

# АСИНХРОННАЯ РЕПЛИКАЦИЯ БИАЛЛЕЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ГЕНОВ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ПРИЗНАК ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

DOI: 10.17691/stm2021.13.3.04

УДК 612.112.94+616–006–07

Поступила 25.08.2020 г.



**В.В. Цепенко**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетической патологии клинично-морфологического отдела;

**Т.Г. Шкаврова**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетической патологии клинично-морфологического отдела;

**В.Н. Черкесов**, к.м.н., зав. лабораторией контроля качества медицинской помощи;

**Е.В. Голуб**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетической патологии клинично-морфологического отдела;

**Г.Ф. Михайлова**, д.б.н., зав. лабораторией молекулярно-генетической патологии клинично-морфологического отдела

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, ул. Королева, 4, Обнинск, 249036

**Цель исследования** — изучить уровень лимфоцитов с асинхронной репликацией генов (АРГ) для генов *AURKA* и *TP53* у онкологических и онкологических больных с различными нозологиями и оценить их диагностические возможности.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось на лимфоцитах периферической крови. В контрольную группу вошли 70 человек: клинично здоровые доноры и больные с неонкологическими заболеваниями, такими как гастрит, панкреатит, хронический калькулезный холецистит, бронхиальная астма, язвенная болезнь, паховая грыжа, артроз, миома, гепатит, эпилепсия, хронический простатит, хронический тонзиллит и аденома прямой кишки. В группу онкологических больных вошли 219 человек с различными нозологиями: рак желудка ( $n=68$ ), колоректальный рак ( $n=30$ ), хронический лимфоцитарный лейкоз ( $n=52$ ), лимфома Ходжкина ( $n=33$ ), полинеоплазии ( $n=41$ ). Работу выполняли методом интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с использованием коммерческих наборов ДНК-зондов для генов *AURKA* и *TP53* (Vysis, США и Kreatech, Нидерланды).

**Результаты.** В контрольной группе средняя частота лимфоцитов с АРГ составила  $22,0\pm 3,4\%$  для гена *AURKA* и  $18,0\pm 3,2\%$  — для гена *TP53*, в группе онкобольных —  $36,8\pm 4,8$  и  $28,4\pm 5,1\%$  соответственно. Превышение средней частоты лимфоцитов с АРГ для обоих исследованных генов в группе онкобольных было статистически значимо ( $p<0,0001$ ) по сравнению с контрольной группой. Оценка информативности предлагаемого метода при выявлении онкологических заболеваний для гена *AURKA* показала чувствительность  $98,6\pm 0,7\%$ , специфичность 100%, точность  $98,3\pm 0,8\%$  и для гена *TP53* —  $78,6\pm 3,1$ ;  $98,5\pm 0,9$  и  $85,9\pm 2,6\%$  соответственно.

**Заключение.** Данное пилотное исследование уровня лимфоцитов с АРГ для генов *AURKA* и *TP53* у онкологических больных может служить базой для создания новой молекулярно-цитогенетической технологии выявления злокачественных новообразований у человека.

**Ключевые слова:** асинхронная репликация ДНК; флуоресцентная *in situ* гибридизация; FISH; лимфоциты периферической крови; *AURKA*; *TP53*; диагностика злокачественных новообразований.

**Как цитировать:** Tsepenco V.V., Shkavrova T.G., Cherkesov V.N., Golub E.V., Mikhailova G.F. Asynchronous DNA replication of biallelically expressed genes in human peripheral blood lymphocytes as a prognostic sign of cancer. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2021; 13(3): 33–40, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.3.04>

**Для контактов:** Цепенко Виктория Викторовна, e-mail: [mgr@mrrc.obninsk.ru](mailto:mgr@mrrc.obninsk.ru)

## Asynchronous DNA Replication of Biallelically Expressed Genes in Human Peripheral Blood Lymphocytes as a Prognostic Sign of Cancer

**V.V. Tsepenko**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Genetic Pathology, Department of Clinical Morphology;

**T.G. Shkavrova**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Genetic Pathology, Department of Clinical Morphology;

**V.N. Cherkesov**, MD, PhD, Head of the Laboratory for Quality Control of Medical Care;

**E.V. Golub**, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Molecular and Genetic Pathology, Department of Clinical Morphology;

**G.F. Mikhailova**, DSc, Head of the Laboratory of Molecular and Genetic Pathology, Department of Clinical Morphology

A. Tsyb Medical Radiological Research Centre — Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 4 Korolev St., Obninsk, 249036, Russia

**The aim of the study** was to identify and quantify lymphocytes with asynchronous replication of the *AURKA* and *TP53* genes in cancer patients versus controls and to assess the diagnostic capabilities of this approach.

**Materials and Methods.** The study was carried out with peripheral blood lymphocytes probed for the *AURKA* and *TP53* genes using the interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) method (Vysis, USA and Kreotech, The Netherlands). The control group included 70 people: clinically healthy donors and patients with non-oncological diseases such as gastritis, pancreatitis, chronic calculous cholecystitis, bronchial asthma, peptic ulcer disease, inguinal hernia, arthrosis, myoma, hepatitis, epilepsy, chronic prostatitis, chronic tonsillitis, and rectal adenoma. The group of cancer patients included 219 people with various oncological diseases: gastric cancer (n=68), colorectal cancer (n=30), chronic lymphocytic leukemia (n=52), Hodgkin lymphoma (n=33), and polyneoplasia (n=41).

**Results.** In the control group, the mean frequency of lymphocytes with asynchronous gene replication (AGR) was  $22.0 \pm 3.4\%$  for *AURKA* and  $18.0 \pm 3.2\%$  for *TP53*; in the group of cancer patients, that was  $36.8 \pm 4.8\%$  and  $28.4 \pm 5.1\%$ , respectively. The excessive presence of lymphocytes with the AGR in cancer patients was consistent and statistically significant ( $p < 0.0001$ ). For the *AURKA* gene, the AGR-based cancer detection showed a sensitivity of  $98.6 \pm 0.7\%$ , a specificity of 100%, and an accuracy of  $98.3 \pm 0.8\%$ , and for the *TP53* gene —  $78.6 \pm 3.1\%$ ,  $98.5 \pm 0.9\%$ , and  $85.9 \pm 2.6\%$ , respectively.

**Conclusion.** This pilot study on lymphocytes with AGR of *AURKA* and *TP53* genes in cancer patients can serve a basis for creating a new molecular cytogenetic technology for detecting malignant neoplasms in humans.

**Key words:** asynchronous DNA replication; fluorescence *in situ* hybridization; FISH; peripheral blood lymphocytes; *AURKA*; *TP53*; diagnosis of malignant neoplasms.

### Введение

Проблема ранней диагностики злокачественных новообразований у человека является чрезвычайно актуальной. В Российской Федерации в 2018 г. рак был впервые выявлен у 624 709 человек. Выявление онкологического заболевания на I–II стадиях позволяет с вероятностью около 80% добиться выздоровления пациента. Однако в России только примерно 55% диагнозов устанавливаются на этих стадиях [1]. Онкологическое заболевание выявляется либо при обращении лиц за медицинской помощью при появлении симптомов, либо при проведении скрининговых обследований, направленных на обнаружение такой патологии. В связи с этим методам скрининга придается большое значение. Они должны обладать высокими уровнями чувствительности, специфичности и точности, приближающимися к 100%, однако на практике далеко не каждый метод имеет такие показатели.

В настоящее время наиболее эффективные скрининговые программы существуют для выявления рака молочной железы, рака шейки матки и колоректального рака. Все более широко используется низкодозная спиральная компьютерная томография. Она характеризуется высокой чувствительностью, что значительно повышает вероятность выявления даже небольших опухолевых образований, но имеет низкую специфичность. Кроме того, организм пациента подвергается воздействию ионизирующего излучения, что само по себе является фактором риска развития рака. Из инструментальных методов в ранней диагностике рака следует также отметить ультразвуковую диагностику, которая наиболее доступна, проста и не имеет противопоказаний. В последнее время накоплен опыт, который расширяет границы возможностей УЗИ и позволяет выявить рак органов брюшной полости и щитовидной железы.

На доклинической стадии онкологическое заболе-

вание выявить достаточно сложно. Поэтому в последние десятилетия все более активно в выявлении таких патологий используют молекулярно-генетические и цитогенетические методы. Данные методы позволяют обнаружить характерные для онкозаболеваний нарушения экспрессии генов и метилирования ДНК, мутации, структурные aberrации ДНК, а также нарушения процессов репликации. Результаты исследований нарушения времени репликации [2–6] указывают на то, что асинхронная репликация биаллельно экспрессирующихся генов часто сопровождает развитие рака.

В одной из первых работ по изучению асинхронной репликации биаллельно экспрессирующихся генов [7], выполненной на лимфоцитах периферической крови больных хроническим лимфоцитарным лейкозом и здоровых людей, показано, что уровень лимфоцитов с асинхронной репликацией генов (АРГ) у здоровых людей не превышал 14% как для гена *TP53*, так и для локуса 21q22, тогда как в группе больных этот показатель был в два раза больше и для гена, и для локуса. Позже аналогичные результаты были получены и у больных солидными опухолями. В работе [8] авторы показали, что в группе больных почечно-клеточными карциномами уровень лимфоцитов с АРГ для гена *TP53* и локуса 21q22 составил 36 и 44% соответственно, а в группе здоровых лиц — 12 и 14%. В дальнейшем такие исследования проводились для других генов как у здоровых лиц, так и у онкологических больных [9].

Нами впервые в мире был изучен уровень лимфоцитов с АРГ для гена *AURKA* у клинически здоровых людей, неонкологических и онкологических больных с различными нозологиями.

**Цель исследования** — изучить уровень лимфоцитов с асинхронной репликацией генов для генов *AURKA* и *TP53* у неонкологических и онкологических больных с различными нозологиями и оценить их диагностические возможности.

## Материалы и методы

**Обследованные группы.** В исследовании участвовали следующие группы: контрольная и группа пациентов с онкологическими заболеваниями различных нозологий. В контрольную группу вошли 40 клинически здоровых доноров и 30 пациентов с различными неонкологическими заболеваниями в анамнезе: гастритом (6), панкреатитом (2), хроническим калькулезным холециститом (11), бронхиальной астмой (1), язвенной болезнью (1), паховой грыжей (4), артрозом (1), миомой (1), гепатитом (1), эпилепсией (1), хроническим простатитом (2), хроническим тонзиллитом (3), аденомой прямой кишки (1). У части пациентов было более одного заболевания. Всего обследовано 34 мужчины и 36 женщин в возрасте от 21 до 77 лет (средний возраст — 42 года).

В группу пациентов с онкологическими заболеваниями вошли 219 человек (123 мужчины и 96 женщин) в

возрасте от 21 до 88 лет (средний возраст — 61 год). У пациентов отмечали следующие нозологические формы: рак желудка (68), колоректальный рак (30), хронический лимфоцитарный лейкоз (52), лимфома Ходжкина (33) и полинеоплазии (41). В подгруппу больных с полинеоплазиями были включены лица с двумя и более синхронными или метасинхронными опухолями различных нозологий: меланомой, раком толстой, ободочной, сигмовидной или подвздошной кишки, раком желудка, гортани, пищевода, почки, легкого, яичников, молочной железы, шейки матки, простаты, мочевого пузыря и щитовидной железы. Стадии заболеваний в группе онкологических больных варьировали от IA до IV.

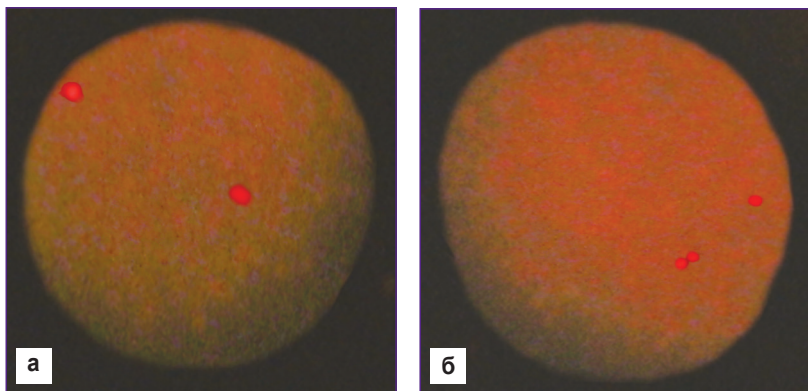
При взятии образцов всем здоровым донорам и пациентам без онкологической патологии была дана подробная информация о проводимом исследовании с подписанием добровольного информированного согласия на участие в нем. Исследования у онкологических больных проводили в рамках клинических протоколов, утвержденных Министерством здравоохранения РФ и получивших соответствующее одобрение в Этическом комитете Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба — филиала Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава РФ.

### Исследованные гены

**Ген-супрессор *TP53*.** Опухолевый ген-супрессор *TP53*, расположенный в локусе 13.1 р-плеча 17-й хромосомы, играет важную роль на многочисленных этапах злокачественной трансформации клеток. Он регулирует апоптоз, вовлечен в механизмы репарации ДНК и работает в качестве регулятора клеточного цикла в поздней G1-фазе. Нарушения гена *TP53* являются одними из наиболее часто обнаруживаемых при раке у человека. Значимость гена *TP53* при опухолевой супрессии подтверждена такими фактами, как высокая предрасположенность к развитию опухолей у *TP53*-дефицитных мышей и высокий риск ранних раков у людей, несущих наследственные мутации гена *TP53* (синдром Ли-Фраумени). В половине всех спорадических раков также отмечается инактивация данного гена. Более того, при раках, в которых ген *TP53* остается интактным, его функция часто ослаблена. Ген *TP53* играет фундаментальную роль в регулировании клеточных процессов, вовлеченных в управление пролиферацией, и в поддержании целостности и стабильности генома. Вследствие этого злокачественные новообразования человека содержат генетические или эпигенетические нарушения, которые ослабляют сигнальный путь с участием гена *TP53* [10–12].

**Онкоген *AURKA*.** Ген *AURKA*, расположенный в локусе 13.2 q-плеча 20-й хромосомы, кодирует семейство киназ Аугога. Это семейство серин/треониновых киназ, необходимых для правильного протекания митотических и/или мейотических событий в клетках эукариот. Киназы Аугога играют критическую роль в





**Рис. 1. Асинхронная репликация гена *TP53* в лимфоцитах периферической крови человека:**

**а** — нормальный лимфоцит (два одинарных сигнала); **б** — лимфоцит с нарушением синхронности репликации гена (один одинарный и один сдвоенный сигнал);  $\times 1000$

регуляции таких митотических событий, как сборка веретена деления, цитокинез, функционирование центросомы и цитоскелета. В частности, ген *AURKA* во время профазы экспрессируется в центросоме, обеспечивая ее разделение и созревание. Во время метафазы она локализуется в полярных микротрубочках и обеспечивает сборку веретена деления, при цитокинезе — локализуется в тельце Флеминга.

Ген *AURKA* является онкогеном. В экспериментах на животных было показано, что повышенная активность этого гена вызывает генетическую нестабильность и в дальнейшем — образование опухоли [13]. Кроме того, ген расположен в регионе, часто амплифицируемом при раке у человека, и его мутации увеличивают риск развития различных видов рака, таких как эзофагеальный рак, рак яичников, легких и рак молочной железы. Нарушение экспрессии *AURKA* также приводит к продвижению нарушений по митотическому циклу, вызывающих такие опухоли, как рак желудка, гепатоцеллюлярная карцинома и рак поджелудочной железы [14–16].

**Метод интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) на лимфоцитах периферической крови.** Образцы венозной крови (4–6 мл) забирали при помощи вакуумной системы, содержащей Li-гепарин в концентрации 12–30 МЕ на 1 мл крови. Цельную кровь разбавляли (1:9) теплым раствором (37°C) 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 выполняли в соответствии с инструкцией производителя, прилагаемой к ДНК-зондам. Для денатурации и гибридизации использовали гибридайзер Thermobrite (StatSpin, США).

**Анализ и статистическая обработка.** Анализ препаратов проводили независимо друг от друга два исследователя на флуоресцентном микроскопе Axio Imager A-2 (Carl Zeiss, Германия) с набором фильтров DAPI, Orange/Green, Gold (Vysis). Для каждого образца крови анализировали 300–900 интерфазных клеток с четкими сигналами (рис. 1).

Статистическую обработку данных выполняли с помощью стандартных методов статистического анализа с использованием программ SPSS Statistics v. 23 и Microsoft Office Excel (2007). Полученные данные были объединены в вариационные ряды, для которых рассчитывали среднее арифметическое, стандартное отклонение, 95% доверительный интервал (95% confidence

interval, CI). Проверку распределения на нормальность осуществляли с помощью одновыборочного критерия Колмогорова–Смирнова. Совокупности были однородными. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm \sigma$ ). Оценку значимости различий среднегрупповых показателей проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа и двустороннего *t*-критерия Стьюдента с поправкой Ньюмена–Кейлса для множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ . Для оценки информативности и разрешающей способности теста проводили расчет чувствительности, специфичности и точности. Специфичность метода определяли как долю людей, не имеющих онкологического заболевания среди «отрицательных» анализов; чувствительность — как долю людей, имеющих подтвержденное онкологическое заболевание среди «положительных» анализов. Точность рассчитывали как долю «правильно сработавших анализов» среди всех обследованных людей.

## Результаты

Результаты исследования частоты встречаемости лимфоцитов с АРГ для генов *AURKA* и *TP53* в обследованных группах и подгруппах (табл. 1) показали, что для онкологических больных характерно высокое значение среднегрупповой частоты лимфоцитов с АРГ по обоим исследованным генам.

Среднегрупповая частота этих лимфоцитов для гена *AURKA* в подгруппах онкологических больных с различными нозологиями статистически значимо отличается от такого же параметра в контрольной группе пациентов с неонкологическими заболеваниями и здоровых доноров ( $p < 0,05$ ). Сравнение онкопациентов с различными нозологиями показало, что различия между подгруппами больных с раком желудка и с полинеоплазиями были статистически значимы ( $p = 0,023$ ). Между подгруппами больных

Таблица 1

Частота встречаемости лимфоцитов с асинхронной репликацией генов *AURKA* и *TP53* в обследованных группах

Группы	Количество обследованных	Число проанализированных клеток	Лимфоциты с АРГ, min–max, %	M±σ, %
<b>Ген <i>AURKA</i></b>				
Контрольная	70	22 084	13,7–27,7	22,0±3,4
<b>Онкобольные:</b>				
рак желудка	65	20083	28,6–42,0	33,9±2,9
колоректальный рак	30	9000	32,0–44,3	35,5±2,9
полинеоплазии	41	12404	31,3–46,0	39,6±3,8
<b>солидные опухоли (суммарно)</b>	<b>136</b>	<b>41487</b>	<b>28,6–46,0</b>	<b>36,3±6,8</b>
хронический лимфоцитарный лейкоз	52	15600	28,0–55,3	38,4±6,3
лимфома Ходжкина	31	9300	30,0–51,3	38,0±4,4
<b>гематология (суммарно)</b>	<b>83</b>	<b>24900</b>	<b>28,0–55,3</b>	<b>38,2±5,8</b>
<b>Ген <i>TP53</i></b>				
Контрольная	65	20576	11,7–25,3	18,0±3,2
<b>Онкобольные:</b>				
рак желудка + колоректальный рак	71	20967	18,3–38,9	26,1±4,2
полинеоплазии	41	11995	21,0–44,4	32,5±3,9
<b>солидные опухоли (суммарно)</b>	<b>112</b>	<b>32962</b>	<b>18,3–44,4</b>	<b>28,4±5,1</b>

раком желудка и колоректальным раком, а также хроническим лимфоцитарным лейкозом и лимфомой Ходжкина различия не были статистически значимы ( $p=0,57$  и  $p=0,91$  соответственно). Поэтому подгруппы онкобольных с различными нозологиями были объединены в подгруппы больных с солидными опухолями и с онкогематологией. Между этими подгруппами также не наблюдалось статистически значимых различий ( $p=0,274$ ), поэтому в дальнейшем эти подгруппы были объединены в одну группу онкологических больных.

Для гена *TP53* среднегрупповая частота лимфоцитов с АРГ в подгруппах больных «рак желудка + колоректальный рак» и «полинеоплазии» отличалась статистически значимо и была выше, чем в контрольной группе ( $p=0,01$  и  $p=0,0001$  соответственно). Наблюдалось также статистически значимое различие по частоте лимфоцитов с АРГ между подгруппами пациентов с раком желудка и с множественными опухолями ( $p=0,043$ ).

Сравнение среднегрупповых частот лимфоцитов с АРГ для генов *AURKA* и *TP53* в контрольной группе и объединенной группе онкологических больных (рис. 2) показало, что среднегрупповые показатели у онкобольных по обоим генам ( $36,8±4,8$  и  $28,4±5,1\%$  соответственно) статистически значимо превышают контрольный уровень ( $22,0±3,4$  и  $18,0±3,2$  соответственно) ( $p=0,0001$ ). Наблюдается также статистически значимое различие среднегрупповых показателей между двумя исследованными генами: частота лимфоцитов с АРГ для гена *AURKA* выше, чем для гена *TP53* как

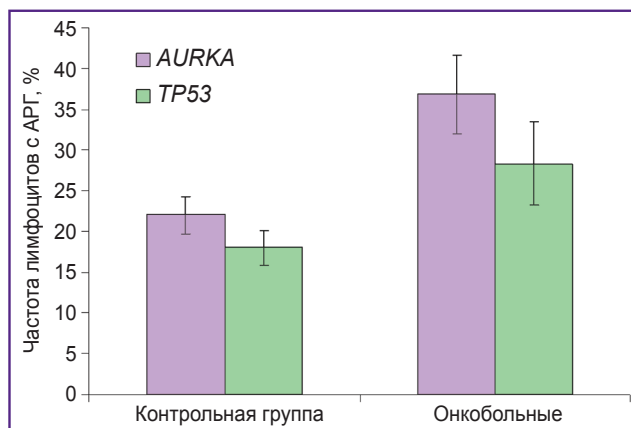


Рис. 2. Сравнение среднегрупповых частот встречаемости лимфоцитов с асинхронной репликацией генов *AURKA* и *TP53* в контрольной группе и у онкологических больных. Двусторонний критерий Стьюдента;  $M±σ$ ;  $p<0,05$

в группе онкологических больных ( $p=0,001$ ), так и в контрольной группе ( $p=0,03$ ).

В качестве точки отсечения, отделяющей контрольную группу от группы пациентов с онкологическими заболеваниями, была взята верхняя граница 95% CI контрольной группы. Для гена *AURKA* в контрольной группе ее значение составило 28,7%. В этой группе не было ни одного человека, у которого частота лимфоцитов с АРГ для гена *AURKA* превысила бы этот уровень. В группе онкологических больных данный

Таблица 2

**Оценка чувствительности, специфичности и точности метода, % (M±σ)**

Параметр	Исследованный ген	
	<i>AURKA</i>	<i>TP53</i>
Чувствительность	98,6±0,7	78,6±3,1
Специфичность	100	98,5±0,9
Точность	98,3±0,8	85,9±2,6

показатель превышал этот уровень у 214 человек и у 5 человек он был ниже точки отсечения.

Для гена *TP53* верхняя граница 95% CI частоты лимфоцитов с АРГ в контрольной группе составила 24,2%. Превышение этого уровня наблюдалось у 1 человека, у 64 человек частота оставалась в границах 95% CI. В группе онкологических больных у 88 человек данный показатель превышал контрольный уровень и у 24 человек был ниже точки отсечения.

Информативность и разрешающая способность использования асинхронной репликации генов *AURKA* и *TP53* в качестве диагностического метода представлены в табл. 2.

### Обсуждение

Одной из характеристик злокачественной трансформации клеток является их неконтролируемый рост, причиной которого часто служит накопление генетических нарушений, вызванных повышенным мутагенезом и нестабильностью генома [17]. По этой причине правильная репликация важна для нормального клеточного деления как гарантия, что генетическая информация в неизменном виде перейдет в следующее клеточное поколение. Репликация ДНК является строго регулируемым процессом, в результате которого большая часть гомологичных локусов в геноме реплицируется синхронно и только малая их часть имеет асинхронную репликацию [3, 18]. Нарушения во времени репликации, в том числе и асинхронная репликация тех генов, которые должны реплицироваться синхронно, влияют на экспрессию генов, на увеличение частоты структурных перестроек и вызывают изменения в эпигенетических модификациях. Это в свою очередь обуславливает повышенную дестабилизацию генома и в конечном итоге может приводить к развитию рака [5, 19]. Авторами работы [6] было показано, что две трети мутаций, связанных с развитием рака, возникают в результате нарушений репликации ДНК. Анализ взаимосвязи нестабильности генома, рака и нарушения программы репликации [2] показал, что aberrantная репликация является ранним событием в канцерогенезе.

С использованием метода интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации рядом зарубежных авторов были проведены исследования лимфоцитов периферической крови с АРГ генов *TP53*, *HER-2/neu*,

*C-MYC*, *RB1*, *AML1* у человека и получены следующие результаты:

1) у клинически здоровых лиц частота лимфоцитов с АРГ для изученных генов изменяется в пределах 10–21% [7, 8, 20–24];

2) у онкологических больных (лимфомы [24, 25], хронический лимфоцитарный лейкоз [7], хронический миелоидный лейкоз [25], почечно-клеточные карциномы [8], рак простаты [26], рак молочной железы [21] и др.) данный показатель изменяется в пределах 28–41%;

3) как у онкогематологических больных, так и у больных с солидными опухолями АРГ наблюдается в лимфоцитах периферической крови [7, 8];

4) частота лимфоцитов с АРГ увеличивается по мере озлокачествления заболеваний [23, 24];

5) потеря синхронности репликации генов у онкологических больных — это обратимый эпигенетический феномен, связанный в том числе и с аномальным метилированием [20, 22].

Проведенное нами исследование частоты лимфоцитов с АРГ для гена *TP53* как у доноров без онкологических заболеваний, так и у больных солидными опухолями показало хорошее совпадение с основными результатами зарубежных исследований [8, 24, 27]. Таким образом, результаты работ, направленных на изучение нарушения времени репликации биаллельно экспрессирующихся генов в лимфоцитах периферической крови у онкологических больных [9], а также данные наших исследований [28] позволяют сделать предположение, что АРГ может служить неспецифическим опухолевым маркером.

Как известно, злокачественное новообразование у человека — это результат либо активации онкогена, либо нарушения работы генов-супрессоров опухолей. Для нашего исследования мы выбрали ген *AURKA*, являющийся онкогеном, и ген *TP53*, являющийся геном-супрессором. Полученные данные показали, что частота встречаемости лимфоцитов с АРГ для гена *AURKA* как в контрольной группе, так и у онкологических больных достоверно превышает этот показатель для гена *TP53*. Предполагая, что частота лимфоцитов с асинхронной репликацией биаллельно экспрессирующихся генов является неспецифическим опухолевым маркером, мы оценили этот показатель как возможный молекулярно-цитогенетический тест для выявления людей с онкологическими новообразованиями. В табл. 2 показаны чувствительность, специфичность и точность данного теста: наиболее информативным является тест с использованием частоты лимфоцитов с АРГ для гена *AURKA*: у него все показатели превышают 98%.

### Заключение

Результаты пилотного исследования частоты встречаемости лимфоцитов с асинхронной репликацией гена *AURKA* в периферической крови могут служить



базой для разработки новой молекулярно-цитогенетической технологии выявления злокачественных новообразований у человека. Безусловно, для создания такой технологии требуются дальнейшие углубленные исследования, в частности зависимости результатов от пола, возраста, приверженности к курению и от других факторов с учетом различных нозологий у онкологических больных.

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии дополнительных источников финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Литература/References

1. *Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность)*. Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М: МНИОИ им. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2019; 250 с.

*Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2018 godu (zabolevaemost' i smertnost')* [Malignant neoplasms in Russia in 2018 (morbidity and mortality)]. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. (editors). Moscow: MNIОI im. A. Gertsena — filial FGBU "NMITs radiologii" Minzdrava Rossii; 2019; 250 p.

2. 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, <https://doi.org/10.3390/ijms18061138>.

3. Hiratani I., Gilbert D.M. Replication timing as an epigenetic mark. *Epigenetics* 2009; 4(2): 93–97, <https://doi.org/10.4161/epi.4.2.7772>.

4. 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): 80–89, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.01.001>.

5. Ryba T., Battaglia D., Chang B.H., Shirley J.W., Buckley Q., Pope B.D., Devidas M., Druker B.J., Gilbert D.M. Abnormal developmental control of replication-timing domains in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Res* 2012; 22(10): 1833–1844, <https://doi.org/10.1101/gr.138511.112>.

6. Tomasetti C., Li L., Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 2017; 355(6331): 1330–1334, <https://doi.org/10.1126/science.aaf9011>.

7. Amiel A., Litmanovich T., Gaber E., Lishner M., Avivi L., Fejgin M.D. Asynchronous replication of p53 and 21q22 loci in chronic lymphocytic leukemia. *Hum Genet* 1997; 101(2): 219–222, <https://doi.org/10.1007/s004390050619>.

8. Dotan Z.A., Dotan A., Litmanovitch T., Ravia Y., Oniashvili N., Leibovitch I., Ramon J., Avivi L. Modification in the inherent mode of allelic replication in lymphocytes of patients suffering from renal cell carcinoma: a novel genetic alteration associated with malignancy. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27(3): 270–277, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2264\(200003\)27:3<270::aid-gcc7>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2264(200003)27:3<270::aid-gcc7>3.0.co;2-7).

9. Михайлова Г.Ф., Цепенко В.В., Шкаврова Т.Г., Голуб Е.В. Асинхронная репликация у онкологических боль-

ных. *Успехи молекулярной онкологии* 2018; 5(1): 26–34, <https://doi.org/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. *Uspehi molekularnoj onkologii* 2018; 5(1): 26–34, <https://doi.org/10.17650/2313-805x-2018-5-1-26-34>.

10. Silwal-Pandit L., Langerød A., Børresen-Dale A.L. TP53 mutations in breast and ovarian cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2017; 7(1): a026252, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026252>.

11. Aubrey B.J., Strasser A., Kelly G.L. Tumor-suppressor functions of the TP53 pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 6(5): a026062, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026062>.

12. Torén W., Ansari D., Andersson R. Immunohistochemical investigation of prognostic biomarkers in resected colorectal liver metastases: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cell Int* 2018; 18(1): 217, <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0715-8>.

13. Damodaran A.P., Vaufrey L., Gavard O., Gavard O., Prigent C. Aurora A kinase is a priority pharmaceutical target for the treatment of cancers. *Trends Pharmacol Sci* 2017; 38(8): 687–700, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.05.003>.

14. Seeling J.M., Farmer A.A., Mansfield A., Cho H., Choudhary M. Differential selective pressures experienced by the Aurora kinase gene family. *Int J Mol Sci* 2018; 19(1): 72, <https://doi.org/10.3390/ijms19010072>.

15. Zhan S.J., Liu B., Linghu H. Identifying genes as potential prognostic indicators in patients with serous ovarian cancer resistant to carboplatin using integrated bioinformatics analysis. *Oncol Rep* 2018; 39(6): 2653–2663, <https://doi.org/10.3892/or.2018.6383>.

16. Zhou L., Du Y., Kong L., Zhang X., Chen Q. Identification of molecular target genes and key pathways in hepatocellular carcinoma by bioinformatics analysis. *Onco Targets Ther* 2018; 11: 1861–1869, <https://doi.org/10.2147/ott.s156737>.

17. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

18. Klein K.N., Gilbert D.M. Epigenetic vs. sequence-dependent control of eukaryotic replication timing. In: *The initiation of DNA replication in eukaryotes*. Kaplan D.L. (editor). Springer International Publishing Switzerland; 2016; p. 39–63, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24696-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24696-3_3).

19. Macheret M., Halazonetis T.D. DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol* 2015; 10: 425–448, <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040424>.

20. Nagler A., Cytron S., Mashevich M., Korenstein-Ilan A., Avivi L. The aberrant asynchronous replication — characterizing lymphocytes of cancer patients — is erased following stem cell transplantation. *BMC Cancer* 2010; 10: 230, <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-230>.

21. Grinberg-Rashi H., Cytron S., Gelman-Kohan Z., Litmanovitch T., Avivi L. Replication timing aberrations and aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients. *Neoplasia* 2010; 12(8): 668–674, <https://doi.org/10.1593/neo.10568>.

22. Korenstein-Ilan A., Amiel A., Lalezari S., Lishner M., Avivi L. Allele-specific replication associated with aneuploidy in blood cells of patients with hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 139(2): 97–103, [https://doi.org/10.1016/s0165-4608\(02\)00610-6](https://doi.org/10.1016/s0165-4608(02)00610-6).

23. Amiel A., Kirgner I., Gaber E., Manor Y., Fejgin M.,

Lishner M. Replication pattern in cancer: asynchronous replication in multiple myeloma and in monoclonal gammopathy. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 108(1): 32–37, [https://doi.org/10.1016/s0165-4608\(98\)00107-1](https://doi.org/10.1016/s0165-4608(98)00107-1).

24. Amiel A., Kitay-Cohen Y., Fejgin M.D., Lishner M. Replication status as a marker for predisposition for lymphoma in patients with chronic hepatitis C with and without cryoglobulinemia. *Exp Hematol* 2000; 28(2): 156–160, [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(99\)00140-x](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(99)00140-x).

25. Amiel A., Litmanovitch T., Lishner M., Mor A., Gaber E., Tangi I., Fejgin M., Avivi L. Temporal differences in replication timing of homologous loci in malignant cells derived from CML and lymphoma patients. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 22(3): 225–231, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2264\(199807\)22:3<225::aid-gcc8>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2264(199807)22:3<225::aid-gcc8>3.0.co;2-y).

26. Cytron S., Stepnov E., Bounkin I., Mashevich M., Dotan A., Avivi L. Epigenetic analyses in blood cells of men suspected of prostate cancer predict the outcome of biopsy better than serum PSA levels. *Clin Epigenetics* 2011; 2(2): 383–388, <https://doi.org/10.1007/s13148-011-0029-3>.

27. Dotan Z.A., Dotan A., Ramon J., Avivi L. Altered mode of allelic replication accompanied by aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of prostate cancer patients. *Int J Cancer* 2004; 111(1): 60–66, <https://doi.org/10.1002/ijc.20237>.

28. Михайлова Г.Ф., Цепенко В.В., Шкаврова Т.Г., Голуб Е.В., Каприн А.Д. Способ скрининга злокачественных новообразований у человека. Патент РФ 2665965С1. 2017.

Mikhaylova G.F., Tsepenko V.V., Shkavrova T.G., Golub E.V., Kaprin A.D. *Method for screening malignant neoplasms in humans*. Patent RU 2665965C1. 2017.