

Асинхронная репликация генов *AURKA* и *TP53* у больных солитарным раком желудка и больных с полинеоплазиями

В.В. Цепенко, Г.Ф. Михайлова, Т.Г. Шкаврова, Е.В. Голуб, Г.О. Рухадзе, В.Ю. Скоропад

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249031 Обнинск, ул. Королева, 4

Контакты: Виктория Викторовна Цепенко mgp@mrrc.obninsk.ru

Введение. Правильная репликация генома важна для нормального клеточного деления как гарантия неизменности передачи генетической информации. ДНК-репликация является строго регулируемым и синхронизированным процессом, нарушения в котором могут приводить к возникновению мутаций. Нарушения во времени ДНК-репликации влияют на экспрессию генов, вызывают изменения в эпигенетических модификациях и влияют на увеличение частоты структурных перестроек, что приводит к нестабильности генома. Нарушения во времени репликации (асинхронная репликация) часто сопровождают развитие рака.

Цель исследования – изучение встречаемости лимфоцитов периферической крови с асинхронной репликацией генов *AURKA* и *TP53* у больных раком желудка и больных с полинеоплазиями.

Материалы и методы. Асинхронность репликации генов *AURKA* и *TP53* определяли методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) в лимфоцитах периферической крови. Интерфазный FISH-анализ был выполнен у 37 здоровых доноров, 19 больных с неопухоловой патологией желудочно-кишечного тракта, 68 больных солитарным раком желудка и 39 пациентов с полинеоплазиями, т. е. с раком желудка и второй синхронной или метасинхронной опухолью.

Результаты. Доля лимфоцитов с асинхронной репликацией гена *AURKA* составила $19,8 \pm 0,5$ % для контрольной группы, $24,7 \pm 0,4$ % для группы с неопухоловой патологией, $32,5 \pm 0,5$ % для группы больных раком желудка и $39,5 \pm 0,6$ % для группы с полинеоплазиями; для гена *TP53* – $17,3 \pm 0,5$; $19,5 \pm 0,7$; $26,1 \pm 0,7$ и $32,5 \pm 0,6$ % соответственно. Различия между всеми обследованными группами были статистически значимы по обоим исследованным генам ($p < 0,01$). Больные раком желудка с метастазами имели большую долю лимфоцитов с асинхронной репликацией гена *AURKA*, чем пациенты без метастазов ($34,4 \pm 1,0$ % против $31,7 \pm 0,6$; $p = 0,02$).

Заключение. Высокий уровень лимфоцитов с асинхронной репликацией у онкологических больных может быть потенциальным маркером второй опухоли или возможного метастатического процесса, в том числе и на начальном уровне.

Ключевые слова: рак желудка, полинеоплазия, асинхронная репликация, ген *AURKA*, ген *TP53*, интерфазная флуоресцентная *in situ* гибридизация

Для цитирования: Цепенко В.В., Михайлова Г.Ф., Шкаврова Т.Г. и др. Асинхронная репликация генов *AURKA* и *TP53* у больных солитарным раком желудка и больных с полинеоплазиями. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(2):42–7.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-2-42-47

Asynchronous replication of *AURKA* and *TP53* genes in gastric cancer patients and patients with multiple tumors

V.V. Tsepenco, G.F. Mikhailova, T.G. Shkavrova, E.V. Goloub, G.O. Rukhadze, V.Yu. Skoropad

A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 4 Koroleva St., Obninsk 249031, Russia

Background. The correct genome replication is essential for normal cell division to guarantee that genetic information comes changeless through the next cells generations. DNA replication is a strictly regulated and synchronous process and its disturbances could result to mutations appearances. Aberrant time of DNA replication affects on gene expression causes changes of epigenetic modifications and influences on increasing the structural rearrangements leading to enhanced genome disbalance. Replication time failure as asynchronous replication is common for cancerogeneses.

The objective of our study was the assessment of asynchronous replication levels in patients with gastric cancer and patients with multiple tumors.

Materials and methods. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was used for the asynchronous replication of *AURKA* and *TP53* genes analyses. Interphase FISH on lymphocytes of peripheral blood of 37 healthy donors, 19 patients with non-cancer gastrointestinal pathologies, 68 patients with solitary gastric cancer and 39 patients with multiple tumors having gastric cancer and other second synchronous or metachronous tumor was carried out.

Results. Values of lymphocytes with asynchronous replication for *AURKA* were 19.8 ± 0.5 % for control group, 24.7 ± 0.4 % for non-cancer patients, 32.5 ± 0.5 % for gastric cancer patients, 39.5 ± 0.6 % for patients with multiple tumors and 17.3 ± 0.5 , 19.5 ± 0.7 , 26.1 ± 0.7 and 32.5 ± 0.6 % for *TP53* respectively. Differences between cell populations of examined groups had statistical significance with $p < 0.01$ for both studied gene. Also there was statistical difference between gastric cancer patients having distant metastases and gastric cancer patients without metastases for *AURKA* (34.4 ± 1.0 % vs. 31.7 ± 0.6 %; $p = 0.02$).

Conclusion. High lymphocytes with asynchronous replication level in oncological patients could serve as potential marker of second tumor or possible metastatic process including the earliest stage of it.

Key words: gastric cancer, multiple tumor, asynchronous replication, *AURKA*, *TP53*, interphase fluorescence in situ hybridization

For citation: Tsepenko V.V., Mikhailova G.F., Shkavrova T.G. et al. Asynchronous replication of *AURKA* and *TP53* genes in gastric cancer patients and patients with multiple tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(2):42–7.

Введение

Одна из характеристик злокачественной трансформации — неконтролируемый клеточный рост, причиной которого часто является накопление генетических нарушений, вызванных повышенным мутагенезом и нестабильностью генома [1]. Поэтому правильная репликация генома важна для нормального клеточного деления как гарантия, что генетическая информация в неизменном виде перейдет в следующее клеточное поколение. ДНК-репликация является строго регулируемым процессом, в результате которого большая часть гомологичных локусов в геноме реплицирует в одно время, т. е. синхронно. Нарушения времени репликации могут приводить к раскоординации процесса и репликационному стрессу, т. е. к замедлению, замиранию или остановке репликационной вилки, что, в свою очередь, приводит к возникновению мутаций [2]. Нарушения во времени ДНК-репликации влияют на экспрессию генов, вызывают изменения в эпигенетических модификациях и влияют на увеличение частоты структурных перестроек. Это, в свою очередь, приводит к повышенной дестабилизации генома [3–5].

Результаты многочисленных исследований указывают на то, что нарушения во времени репликации — асинхронная репликация — часто сопровождают развитие рака. В случае солидных опухолей нарушение синхронности репликации может наблюдаться не только в клетках опухолевой ткани, но и в нормальных клетках, например в лимфоцитах периферической крови [6].

Рак желудка (РЖ) занимает одну из лидирующих позиций в структуре смертности от онкологических заболеваний в мире и в частности в России [7]. Мировые тенденции, направленные на раннее выявление и диагностику заболевания, позволяют улучшить эффективность лечения и увеличить долговременную выживаемость. Другая сторона такой эффективности — повышающийся риск появления вторых опухолей. Приблизительно у 5–7 % пациентов с РЖ развиваются вторые синхронные или метакронные опухоли [8–10]. Поэтому важно выявлять пациентов, имеющих тенденцию к образованию вторых опухолей, которым требуются более тщательное наблюдение в последующий после лечения период [8]. Наличие дополнительных факторов, позволяющих формировать группы риска, будет полезным для клинической практики. В этом случае оценка уровня лимфоцитов с асинхронной репликацией (ЛАР) может быть полезна, предоставляя дополнительную информацию о нестабильности генома.

Цель исследования — изучение встречаемости в периферической крови ЛАР генов *AURKA* и *TP53* у больных солитарным РЖ и больных с полинеоплазиями.

Материалы и методы

Группа обследованных лиц. В исследование были включены больные с неопухоловой патологией желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), больные солитарным РЖ и больные с полинеоплазиями.

В контрольную группу вошли 37 клинически здоровых доноров (21 мужчина и 16 женщин) в возрасте 21–70 лет (средний возраст 34 года). В группу больных с неопухоловой патологией были включены 19 человек (7 мужчин и 12 женщин) в возрасте 24–77 лет (средний возраст 51 год) со следующими диагнозами: желчно-каменная болезнь, холецистит, язва желудка, хронический панкреатит, гастрит. В группу больных солитарным РЖ были включены 68 человек (42 мужчины и 26 женщин) в возрасте 34–82 лет (средний возраст 62 года). В группу больных с полинеоплазиями были включены 39 человек (22 мужчины и 17 женщин) в возрасте 48–85 лет (средний возраст 68 лет), имевшие РЖ и вторые синхронные или метакронные опухоли; стадия заболевания варьировала от IA до IV.

Исследованные гены. Протоонкоген *AURKA* расположен в локусе 20q13.2. Вырабатываемый этим геном белок АуогоаА из семейства тирозинкиназ играет критическую роль в регуляции митотических событий, таких как сборка веретена деления, функционирование centrosом и цитоскелета, а также процесса цитокинеза. В дополнение он играет ключевую роль в передаче сигналов от поврежденной ДНК к разнообразным эффекторам, включая сигнальный путь p53/TP53 и частично сигнальные пути, критические для онкогенной трансформации клеток. Сверхэкспрессия АуогоаА подавляет экспрессию *BRCA1/2*, *ATR/CHK1*, p53, *RAD51* и ряда других, тем самым инактивируя сигнальный путь ATM, при этом не происходит полноценной активации чекпойнтов и остановки клеточного цикла в фазах G1, S или G2. В свою очередь, это приводит к нарушениям реакций клетки на повреждения ДНК, что в том числе может выражаться в химио- и радиорезистентности опухолевых клеток [11].

Ген-супрессор *TP53* расположен в локусе 17p13.1. Кодированный им белок p53 отвечает за реакцию на разнообразные клеточные стрессы, такие как повреждение ДНК, активация онкогенов, гипоксия, оксидативный стресс, вирусная инфекция, гипо- и гипертермия. Воздействуя на гены-мишени, связанные с *TP53*, p53 индуцирует защитные механизмы, такие как остановка

клеточного цикла, апоптоз, старение, ДНК-репарация или изменения метаболизма. Нарушение корректного функционирования гена *TP53* ведет к нарушению экспрессии белка p53. Мутации в гене *TP53* наблюдаются при многих онкологических заболеваниях, включая наследственные формы рака. В настоящее время общепризнано, что функциональная недостаточность гена *TP53* приводит к дестабилизации генома и возникновению рака [12].

Метод интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH) на лимфоцитах периферической крови. Образцы венозной крови (4–6 мл) забирали с помощью вакуумной системы, содержащей Li-гепарин в концентрации 12–30 МЕ на 1 мл крови. Цельную кровь разбавляли (1:9) теплым (+37 °C) раствором KCl (550 мг/110 мл) и помещали в термостат (+37 °C) на 30 мин. Затем проводили фиксацию клеток в смеси метанол/уксусная кислота (3:1). Клеточную суспензию (20–30 мкл) наносили на предварительно замороженные очищенные предметные стекла. В работе были использованы коммерческие наборы ДНК-зондов фирм Vysis (США) и Kreatech (Нидерланды) для генов *AURKA* и *TP53*. Пред- и постгибридизационные отмывки проводили в соответствии с инструкцией производителя. Для денатурации и гибридизации использовали гибридайзер Thermobrite (StatSpin, США).

Анализ и статистическая обработка. Анализ препаратов выполняли независимо двумя исследователями на флуоресцентном микроскопе AxioImager A-2 (Carl Zeiss, Германия) с набором фильтров DAPI, Orange/Green, Gold (Vysis, США). Для каждого образца крови анализировали 300–900 интерфазных клеток с четкими сигналами (рис. 1).

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартных методов статистического анализа с использованием Microsoft Office Excel (2003). Полученные данные были объединены в вариационные ряды, для которых рассчитывали среднее арифметическое, стандартное отклонение, стандартную ошибку

среднего. Во всех исследованных группах распределения показателей были близки к нормальным. Совокупности были однородными. Оценку достоверности различий среднегрупповых показателей проводили по двустороннему t-критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Асинхронная репликация в контрольной группе и группе больных с неопухоловой патологией. В качестве контроля в исследование были взяты образцы крови клинически здоровых доноров, было проанализировано 11 604 клетки для гена *AURKA* и 11 810 клеток для гена *TP53*. Доля ЛАР в группе варьировала от 13,7 до 23,8 % для гена *AURKA* и от 11,7 до 23,1 % для гена *TP53*. Среднегрупповой показатель доли ЛАР гена *AURKA* составил $19,8 \pm 0,5$ % ($\sigma = 2,8$), гена *TP53* – $17,3 \pm 0,5$ % ($\sigma = 2,8$). Сравнение среднегрупповых величин исследованных генов показало, что различие между ними было статистически значимо ($p = 7,2 \times 10^{-4}$): уровень ЛАР для гена *AURKA* был выше, чем для гена *TP53*.

В группе больных с неопухоловой патологией было проанализировано 5776 клеток для гена *AURKA* и 5680 клеток для гена *TP53*. Доля ЛАР гена *AURKA* варьировала от 21,2 до 27,7 % и в среднем по группе составила $24,7 \pm 0,4$ % ($\sigma = 1,9$). Для гена *TP53* доля ЛАР варьировала от 13,0 до 25,3 % и в среднем по группе составила $19,5 \pm 0,7$ % ($\sigma = 3$). Как и в контрольной группе, различие между среднегрупповыми показателями доли ЛАР исследованных генов было статистически значимо ($p = 10^{-4}$): доля ЛАР гена *AURKA* была выше доли ЛАР гена *TP53*. Кроме этого, среднегрупповой показатель ЛАР в группе больных с неопухоловой патологией был выше, чем в контрольной группе для обоих исследованных генов ($p = 10^{-4}$ и $p = 0,01$ соответственно).

Асинхронная репликация исследованных генов у больных солитарным РЖ. В группе больных солитарным

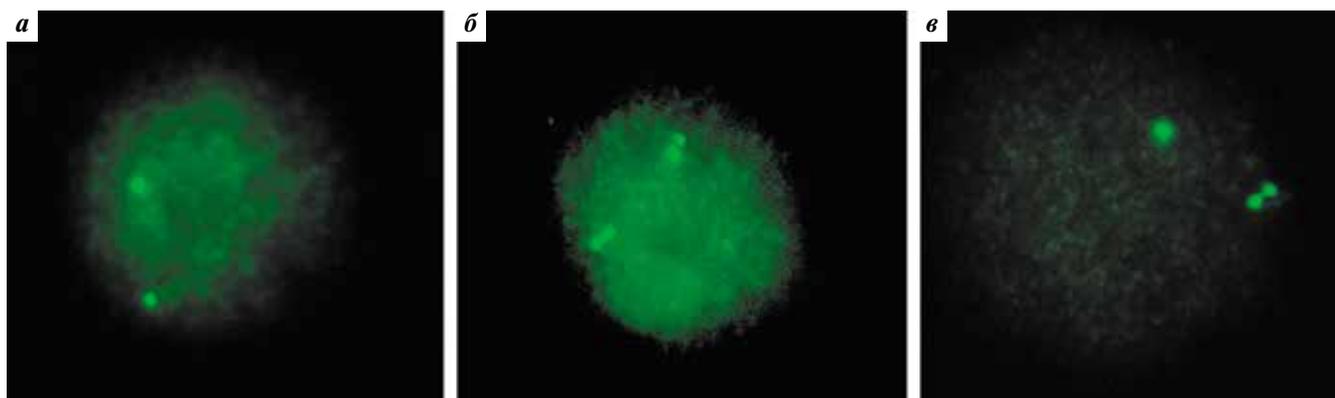


Рис. 1. Статус репликации гена *AURKA*: а – лимфоцит периферической крови с еще не реплицированной ДНК, видны 2 одиночных сигнала (*SS*-клетка); б – лимфоцит периферической крови с реплицированной ДНК, видны 2 двойных сигнала (*DD*-клетка); в – лимфоцит периферической крови с асинхронной репликацией, виден 1 одиночный и 1 двойной сигнал (*SD*-клетка)

Fig. 1. DNA replication status of gene *AURKA*: a – peripheral blood lymphocyte with non replicated DNA shown two single signals (*SS* cell); б – lymphocyte with replicated DNA shown two double signals (*DD* cell); в – lymphocyte with asynchronous replication shown one single and one double signal (*SD* cell)

РЖ было проанализировано 21 365 клеток для гена *AURKA* и 20 071 клетка для гена *TP53*. Доля ЛАР гена *AURKA* колебалась от 22,0 до 42,0 %, гена *TP53* – от 18,3 до 38,9 %. Среднегрупповой уровень ЛАР гена *AURKA* составил $32,5 \pm 0,5$ % ($\sigma = 4,2$), гена *TP53* – $26,1 \pm 0,5$ % ($\sigma = 4,1$). Доля ЛАР гена *AURKA* была выше, чем таковая гена *TP53* ($p = 10^{-4}$). Также наблюдались статистически значимые различия между среднегрупповыми показателями ЛАР у больных солитарным РЖ, больных с неопухолевыми патологиями и в контрольной группе для обоих исследованных генов. Доля ЛАР гена *AURKA* в группе больных солитарным РЖ была выше доли ЛАР как в контрольной группе ($p = 10^{-4}$) с высоким уровнем значимости, так и у больных с неопухолевой патологией ($p = 10^{-4}$). Аналогичные результаты были получены и для гена *TP53* ($p = 10^{-4}$).

В группе больных РЖ была выделена подгруппа ($n = 16$) с клинически установленным наличием метастазов. Данная подгруппа имела среднегрупповой показатель доли ЛАР гена *AURKA* ($34,4 \pm 1,0$ %; $\sigma = 3,8$) выше, чем в подгруппе ($n = 52$) больных РЖ без метастазов ($31,7 \pm 0,6$ %; $\sigma = 4,2$). Это превышение было статистически значимо ($p = 0,024$). Для гена *TP53* различий в подгруппах не наблюдалось ($p = 0,488$).

Асинхронная репликация исследованных генов у больных с полинеоплазиями. В группе больных с полинеоплазиями было проанализировано 11 804 клетки для гена *AURKA* и 11 396 клеток для гена *TP53*. Доля ЛАР колебалась от 31,3 до 45,6 % для гена *AURKA* и от 21,0 до 44,4 % для гена *TP53*. Среднегрупповой показатель ЛАР гена *AURKA* составил $39,5 \pm 0,6$ % ($\sigma = 3,8$), гена *TP53* – $32,5 \pm 0,6$ % ($\sigma = 3,9$). Доля ЛАР гена *AURKA* была выше, чем доля ЛАР гена *TP53* ($p = 10^{-4}$). Статистический анализ показал, что среднегрупповые показатели ЛАР обоих исследованных генов были значимо ($p = 10^{-4}$) выше по сравнению с таковыми в контрольной группе, группе больных с неопухолевой патологией ЖКТ и группе больных солитарным РЖ.

Обсуждение

Анализ данных литературы [6] продемонстрировал, что исследования доли ЛАР генов *TP53*, *RBI*, *AML1*, *C-MYC*, *HER-2/neu*, проведенные у больных с солидными опухолями, такими как рак предстательной железы, почечно-клеточная карцинома, рак молочной железы, а также сравнение с долей ЛАР этих генов у здоровых лиц показали, что контрольные группы характеризуются уровнем ЛАР, не превышающим 20 %, в то время как больные с солидными опухолями демонстрируют уровни ЛАР, превышающие 30 %. Кроме этого, больные с так называемыми предраковыми заболеваниями, такими как нейрофиброматоз 1-го типа, цирроз печени или полицитемия, также имеют более высокую долю ЛАР по сравнению со здоровыми донорами, но этот уровень остается значимо ниже, чем у онкологических больных. Полученные нами данные хорошо согласуются с результатами работ других

исследователей. В нашем исследовании доля ЛАР генов *AURKA* и *TP53* была самой низкой в контрольной группе, повышена в группе больных с неопухолевой патологией ЖКТ и значительно повышена в группах больных солитарным РЖ и больных с полинеоплазиями (рис. 2). Кроме этого, группа пациентов с 2 опухолями и более имела статистически значимое ($p < 0,01$) превышение доли ЛАР по обоим исследованным генам по сравнению с группой пациентов, имеющих одну опухоль. В группе больных с полинеоплазиями мы не наблюдали различий в уровнях ЛАР у больных с метастатическими и синхронными опухолями. Следует отметить, что больные с множественными опухолями имели высокие уровни ЛАР даже в случаях большого промежутка времени между появлением первой и второй опухоли (10 лет и более). Также больные солитарным РЖ с отдаленными метастазами имели более высокий уровень ЛАР гена *AURKA*, чем больные без метастазов.

Вероятно, высокие уровни нарушения синхронности репликации в лимфоцитах периферической крови являются отражением процессов, приводящих к геномной нестабильности в организме онкологических больных, проявляющихся в виде либо второй опухоли, либо метастазирования. В нашем исследовании статистически значимые различия между подгруппами с метастазами и без метастазов наблюдались для гена *AURKA*, являющегося протоонкогеном, в то время как для гена-супрессора *TP53* этих различий не отмечалось.

Известно, что *AuogoA* имеет высокие уровни экспрессии при различных солидных раках, таких как рак молочной железы, яичников, прямой кишки, РЖ [13]. Авторами показано, что высокие уровни экспрессии связаны с низкой выживаемостью и плохим прогнозом. Кроме этого, сверхэкспрессия *AuogoA* считается ранним критическим событием при развитии инвазивных форм рака молочной железы. В настоящее время связь нарушений во времени репликации с канцерогенезом остается до конца не изученной. Однако известно, что отдельные онкогены могут оказывать влияние на время репликации. Например, ген *C-MYC* вовлечен в процесс репликации, и нарушение его работы может приводить к преждевременной инициации точек начала репликации, тем самым приводя к обширным изменениям в программе времени репликации [2].

Таким образом, можно предположить, что оценка уровня асинхронности репликации протоонкогенов может быть информативна, особенно на ранних этапах канцерогенеза. Мы предполагаем, что высокий уровень ЛАР у онкологических больных может быть потенциальным маркером второй опухоли или возможного метастатического процесса, в том числе на начальном этапе. Данное предположение требует подтверждения проведением динамического наблюдения онкологических больных после лечения. Также не вызывает сомнения, что больные РЖ, особенно молодого

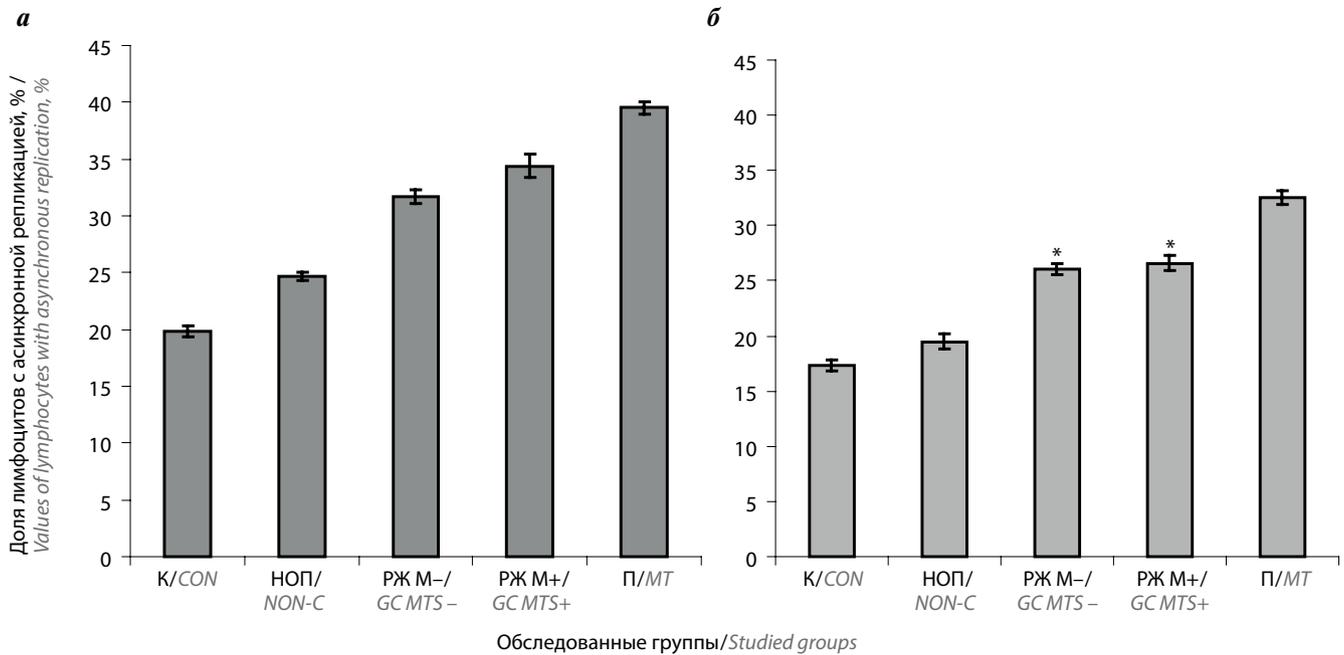


Рис. 2. Среднегрупповые показатели ($M \pm m$) доли лимфоцитов с асинхронной репликацией генов *AURKA* (а) и *TP53* (б) в обследованных группах. К – контрольная группа здоровых доноров; НОП – пациенты с неопухолевой патологией желудочно-кишечного тракта; РЖ М– – больные солитарным РЖ без метастазов; РЖ М+ – больные солитарным РЖ с подтвержденным наличием метастазов; П – больные с полинеоплазиями. Различия среднегрупповых показателей были достоверны ($p < 0,05$) для всех сравниваемых групп по исследованным генам, кроме отмеченных звездочкой

Fig. 2. Average group values ($M \pm m$) of lymphocytes with asynchronous replication for genes *AURKA* (a) and *TP53* (b) in studied groups: CON – control group of healthy donors; NON-C – patients with non-cancer gastrointestinal pathologies; GC MTS– – patients with solitary gastric cancer without metastases; GC MTS+ – patients with solitary gastric cancer having distant metastases; MT – patients with multiple tumors having gastric cancer and other second synchronous or metachronous tumor. Statistical differences between average group values were significant ($p < 0.05$) for all examined groups except “*” marked

возраста, нуждаются в последующем наблюдении после лечения для раннего выявления возможного возникновения вторых опухолей.

Заключение

В группах больных солитарным РЖ и больных с полинеоплазиями наблюдаются более высокие уровни ЛАР генов *AURKA* и *TP53* по сравнению с группами здоровых лиц и больных с неопухолевой патологией ЖКТ. Кроме этого, группа больных с полинеоплазиями характеризуется более высоким уровнем ЛАР по обоим исследованным генам по сравнению с группой больных солитарным РЖ. Это свидетельствует о большей ге-

номной нестабильности в группе больных с полинеоплазиями, которая проявляется в виде второй опухоли.

Группа больных солитарным РЖ, имеющих отдаленные метастазы, демонстрирует более высокий уровень ЛАР гена *AURKA* по сравнению с группой больных солитарным РЖ без метастазов. Следовательно, высокая доля ЛАР гена *AURKA* у больных солитарным РЖ может быть потенциальным указателем на наличие процессов метастазирования. Однако данное предположение требует проведения дальнейших исследований.

Для гена *AURKA*, являющегося протоонкогеном, наблюдалась более высокая встречаемость ЛАР по сравнению с геном-супрессором *TP53*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Blumenfeld B., Ben-Zimra M., Simon I. Perturbations in the replication program contribute to genomic instability in cancer. *Int J Mol Sci* 2017;18(6):1138. DOI: 10.3390/ijms18061138.
- Donley N., Thayer M.J. DNA replication timing, genome stability and cancer: late and/or delayed DNA replication timing is associated with increased genomic instability. *Semin Cancer Biol* 2013;23(2):80–9. DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.01.001.
- Farkash-Amar Sh., Itamar S. Genome-wide analysis of the replication program in mammals. *Chromosome Res* 2010;18:115–25. DOI: 10.1007/s10577-009-9091-5.
- Ryba T., Battaglia D., Chang B.H. et al. Abnormal developmental control of replication-timing domains in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Res* 2012;22(10):1833–44. DOI: 10.1101/gr.138511.112.
- Михайлова Г.Ф., Цепенко В.В., Шкаврова Т.Г., Голуб Е.В. Асинхронная репликация у онкологических больных. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(1):26–34. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-1-26-34. [Mikhailova G.F., Tsepenco V.V., Shkavrova T.G.,

- Goloub E.V. Asynchronous replication in oncological patients. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(1):26–34. (In Russ.).
7. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 250 с. [Malignant tumors in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS radiologii” Minzdrava Rossii, 2018. 250 p. (In Russ.).]
 8. Kim J.W., Jang J.Y., Chang Y.W., Kim Y.H. Clinical features of second primary cancers arising in early gastric cancer patients after endoscopic resection. *World J Gastroenterol* 2015;21(27):8358–65. DOI: 10.3748/wjg.v21.i27.8358.
 9. Ławniczak M., Gawin A., Jaroszewicz-Heigelmann H. et al. Synchronous and metachronous neoplasms in gastric cancer patients: a 23-year study. *World J Gastroenterol* 2014;20(23):7480–7. DOI: 10.3748/wjg.v20.i23.7480.
 10. Chirila N.D., Turdeanu N.A., Constantea N.A. et al. Multiple malignant tumors. *Chirurgia* 2013;108(4):498–502.
 11. Katsha A., Belkhiri A., Goff L., El-Rifai W. Aurora kinase A in gastrointestinal cancers: time to target. *Molecular Cancer* 2015;14:106. DOI 10.1186/s12943-015-0375-4.
 12. Алмазов В.П., Кочетков Д.В., Чумаков П.М. p53 – инструмент для терапии злокачественных заболеваний человека. *Молекулярная биология* 2007;41(6):947–63. [Almazov V.P., Kochetkov D.V., Chumakov P.M. The use of p53 as a tool for therapy of human cancer. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2007;41(6):947–63. (In Russ.).]
 13. Zhu X., Mei J., Wang Zh. AuroraA kinase: potential tumor marker of osteosarcoma. *J Can Res Ther* 2014;10(2):102–7. DOI: 10.4103/0973-1482.145804.

Вклад авторов

В.В. Цепенко: анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Г.Ф. Михайлова: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме исследования;
 Т.Г. Шкаврова, Е.В. Голуб, Г.О. Рухадзе: получение данных для анализа;
 В.Ю. Скоропад: формирование групп пациентов, получение данных для анализа.

Authors' contributions

V.V. Tsepenko: analysis of the obtained data, article writing;
 G.F. Mikhailova: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme;
 T.G. Shkavrova, E.V. Goloub, G.O. Rukhadze: obtaining data for analysis;
 V.Yu. Skoropad: forming patient groups, obtaining data for analysis.

ORCID авторов/ORCID of authors

В.В. Цепенко/V.V. Tsepenko: <https://orcid.org/0000-0002-5278-0809>
 Т.Г. Шкаврова/T.G. Shkavrova: <https://orcid.org/0000-0002-7950-2585>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.