно-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.

### Критерии соответствия

#### Критерии включения

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

#### Критерии исключения

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, произошедшие 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.

Диагностические критерии для пациентов плоскоклеточным раком слизистой оболочки ротовой полости: наличие опухолевого образования или длительно незаживающей язвы (возможно — с некротическим налетом) в полости рта; длительное, вялое течение процесса, не поддающееся консервативному лечению; безуспешность консервативного лечения; увеличение размеров патологического очага, несмотря на проведенное адекватное лечение; появление уплотнения вокруг или в основании патологического очага; кровоточивость, неприятный запах изо рта; появление плотных увеличенных безболезненных регионарных лимфатических узлов; гистологически — малигнизированные эпителиальные клетки, которые могут располагаться в виде пучков, тяжей или неправильной формы гнезд. Клетки имеют сходство с многослойным эпителием. Опухоль разрушает базальную мембрану и прорастает в подлежащую соединительную ткань.

#### Подбор участников в группы

В ходе исследования было отобрано 24 образца крови пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки ротовой полости (ЛСОРП) и 24 образца крови пациентов с плоскоклеточным раком слизистой оболочки ротовой полости (ПРСОРП).

### 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 и ПРСОРП.

#### Дополнительные показатели исследования

Настоящим исследованием не предусмотрены.

### Методы измерения целевых показателей

#### Лабораторные методы исследования

Периферическая кровь забиралась из кубитальной вены утром натощак в вакуумные пробирки объемом 10 мл с K2 ЭДТА (Дикал этилендиаминтетрауксусной кислоты), после чего из нее путем центрифугирования получали плазму, которую подвергали глубокой заморозке для последующего хранения ( $t^{\circ} = -80^{\circ} \text{C}$ ).

Для выделения ДНК использовали диагностический набор QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия). Все операции по подготовке ДНК-библиотек к секвенированию выполняются пошагово в строгом соответствии с инструкциями по применению, прилагаемыми производителем (Illumina, Inc., США) к набору реагентов для экзомного секвенирования Illumina Nextera DNA Exome (Illumina, Inc., США)<sup>2,3</sup> [13, 14].

Набор Nextera DNA Exome предназначен для секвенирования т. н. экзома — части генома человека, включаю-

<sup>2</sup> Nextera DNA Exome Reference (1000000039018). Available: [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/samplepreps\\_nextera/nextera-dna-exome/nextera-dna-exome-reference-1000000039018-00.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nextera-dna-exome/nextera-dna-exome-reference-1000000039018-00.pdf)

<sup>3</sup> 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](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/trusight/oncology-500/trusight-oncology-500-reference-guide-1000000067621_07.pdf)

щего экзона, то есть последовательности, которые непосредственно транслируются в белки. Экзом человека содержит приблизительно 180 тысяч экзонов, что соответствует примерно 1% всего генома, или 30 миллионам пар нуклеотидов [15]. Тем не менее мутации в экзоне составляют до 85% от всех мутаций, связанных с различными заболеваниями — как врожденными, так и приобретенными [16]. Набор требует  $\approx 40$  нг ДНК для пробоподготовки, обеспечивая при этом аналитическую чувствительность  $>96\%$  и аналитическую специфичность на уровне 99,9998% (при выявлении мононуклеотидных полиморфизмов).

Было выполнено полноэкзомное секвенирование 48 образцов измененных тканей (24 образцов тканей ЛСОРП и 24 образцов тканей ПРСОРП) с использованием высокопроизводительного секвенатора Illumina Next Seq 550 (Illumina, Inc., США). Данное исследование было выполнено с целью поиска врожденных (герминальных) генетических вариантов («мутаций»), с высокой вероятностью ассоциированных с развитием лейкоплакии СОР и плоскоклеточного рака СОР. Указанные генетические варианты присутствуют в 100% клеток организма, ввиду чего они могут быть выявлены в ДНК лейкоцитов, причем 20-кратного покрытия прочтениями  $\geq 85\%$  секвенируемых последовательностей, обеспечиваемого набором Nextera DNA Exome, достаточно для их надежного выявления и документирования.

#### **Биоинформационный анализ**

Биоинформационный анализ результатов экзомного секвенирования ДНК был выполнен с использованием специализированных комплексов программного обеспечения Illumina Base Space (Illumina, Inc., США) и Galaxy Project (The Galaxy Community, некоммерческий международный проект в рамках движения «открытая наука») и в соответствии с актуальными методическими рекомендациями [17–19].

#### **Переменные (предикторы, конфаундеры, модификаторы эффекта)**

Единственными предикторами развития ЛСОРП и ПРСОРП, изучаемыми в настоящем исследовании, являются патогенные и вероятно патогенные герминальные генетические варианты, выявляемые в экзоне пациентов с соответствующими заболеваниями. Модификаторами эффекта могут являться патогенные варианты регуляторных генов, а также эпигенетические модификации генов экзома (например, их метилирование), не учитываемые в данном исследовании. Также модификатором эффекта может являться наличие у пациента нескольких патогенных вариантов генов экзома одновременно. Конфаундерами в данном исследовании могут являться неучтенные внешние воздействия (например, привычка курить трубку либо действие вируса папилломы человека), которые могут вызывать дисплазию либо злокачественную трансформацию клеток эпителия СОРП без образования патогенных (онкогенных) вариантов генов экзома, 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 ( $\alpha \leq 0,05$ ). Желаемая мощность исследования составила 90%. Мы также исходили из предположения, что патогенные генетические варианты, ассоциированные с развитием неоплазм, встречаются в популяции чрезвычайно редко (не чаще чем в 0,001% случаев), в то время как 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 (Stat Soft, 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 лейкоплакии/рака СОРП намного чаще, чем в референсном геноме человека, по которому производилось выравнивание ридов. Подсчитанный таким образом размер выборки составил 23 человека; он был увеличен до 24 человек, т.к. один набор реагентов Nextera DNA Exome позволяет обработать 12 образцов ДНК.

##### **Статистические методы**

Статистическая обработка данных выполнялась при помощи специализированных программных пакетов Statistica (версия 12) (StatSoft, Inc., США) и MedCalc (версия 18.9.1) (Med Calc Software Ltd, Бельгия). 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  $\chi^2$  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 (Spearman's Rho), а также логистический регрессионный анализ. В регрессионный анализ включались показатели с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . 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  $p \leq 5 \times 10^{-8}$  [20].

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

##### **Формирование выборки исследования**

В выборку включались пациенты с установленными и подтвержденными диагнозами ЛСОРП и ПРСОРП,

обращавшиеся за медицинской помощью в учреждение здравоохранения «Витебский областной клинический стоматологический центр» (ЛСОРП) и в учреждение здравоохранения «Витебский областной клинический онкологический диспансер» (ПРСОРП). Включение пациентов в обе выборки 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 1.

### 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). Во всех случаях имела место плоская форма лейкоплакии, наиболее распространенная в популяции.

Также в исследование были включены 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; также у 100% пациентов был диагностирован плоскоклеточный рак.

### Основной результат исследования

#### Оценка качества выполнения полноэкзомного секвенирования

Доля оснований GC в прочитанных генетических последовательностях колеблется от 49 до 51%, составляя в среднем 50%; средняя длина прочтений («ридов») составляет  $\approx 148$  оснований, что в наилучшей степени соответствует возможностям прибора Illumina Next Seq 550; средняя доля нуклеотидных последовательностей, прочитанных хотя бы 1 раз, составляет 97,8%,  $\geq 5$  раз — 91,8%,  $\geq 10$  раз — 83,7%,  $\geq 30$  раз — 52,9%, медиана покрытия нуклеотидных последовательностей прочтениями составляет 35,4X, среднее покрытие — 42,5X, доля успешно выровненных нуклеотидных последовательностей от общего объема экзома — 99,9%.

С учетом того что в данном случае выполнялось секвенирование ДНК с целью выявления герминальных вариантов, избыточного покрытия последовательностей прочтениями не требуется и наиболее важным показателем



Рис. 1. Блок-схема дизайна проведенного исследования.

Примечание: блок-схема выполнена авторами (согласно рекомендациям STROBE). Сокращения: ЛСОРП — лейкоплакия слизистой оболочки ротовой полости; ПРСОРП — плоскоклеточный рак слизистой оболочки ротовой полости; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

Fig. 1. Block diagram of the study design.

Note: the block diagram was created by the authors (as per STROBE recommendations); Abbreviations: OML — oral mucosal leukoplakia; OMSCC — oral mucosal squamous cell carcinoma; DNA — deoxyribonucleic acid.

из приведенных в таблице для данной ситуации является средняя доля нуклеотидных последовательностей, прочитанных 10 и более раз — она должна быть  $\geq 60\%$  (в нашем случае — 83,7%, что свидетельствует о достаточно высоком качестве полученных нами результатов секвенирования).

**Результаты биоинформационного анализа данных полноэкзомного секвенирования образцов крови пациентов**

В ходе биоинформационного анализа результатов секвенирования те или иные генетические варианты были выявлены практически в каждом из 24 918 генов экзома человека, которые можно секвенировать при помощи набора Illumina Nextera DNA Exome; общее количество обнаруженных уникальных генетических вариантов составило 124 475 в группе пациентов с ЛСОПП и 152 767 в группе пациентов с ПРСОПП (в среднем по 11 688 мутантных генов и  $\approx 33\,600$  генетических вариантов у каждого изученного пациента). При этом подавляющее большинство выявленных вариантов нуклеотидных последовательностей не имело клинического значения, существенно не влияя ни на синтез белков, ни на их функцию.

Тем не менее значительное количество вариантов было выявлено в относительно небольшом количестве генов. У пациентов с ЛСОПП это были (в порядке возрастания

количества вариантов) гены *MAP2K3* (в среднем выявлено 72 варианта), *DNAH5* (315 вариантов), *HSPG2* (383 варианта), *OBSCN* (731 вариант), *SYNE1* (733 варианта), *HLA-DRB1* (766 вариантов), *HLA-DQB1* (842 варианта), *TTN* (911 вариантов), *AHNAK2* (1029 вариантов), *HLA-A* (1038 вариантов), *PDE4DIP* (1210 вариантов), *MUC12* (1293 варианта), *MUC3A* (1561 вариант), *MUC4* (1680 вариантов), *MUC16* (1955 вариантов) — всего 14 519 вариантов в 15 генах (рис. 2).

Аналогичная ситуация наблюдалась у пациентов с ПРСОПП: в данной группе варианты наиболее часто обнаруживались в генах *MAP2K3* (176 вариантов), *MUC17* (206 вариантов), *SYNE1* (596 вариантов), *PKD1L2* (625 вариантов), *AHNAK2* (838 вариантов), *HLA-DRB1* (856 вариантов), *HLA-B* (888 вариантов), *HLA-DQB1* (1033 варианта), *HLA-A* (1057 вариантов), *PDE4DIP* (1214 вариантов), *HLA-DQA1* (1280 вариантов), *MUC12* (1299 вариантов), *MUC4* (1433 варианта), *MUC3A* (1539 вариантов), *MUC16* (1864 варианта) — всего 14 904 варианта также в 15 генах (рис. 3).

Очевидно, что у пациентов как с ЛСОПП, так и с плоскоклеточным раком СОП наибольшее количество генетических вариантов было выявлено в одних и тех же генах, что указывает на отсутствие существенных различий в локализации герминальных мутаций у данных

Summary of Blood mutations in Leukoplakia cohort.

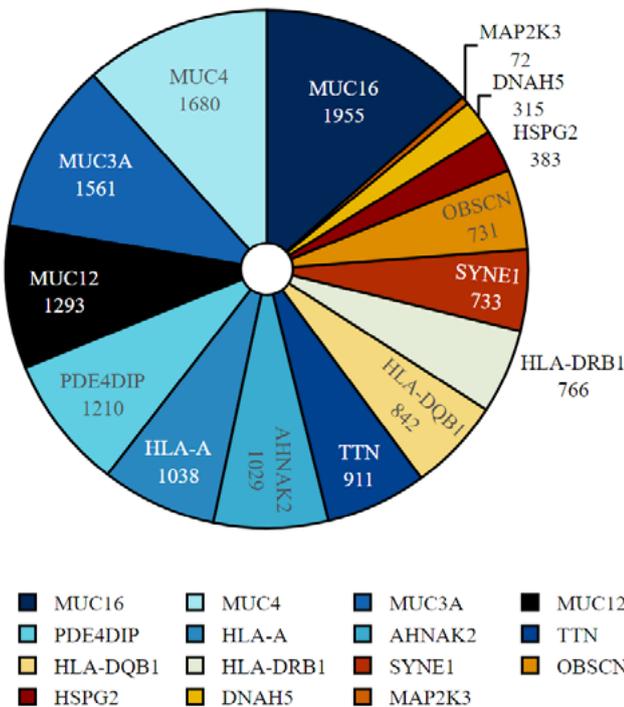


Рис. 2. Гены с наибольшим количеством вариантов у пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки полости рта.

Примечание: рисунок выполнен авторами.

Fig. 2. Genes having the largest number of variants in patients with oral mucosal leukoplakia.

Note: the figure was created by the authors.

Summary of Blood mutations in Oncology cohort.

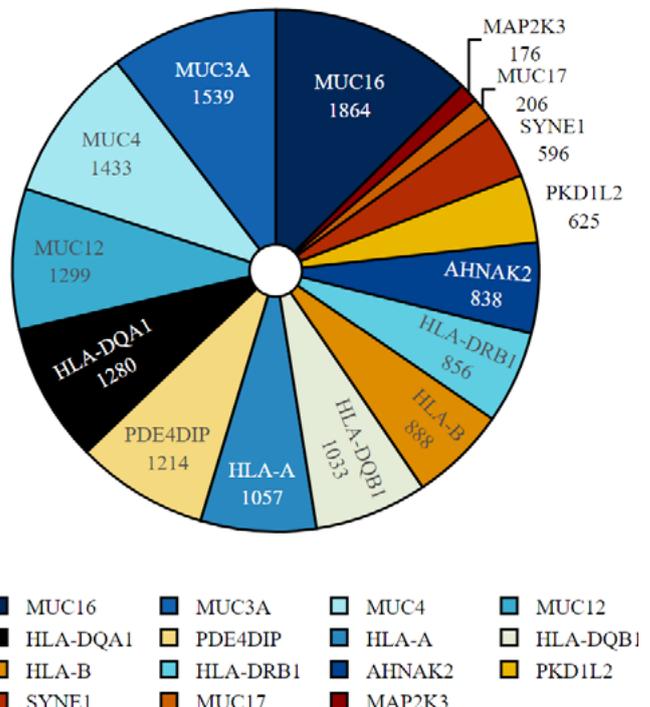


Рис. 3. Гены с наибольшим количеством вариантов у пациентов с плоскоклеточным раком слизистой оболочки ротовой полости.

Примечание: рисунок выполнен авторами.

Fig. 3. Genes having the largest number of variants in patients with oral mucosal squamous cell carcinoma.

Note: the figure was created by the authors.

Таблица 1. Статистическая значимость различий частоты встречаемости генетических вариантов в различных генах экзома в группах пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки полости рта и плоскоклеточным раком слизистой оболочки ротовой полости

Table 1. Statistical significance of differences in the occurrence frequency of genetic variants in different exome genes between the groups of patients with oral mucosal leukoplakia and squamous cell carcinoma

Ген	ЛСОРП		ПРСОРП		Стат. значимость различий по критерию $\chi^2, p$
	Количество генетических вариантов	% от общего количества генетических вариантов ( $n = 124\,475$ )	Количество генетических вариантов	% от общего количества генетических вариантов ( $n = 152\,767$ )	
MAP2K3	72	0,058	176	0,12	<0,0001*
SYNE1	733	0,59	596	0,39	<0,0001*
HLA-DRB1	766	0,62	856	0,56	0,059
HLA-DQB1	842	0,68	1033	0,68	0,99
AHNAK2	1029	0,83	838	0,55	<0,0001*
HLA-A	1038	0,83	1057	0,69	<0,0001*
PDE4DIP	1210	0,97	1214	0,79	<0,0001*
MUC12	1293	1,04	1299	0,85	<0,0001*
MUC3A	1561	1,25	1539	1,01	<0,0001*
MUC4	1680	1,35	1433	0,94	<0,0001*
MUC16	1955	1,57	1864	1,22	<0,0001*

Примечание: таблица составлена авторами; \* — разница статистически значима ( $p \leq 0,05$ ). Сокращения: ЛСОРП — лейкоплакия слизистой оболочки полости рта; ПРСОРП — плоскоклеточный рак слизистой оболочки ротовой полости.

Note. The table was compiled by the authors; \* — the difference is statistically significant ( $p \leq 0.05$ ). Abbreviations: OML — oral mucosal leukoplakia; OMSCC — oral mucosal squamous cell carcinoma.

групп пациентов. Оценка статистической значимости различий частоты встречаемости выявленных вариантов нуклеотидных последовательностей в идентичных генах между группами пациентов с ЛСОРП и ПРСОРП приведена в таблице 1.

Как следует из таблицы 1, в целом перечисленные выше генетические варианты значимо чаще встречаются у пациентов с ЛСОРП, чем в группе пациентов с ПРСОРП, но разница абсолютных и относительных показателей частоты встречаемости герминальных мутаций между представителями данных групп невелика, а статистическая значимость этих различий проистекает из большого общего количества выявленных генетических вариантов, ввиду чего указанная разница почти наверняка не имеет клинической значимости.

Обращает на себя внимание, что в обеих группах пациентов гены с наибольшим количеством выявленных вариантов (44,7 и 41,2% в группах пациентов с ЛСОРП и с ПРСОРП соответственно) — это гены *MUC3A*, *MUC4*, *MUC12* и *MUC16*, которые кодируют различные белки-муцины, играющие важную роль в формировании защитных слизистых барьеров на эпителиальных поверхностях, а также участвующие в обновлении и дифференцировке эпителия. Недостаточная продукция либо снижение функциональной активности муцинов может приводить к хроническому повреждению клеток эпителия СОП, что, в свою очередь, может служить триггерным фактором как кератоза (процесса, лежащего в основе лейкоплакии СОП), так и злокачественного перерождения эпителиоцитов [21–23].

## Дополнительные результаты исследования

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

## ОБСУЖДЕНИЕ

### Резюме основного результата исследования

Показано, что общее количество уникальных герминальных генетических вариантов в экзоме пациентов с обоими заболеваниями весьма велико — не менее 124 475 в группе пациентов с ЛСОРП и не менее 152 767 — в группе пациентов с ПРСОРП (в среднем по 11 688 измененных генов и  $\approx 33\,600$  генетических вариантов у каждого изученного пациента). Установлено, что большинство герминальных мутаций у пациентов из изученной выборки (как с ЛСОРП, так и с ПРСОРП) локализовано всего в 19 генах экзома: *MAP2K3*, *DNAH5*, *HSPG2*, *OBSCN*, *SYNE1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-A*, *HLA-B*, *PKD1L2*, *TTN*, *AHNAK2*, *PDE4DIP*, *MUC3A*, *MUC4*, *MUC12*, *MUC16*, *MUC17*. Наибольшее количество генетических вариантов у пациентов из обеих изученных клинических групп было выявлено в генах *MUC3A*, *MUC4*, *MUC12* и *MUC16*, ответственных за синтез семейства гликопротеидов-муцинов (44,7 и 41,2% в группах пациентов с ЛСОРП и с ПРСОРП соответственно). Муцины играют важную роль в формировании защитных слизистых барьеров на эпителиальных поверхностях и участвуют в обновлении и дифференцировке эпителия [24]. Недостаточная продукция либо снижение функциональной активности муцинов может приводить к хроническому повреждению клеток эпителия СОП, что, в свою очередь, может слу-

жить триггерным фактором как кератоза, так и злокачественного перерождения эпителиоцитов [25].

### Ограничения исследования

Невозможность существенно увеличить размер изученных выборок пациентов ввиду высокой стоимости исследования, из-за чего выявленные взаимосвязи между патогенными генетическими вариантами генов экзома и развитием ЛСОРП и ПРСОРП могут носить неоднозначный характер. В настоящем исследовании не изучались патогенные варианты регуляторных генов, а также эпигенетические модификации генов экзома на всех уровнях, что исключает анализ влияния указанных феноменов на развитие ЛСОРП и ПРСОРП. Высокая стоимость полноэкзомного 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 экзома и развитием изучаемых заболеваний.

### Интерпретация результатов исследования

Предварительный анализ полученных нами результатов показывает, что количество выявленных у пациентов с ЛСОРП и ПРСОРП вариантов генов экзома по сравнению с референсным геномом человека весьма велико, но, вероятно, большая часть этих вариантов относится к доброкачественным и не влияет на развитие изучаемых заболеваний. Тем не менее складывается впечатление, что большое количество выявляемых вариантов генов MUC3A, MUC4, MUC12 и MUC16 неслучайно: данные гены ответственны за образование муцинов, играющих важную роль в формировании защитных слизистых барьеров на эпителиальных поверхностях и участвующих

в обновлении и дифференцировке эпителия. Недостаточная продукция либо снижение функциональной активности муцинов может приводить к хроническому повреждению клеток эпителия СОРП, что, в свою очередь, может служить триггерным фактором как для развития кератоза и дисплазии, так и для злокачественного перерождения эпителиоцитов. Для оценки патогенности выявленных генетических вариантов и определения степени их ассоциации с развитием ЛСОРП и ПРСОРП необходим дальнейший биоинформационный анализ полученных данных секвенирования.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в Республике Беларусь выполнено высокопроизводительное полноэкзомное секвенирование образцов ДНК, выделенных из крови пациентов с ЛСОРП и ПРСОРП. В результате исследования установлено, что большинство герминальных мутаций у пациентов из изученной выборки локализовано всего в 19 генах экзома, но наибольшее количество генетических вариантов у пациентов из обеих изученных клинических групп было выявлено в генах MUC3A, MUC4, MUC12 и MUC16–44,7 и 41,2% в группах пациентов с ЛСОРП и с ПРСОРП соответственно. Муциновые гены кодируют эпителиальные белки семейства гликопротеидов-муцинов, играющие важную роль в формировании защитных слизистых барьеров на эпителиальных поверхностях, а также участвующие в обновлении и дифференцировке эпителия. Развитие анализируемых патологических процессов в слизистой оболочке ротовой полости может быть ассоциировано с патогенными вариантами таких генов, так как недостаточная продукция либо снижение функциональной активности муцинов может служить триггерным фактором как кератоза, так и злокачественного перерождения эпителиоцитов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hameed M. Molecular diagnosis of soft tissue neoplasia: clinical applications and recent advances. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2014; 14(8): 961–977. DOI: 10.1586/14737159.2014.946909
2. Chen M., Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum. Genomics.* 2019; 13(1): 34. DOI: 10.1186/s40246-019-0220-8
3. Acosta A.M., Al Rasheed M.R.H., Pins M.R., Borgen K.R., Panchal D., Rogozinska M., Wiley E.L., Behm F.G., Mohapatra G. The role of next-generation sequencing in the differential diagnosis of composite neoplasms. *Hum. Pathol.* 2018; 81: 78–88. DOI: 10.1016/j.humpath.2018.06.022
4. Kalavrezos N., Scully C. Mouth Cancer for Clinicians. Part 1: Cancer. *Dent. Update.* 2015; 42(3): 250–252, 255–256, 259–2560. DOI: 10.12968/denu.2015.42.3.250
5. Abati S., Bramati C., Bondi S., Lissoni A., Trimarchi M. Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020; 17(24): 9160. DOI: 10.3390/ijerph17249160
6. Ranganathan K., Kavitha L. Oral epithelial dysplasia: Classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders. *J. Oral. Maxillofac. Pathol.* 2019; 23(1): 19–27. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP\_13\_19
7. Mao L. NOTCH mutations: multiple faces in human malignancies. *Cancer Prev. Res (Phila).* 2015; 8(4): 259–261. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-15-0063
8. Gouvêa A.F., Santos Silva A.R., Speight P.M., Hunter K., Carlos R., Vargas P.A., de Almeida O.P., Lopes M.A. High incidence of DNA ploidy abnormalities and increased Mcm2 expression may predict malignant change in oral proliferative verrucous leukoplakia. *Histopathology.* 2013; 62(4): 551–562. DOI: 10.1111/his.12036
9. Zarate A.M., Don J., Secchi D., Carrica A., Galindez Costa F., Panico R., Brusa M., Barra J.L., Brunotto M. Study of the TP53 codon 72 polymorphism in oral cancer and oral potentially malignant disorders in Argentine patients. *Tumour. Biol.* 2017; 39(5): 1010428317699113. DOI: 10.1177/1010428317699113
10. Ribeiro I.P., Marques F., Barroso L., Rodrigues J., Caramelo F., Melo J.B., Carreira I.M. 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; 16(5): 6780–6786. DOI: 10.3892/mmr.2017.7428
11. Krishna A., Singh S., Singh V., Kumar V., Singh U.S., Sankhwar S.N. Does Harvey-Ras gene expression lead to oral squamous cell carcinoma? A clinicopathological aspect. *J. Oral. Maxillofac. Pathol.* 2018; 22(1): 65–72. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP\_246\_17
12. Chung C.M., Hung C.C., Lee C.H., Lee C.P., Lee K.W., Chen M.K., Yeh K.T., Ko Y.C. 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; 14(1): e0210901. DOI: 10.1371/journal.pone.0210901
13. Huss W.J., Hu Q., Glenn S.T., Gangavarapu K.J., Wang J., Luce J.D., Quinn P.K., Brese E.A., Zhan F., Conroy J.M., Paragh G., Foster B.A., Morrison C.D., Liu S., Wei L. Comparison of SureSelect and NexteraExome Capture Performance in Single-Cell Sequencing. *Hum. Hered.* 2018; 83(3): 153–162. DOI: 10.1159/000490506
14. Diaz-de Usera A., Lorenzo-Salazar J.M., Rubio-Rodríguez L.A., Muñoz-Barrera A., Guillen-Guio B., Marcelino-Rodríguez I.,

- García-Olivares V., Mendoza-Alvarez A., Corrales A., Íñigo-Campos A., González-Montelongo R., Flores C. Evaluation of Whole-Exome Enrichment Solutions: Lessons from the High-End of the Short-Read Sequencing Scale. *J. Clin. Med.* 2020; 9(11): 3656. DOI: 10.3390/jcm9113656
15. Corominas J., Smeekens S.P., Nelen M.R., Yntema H.G., Kamsteeg E.J., Pfundt R., Gilissen C. Clinical exome sequencing—Mistakes and caveats. *Hum. Mutat.* 2022; 43(8): 1041–1055. DOI: 10.1002/humu.24360
  16. Chalmers Z.R., Connelly C.F., Fabrizio D., Gay L., Ali S.M., Ennis R., Schrock A., Campbell B., Shlien A., Chmielecki J., Huang F., He Y., Sun J., Tabori U., Kennedy M., Lieber D.S., Roels S., White J., Otto G.A., Ross J.S., Garraway L., Miller V.A., Stephens P.J., Frampton G.M. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med.* 2017; 9(1): 34. DOI: 10.1186/s13073-017-0424-2
  17. Kanzi A.M., San J.E., Chimukangara B., Wilkinson E., Fish M., Ram-suram V., de Oliveira T. Next Generation Sequencing and Bioinformatics Analysis of Family Genetic Inheritance. *Front Genet.* 2020; 11: 544162. DOI: 10.3389/fgene.2020.544162
  18. Feltes B.C., Poloni J.F., Nunes L.J.G., Faria S.S., Dorn M. Multi-Approach Bioinformatics Analysis of Curated Omics Data Provides a Gene Expression Panorama for Multiple Cancer Types. *Front. Genet.* 2020; 11: 586602. DOI: 10.3389/fgene.2020.586602
  19. Fox A.J., Hiemenz M.C., Lieberman D.B., Sukhadia S., Li B., Grubb J., Candrea P., Ganapathy K., Zhao J., Roth D., Alley E., Loren A., Morrisette J.J. Next Generation Sequencing for the Detection of Actionable Mutations in Solid and Liquid Tumors. *J. Vis. Exp.* 2016; (115): 52758. DOI: 10.3791/52758
  20. 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. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw128
  21. Kashyap B., Kullaa A.M. Regulation of mucin 1 expression and its relationship with oral diseases. *Arch. Oral Biol.* 2020; 117: 104791. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2020.104791
  22. Kumar M.H., Sanjai K., Kumarswamy J., Keshavaiah R., Papaiah L., Divya S. Expression of MUC1 mucin in potentially malignant disorders, oral squamous cell carcinoma and normal oral mucosa: An immunohistochemical study. *J. Oral. Maxillofac. Pathol.* 2016; 20(2): 214–218. DOI: 10.4103/0973-029X.185916
  23. Villa A., Celentano A., Glurich I., Borgnakke W.S., Jensen S.B., Peterson D.E., Delli K., Ojeda D., Vissink A., Farah C.S. World Workshop on Oral Medicine VII: Prognostic biomarkers in oral leukoplakia: A systematic review of longitudinal studies. *Oral. Dis.* 2019; 25 Suppl 1: 64–78. DOI: 10.1111/odi.13087
  24. Bhatia R., Gautam S.K., Cannon A., Thompson C., Hall B.R., Aithal A., Banerjee K., Jain M., Solheim J.C., Kumar S., Batra S.K. Cancer-associated mucins: role in immune modulation and metastasis. *Cancer Metastasis. Rev.* 2019; 38(1–2): 223–236. DOI: 10.1007/s10555-018-09775-0
  25. Kasprzak A., Adamek A. Mucins: the Old, the New and the Promising Factors in Hepatobiliary Carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(6): 1288. DOI: 10.3390/ijms20061288

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**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 ордена Дружбы народов медицинский университет».

**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/0000-0001-9991-7034>

**Рубникович Сергей Петрович** — доктор медицинских наук, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси; профессор; ректор учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

**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>

**Мазур Оксана Чеславовна** — научный сотрудник лаборатории экологической генетики и биотехнологии государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси».

**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>

**Жильцов Иван Викторович** — доктор медицинских наук, профессор; заведующий кафедрой доказательной медицины и клинической диагностики факультета повышения квалификации

и переподготовки кадров учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

**Ivan V. Zhylytsov** — 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>

**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 ордена Дружбы народов медицинский университет».

**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>

**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».

**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>