

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.24-006.6-07:577.21.088

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2025-22-4-314-323>

Поступила в редакцию 02.06.2025

Received 02.06.2025

**С. Ю. Смирнов, А. В. Медведь, С. Н. Пивоварчик, Т. Г. Вахомчик,  
П. Е. Короткевич, Е. И. Субоч, А. С. Портянко**

*Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии  
имени Н. Н. Александрова, а/з Лесной, Минский район, Республика Беларусь*

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДЕТЕКЦИИ цоДНК У ПАЦИЕНТОВ  
С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАРКЕРА МЕТИЛИРОВАНИЯ RASSF1**

**Аннотация.** На основании информации из международной базы данных The Cancer Genome Atlas оценен статус метилирования промотора гена *RASSF1* в 57 образцах опухолевой ткани (аденокарцинома и плоскоклеточный рак) и 27 образцах нормальной ткани легкого. Установлены области промотора, характеризующиеся специфичным профилем метилирования при немелкоклеточном раке легкого, включая его различные гистологические формы.

В рамках проведенного исследования осуществлен дизайн праймеров для метил-специфической ПЦР, с помощью которой подтверждена возможность использования маркера *RASSF1* для детекции опухолевой ДНК. Разработана методика детекции циркулирующей опухолевой ДНК в плазме крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого с помощью цифровой капельной ПЦР.

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого, цоДНК, *RASSF1*, метилирование, цифровая капельная ПЦР

**Для цитирования:** Разработка метода детекции цоДНК у пациентов с немелкоклеточным раком легкого с использованием маркера метилирования *RASSF1* / С. Ю. Смирнов, А. В. Медведь, С. Н. Пивоварчик [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцynskikh navuk. – 2025. – Т. 22, № 4. – С. 314–323. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2025-22-4-314-323>

**Siarhei Y. Smirnou, Antonina V. Miadzvedz, Siarhei N. Pivavarchyk, Tatsiana G. Vakhomchyk,  
Pavel E. Karatkevich, Helen I. Subach, Anna S. Portyanko**

*N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus,  
Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus*

**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETECTING ctDNA IN PATIENTS WITH NON-SMALL  
CELL LUNG CANCER USING THE RASSF1 METHYLATION MARKER**

**Abstract.** Based on information from the international database The Cancer Genome Atlas, the methylation status of the *RASSF1* gene promoter was studied in 57 non-small cell lung cancer tissue samples (adenocarcinoma and squamous cell lung carcinoma) and 27 normal lung tissue samples. Promoter regions characterized by specific methylation profiles in non-sm all cell lung cancer, including various histological types, were identified.

The obtained data was then used to design primers for methylation-specific PCR, thereby confirming the feasibility of using the *RASSF1* marker for tumor DNA detection. A methodology for detecting ctDNA in the blood plasma of patients with non-small cell lung cancer was developed using droplet digital PCR.

**Keywords:** non-small cell lung cancer, ctDNA, *RASSF1*, methylation, droplet digital PCR

**For citation:** Smirnou S. Y., Miadzvedz A. V., Pivavarchyk S. N., Vakhomchyk T. G., Karatkevich P. E., Subach H. I., Portyanko A. S. Development of a method for detecting ctDNA in patients with non-small cell lung cancer using the *RASSF1* methylation marker. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2025, vol. 22, no. 4, pp. 314–323 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2025-22-4-314-323>

**Введение.** Рак легкого остается одной из ведущих причин смерти от онкозаболеваний во всем мире, что определяет высокую актуальность научных исследований по поиску новых биомаркеров для ранней диагностики и мониторинга течения данного заболевания, а также молекулярно-генетических терапевтических мишеней. Одним из таких маркеров является ген *RASSF1*. Аберрантное метилирование промотора гена *RASSF1* является важным эпигенетическим изменением в канцерогенезе различных онкозаболеваний, в том числе и немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) [1].

Ген *RASSF1* расположен на коротком плече 3-й хромосомы (3р21.3) и имеет несколько изоформ, наиболее исследованной из которых является RASSF1A. Белок RASSF1A, являющийся важным опухолевым супрессором, участвует в регуляции клеточного цикла и апоптоза [2]. При раке легких потеря экспрессии *RASSF1* в основном связана с метилированием его промоторной области, что приводит к «молчанию» гена и способствует росту опухоли. Исследования показали, что метилирование промотора *RASSF1* при данном заболевании встречается примерно в 44 % случаев [3]. Данное молекулярное нарушение часто обнаруживается уже на ранних стадиях НМРЛ, что свидетельствует о его потенциальной ценности как биомаркера ранней диагностики.

Анализ циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) с использованием в качестве опухоль-специфичного маркера метилирования промотора *RASSF1* продемонстрировал высокую эффективность последнего в научных исследованиях по диагностике рака легких и мониторингу течения различных онкозаболеваний [4, 5].

Согласно литературным данным, метилирование промоторной области гена *RASSF1* также связано с прогнозом заболевания при НМРЛ – пациенты с аберрантным метилированием гена имеют более низкие показатели общей выживаемости [6]. Изучение биологических механизмов, лежащих в основе дисрегуляции *RASSF1*, будет способствовать разработке новых терапевтических стратегий, нацеленных на эпигенетические аберрации при раке легкого.

Однако, несмотря на многообещающие результаты многочисленных исследований в данной области, остаются трудности с их внедрением в клиническую практику. В первую очередь это связано с отсутствием стандартизации методик детекции метилирования гена *RASSF1* и с высокими требованиями к их аналитической чувствительности.

Цель исследования – разработка универсального метода детекции цоДНК при немелкоклеточном раке легкого на основании статуса метилирования CpG-нуклеотидов промоторной области гена *RASSF1*.

**Материалы и методы исследования.** В работе использована информация из международной базы данных The Cancer Genome Atlas, а материалом для исследования послужила опухолевая ткань пациентов с НМРЛ ( $n = 10$ ), получавших лечение на базе РНПЦ ОМР имени Н. Н. Александрова [7]. Для оценки статуса метилирования промоторов гена *RASSF1* использованы данные 57 образцов опухолевой ткани НМРЛ I–IV стадии заболевания (аденокарцинома – 28, плоскоклеточный рак легкого – 29) и 27 образцов нормальной ткани легкого (проекты TCGA-LUAD, TCGA-LUSC). Для исследования использовали панель Infinium HumanMethylation 450 BeadChip. Исследовали следующие CpG нуклеотиды: первый промотор – cg06172942, cg25486143, cg27569446, cg21554552, cg25747192, cg08047457, cg12966367, cg04743654, cg00777121, cg13872831, cg24859722; второй промотор – cg07130266, cg06117233, cg23147362, cg20826201, cg00743929, cg09386807, cg02930432, cg21418575, cg06821120. Данные обрабатывали с помощью программы SeSAMe Methylation Beta Estimation. Пороговый уровень детекции метилированных нуклеотидов – 0,3.

Выделение ДНК из образцов крови, опухолевой ткани, заключенной в парафин, а также цоДНК из образцов плазмы крови производили с помощью наборов реагентов QIAamp DNA FFPE kit (Qiagen, Германия) и MagListo cfDNA kit (Bioneer, Южная Корея) соответственно согласно инструкциям производителей.

Для постановки метил-специфической ПЦР (mcПЦР) с детекцией результатов в 3%-м агарозном геле использовали набор реагентов ChemTaq ДНК-полимеразы («Артбиотех», Республика Беларусь), для реакции секвенирования – набор реагентов BigDye Terminator v3.1. kit (Thermo-Fisher, США) согласно протоколу производителя.

Постановку цифровой капельной ПЦР осуществляли на оборудовании QX200/600 (Bio-Rad, США) с применением готового мастер-микса с интеркаллирующим красителем EvaGreen (Bio-Rad, США).

**Результаты и их обсуждение.** При анализе данных TCGA в образцах нормальной ткани легкого не обнаружено метилирования CpG-нуклеотидов первой промоторной области гена *RASSF1*, за исключением одиночного нуклеотида cg24859722 (рис. 1).

cg06172542	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2
cg25486143	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
cg27569446	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
cg1554552	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
cg25747192	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
cg08047457	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
cg12966367	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
cg04743654	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
cg00777121	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
cg13872831	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
cg24859722	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5
cg07150266	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4
cg06117233	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4
cg23147362	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
cg20826201	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
cg00743929	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
cg09386807	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4
cg02830432	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,3	0,5	0,3	0,4	0,4	0,5	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,3	0,4	0,2
cg12418575	0,6	0,5	0,5	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,6	0,5	0,6
cg06821120	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5

Рис. 1. Профиль метилирования гена *RASSF1* в образцах нормальной ткани легкого. Здесь и на рис. 2, 3 первый промотор отмечен скобкой, серым цветом выделены заметилированные CpG-нуклеотиды

Fig. 1. Methylation profile of the *RASSF1* gene in normal lung tissue samples. Here and in Fig. 2, 3 the first promoter marked with a bracket, CpG nucleotides highlighted in gray

cg06172942	0,3	0,1	0,0,6	0,4	0,1	0,3	0,6	0,2	0,5	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4	0,1	0,5	0,7	0,4	0,2	0,1	0,3
cg12486143	0,2	0,3	0,0,3	0,3	0,0	0,1	0,4	0,0	0,5	0,1	0,0	0,2	0,0	0,4	0,3	0,0,2	0,4	0,3	0,3	0,0	0,4	0,7	0,2	0,0	0,0
cg12590446	0,3	0,0	0,0,5	0,4	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,0,3	0,5	0,5	0,3	0,1	0,4	0,7	0,0	0,0	0,1
cg11554542	0,3	0,1	0,0,5	0,5	0,0	0,0	0,6	0,0	0,6	0,2	0,2	0,3	0,0	0,5	0,1	0,0,3	0,5	0,5	0,3	0,1	0,4	0,7	0,0	0,0	0,2
cg125747192	0,3	0,1	0,0,4	0,5	0,0	0,0	0,6	0,0	0,6	0,1	0,1	0,1	0,0	0,5	0,2	0,1,0,2	0,5	0,5	0,3	0,1	0,4	0,7	0,0	0,0	0,2
cg120947457	0,3	0,2	0,0,5	0,4	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,2	0,0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
cg11966357	0,3	0,1	0,0,5	0,4	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5	0,1	0,1	0,1	0,0	0,5	0,1	0,0,3	0,5	0,5	0,3	0,1	0,4	0,7	0,0	0,0	0,2
cg02830432	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,3	0,5	0,3	0,4	0,4	0,5	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,3	0,4	0,2
cg12418575	0,6	0,5	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6
cg124859722	0,4	0,1	0,7	0,6	0,4	0,2	0,3	0,6	0,3	0,2	0,6	0,5	0,4	0,4	0,5	0,6	0,2	0,7	0,9	0,4	0,4	0,2	0,6	0,5	0,6
cg07130366	0,2	0,1	0,6	0,4	0,5	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,6	0,5	0,1	0,4	0,4	0,3	0,4	0,2	0,5	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2
cg06117233	0,3	0,4	0,0,6	0,3	0,5	0,4	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,6	0,5	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
cg123147462	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0,1	0,0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
cg10836201	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,4	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1	0,4	0,1	0,2	0,1	0,4	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1
cg07474929	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1
cg07036507	0,1	0,6	0,2	0,5	0,2	0,6	0,4	0,1	0,2	0,2	0,4	0,2	0,6	0,3	0,1	0,6	0,4	0,3	0,3	0,0	0,1	0,7	0,1	0,2	0,1
cg12930432	0,1	0,6	0,2	0,4	0,2	0,6	0,4	0,1	0,1	0,4	0,2	0,6	0,3	0,1	0,5	0,3	0,3	0,4	0,1	0,3	0,3	0,0	0,1	0,7	0,1
cg11415875	0,3	0,6	0,1	0,5	0,4	0,6	0,5	0,2	0,3	0,1	0,5	0,2	0,6	0,5	0,2	0,6	0,4	0,3	0,5	0,4	0,2	0,7	0,2	0,3	0,3
cg06821120	0,2	0,6	0,3	0,5	0,3	0,6	0,4	0,1	0,2	0,1	0,4	0,2	0,6	0,4	0,2	0,4	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,1	0,1	0,2

Рис. 2. Профиль метилирования гена *RASSF1* в образцах аденоакарциномы легкого

Fig. 2. Methylation profile of the *RASSF1* gene in lung adenocarcinoma samples

В 17,8 % случаев аденоакарциномы и в 13,8 % случаев плоскоклеточного рака легкого наблюдалась потеря метильной группы в данном положении (рис. 2, 3). При анализе нуклеотидной последовательности в области cg24859722 обнаружен сайт связывания транскрипционного фактора FOXa1 [8].

В сравнении с нормальной тканью образцы НМРЛ характеризовались наличием метилированной области (cg27569446-cg12966367) в 42,8 % случаев при аденоакарциноме и в 37,9 % случаев при плоскоклеточном раке легкого. Установлено, что большинство CpG-нуклеотидов метилированной области локализуется в нуклеотидных последовательностях для связывания транскрипционных факторов SP1 [8].

cg06172942	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,1	0,3	0,5	0,2	0,2	0,5	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,6	0,2	0,5	0,4	0,3	0,6	0,4	0,6	0,4
cg25486143	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,4	0,4	0,0	0,2	0,3	0,1	0,4	0,1	0,5	0,3
cg27569446	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,5	0,4	0,0	0,4	0,5	0,3	0,5	0,2	0,5	0,4
cg21554552	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,3	0,0	0,4	0,5	0,3	0,5	0,2	0,6	0,5
cg25747192	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5	0,4	0,6	0,3	0,6	0,5	
cg08047457	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5	0,4	0,6	0,3	0,6	0,5	
cg12966367	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,4	0,4	0,0	0,4	0,4	0,3	0,5	0,2	0,4	0,4
cg24743654	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,5	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3	0,3	0,2	0,0	0,3	0,3	0,1	0,4	0,1	0,4	0,2
cg00777121	0,1	0,1	0,0	0,3	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,5	0,5	0,1	0,4	0,5	0,3	0,6	0,3	0,5	0,4
cg13872831	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,0	0,3	0,3	0,2	0,4	0,4	0,2
cg14859722	0,0	0,5	0,1	0,5	0,7	0,4	0,5	0,5	0,5	0,2	0,7	0,5	0,1	0,3	0,3	0,6	0,7	0,6	0,5	0,8	0,7	0,3	0,6	0,4	0,3	0,6	0,5	0,6	0,4
cg07130266	0,4	0,5	0,2	0,4	0,8	0,1	0,6	0,1	0,7	0,2	0,8	0,5	0,6	0,4	0,2	0,7	0,4	0,6	0,2	0,8	0,6	0,4	0,5	0,3	0,2	0,4	0,5	0,6	0,2
cg06117233	0,4	0,5	0,2	0,4	0,6	0,2	0,5	0,1	0,5	0,3	0,6	0,5	0,5	0,4	0,2	0,6	0,4	0,5	0,3	0,6	0,6	0,4	0,5	0,4	0,2	0,4	0,5	0,6	0,3
cg23147362	0,3	0,3	0,0	0,1	0,7	0,0	0,0	0,1	0,0	0,6	0,4	0,1	0,3	0,0	0,6	0,1	0,6	0,0	0,6	0,6	0,6	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
cg20826201	0,5	0,4	0,1	0,2	0,7	0,0	0,1	0,1	0,3	0,1	0,7	0,5	0,4	0,4	0,1	0,6	0,1	0,6	0,1	0,7	0,6	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,4	0,3	0,2
cg00743929	0,5	0,3	0,1	0,2	0,6	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,5	0,4	0,3	0,3	0,1	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6	0,6	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1
cg09386807	0,5	0,4	0,1	0,2	0,7	0,1	0,3	0,1	0,4	0,3	0,7	0,6	0,4	0,5	0,1	0,6	0,2	0,6	0,2	0,8	0,7	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	0,4	0,6	0,1
cg029330432	0,5	0,4	0,0	0,2	0,8	0,0	0,2	0,0	0,4	0,2	0,7	0,6	0,4	0,5	0,0	0,7	0,1	0,6	0,1	0,8	0,7	0,2	0,3	0,4	0,1	0,1	0,5	0,7	0,1
cg11418575	0,5	0,5	0,2	0,4	0,8	0,2	0,4	0,1	0,5	0,4	0,7	0,6	0,5	0,6	0,2	0,7	0,4	0,6	0,3	0,8	0,7	0,4	0,5	0,4	0,2	0,3	0,5	0,7	0,3
cg068211120	0,5	0,4	0,1	0,4	0,7	0,1	0,3	0,1	0,5	0,3	0,7	0,6	0,5	0,5	0,1	0,6	0,3	0,6	0,2	0,7	0,7	0,3	0,4	0,3	0,1	0,2	0,5	0,7	0,2

Рис. 3. Профиль метилирования гена *RASSF1* в образцах плоскоклеточного рака легкогоFig. 3. Methylation profile of the *RASSF1* gene in lung squamous cells samples

Кроме того, обнаружены метилированные независимо друг от друга соседние CpG-нуклеотиды cg06172942 (аденокарцинома – 67,8 %, плоскоклеточный рак – 62,1 %) и cg25486143 (аденокарцинома – 42,8 %, плоскоклеточный рак – 24,1 %), расположенные на 5'-конце первой промоторной области.

На 3'-конце первого промотора гена *RASSF1* в образцах НМРЛ выявлено гиперметилирование CpG-нуклеотидов cg00777121 и cg13872831 (в 39,2 и 41,3 % случаев при adenокарциноме и в 32,1 и 37,9 % случаев соответственно при плоскоклеточном раке легкого). В связи со значительным удалением данных CpG-нуклеотидов от области cg27569446-cg12966367 (>90 и 200 bp соответственно) можно предположить, что они входят в состав других независимо метилированных областей гена.

При исследовании второй промоторной области гена *RASSF1*, отвечающей за экспрессию онкогенной изоформы RASSF1C, во всех образцах нормальной ткани обнаружено метилирование CpG-нуклеотидов cg07130266 и cg06117233, а также области cg09386807-cg06821120 на 5'-конце промотора. Между указанными метилированными участками расположены неметилированные CpG-нуклеотиды cg23147362, cg20826201 и cg00743929. На 3'-конце второго промотора не обнаружено метилирования нуклеотидов, включенных в панель.

В сравнении с нормальной тканью в образцах НМРЛ отмечена утрата метилирования или всей области cg09386807-cg06821120 (аденокарцинома – 25 %, плоскоклеточный рак – 17,2 %) или же отдельных CpG-нуклеотидов (аденокарцинома – 25 %, плоскоклеточный рак – 27,6 %). Потеря метилирования CpG-нуклеотидов cg07130266 или cg06117233 обнаружена в 42,8 % случаев при adenокарциноме и в 27,6 % случаев при плоскоклеточном раке легкого. При этом данные нарушения детектировались только у пациентов с утратой метилирования CpG-нуклеотидов области cg09386807-cg06821120.

Гиперметилирование CpG нуклеотидов cg20826201 и/или cg00743929 выявлено в 51,7 % случаев при плоскоклеточном раке легкого и в 21,4 % случаев при adenокарциноме ( $p < 0,05$ ). Также для плоскоклеточного рака отмечена более высокая частота метилирования цитозина cg23147362 (37,9 % против 3,6 %,  $p < 0,05$ ). Следует отметить, что при анализе нуклеотидной последовательности в области данного CpG-нуклеотида не обнаружено специфичных сайтов связывания транскрипционных факторов, а гиперметилирование CpG-нуклеотидов cg23147362, cg20826201 и cg00743929 наблюдалось исключительно в образцах, где отсутствовало aberrантное метилирование иных регионов второго промотора гена *RASSF1*.

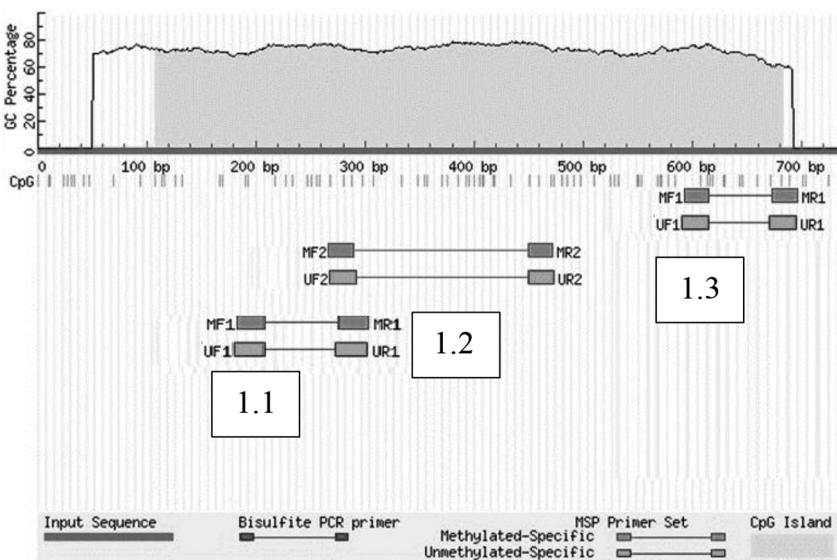


Рис. 4. Графическое изображение расположения праймеров для оценки статуса метилирования промоторной области № 1 гена *RASSF1*

Fig. 4. Graphical representation of the primer positions used to assess the methylation status of promoter region No. 1 of the *RASSF1* gene

Таким образом, использование праймеров для мсПЦР, захватывающих область cg27569446-cg12966367 в первом промоторе гена *RASSF1*, позволит детектировать до 40 % всех случаев НМРЛ независимо от гистологического типа опухоли, а при дополнительном включении в исследовательскую панель участка гена с СрG-нуклеотидами cg23147362, cg20826201 и cg00743929 из второй промоторной области – повысить данный показатель при плоскоклеточном раке легко-го до 72,4 %.

*Дизайн олигонуклеотидов для первой промоторной области гена RASSF1.* Для поиска необхо-димых нуклеотидных последовательностей гена *RASSF1* использована база данных Gene NCBI (National Center for Biotechnology Information). Для дизайна специфических олигонуклеотидов выбрана референсная геномная последовательность GeneBank NC\_000003.12 протяженностью 740 п. о. (в рамках последней публикации сборки генома человека) промоторной области гена *RASSF1* – GRCh38.p14 Primary Assembly. Ген *RASSF1* расположен на 3-й хромосоме (n.g.50329788-50340836), а выбранный фрагмент соответствует участку n.g.50340300-50341100 и содержит 84 СрG-нуклеотида.

Дизайн олигонуклеотидов осуществлен с использованием бесплатного программного онлайн-приложения MethPrimer [9].

Для оценки физических характеристик олигонуклеотидов и свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ), а также для анализа вероятности образования вторичных структур ампликона (гомодимеров и шпилек) использован бесплатный онлайн-алгоритм IDT OligoAnalyzer Tool [10]. В связи с раз-нородной плотностью СрG-сайтов в промоторной области № 1 дизайн олигонуклеотидов осу-ществляли для трех различных регионов (рис. 4).

Последовательности сконструированных праймеров представлены в таблице.

Нуклеотидная последовательность промотора, СрG-нуклеотиды и места посадки синтетиче-ских олигонуклеотидов представлены на рис. 5.

Для отработки методики мсПЦР использовали ДНК пациентов с adenокарциномой легкого, выделенную из парафиновых блоков, и ДНК лейкоцитов периферической крови (отрицательный контроль), в качестве положительного контроля – ДНК лейкоцитов периферической крови, об-работанную метилтрансферазой SS1 (ThermoFisher, США).

Переменные параметры для оптимизации условий ПЦР: температура отжига праймеров – 56–64 °С, концентрация MgCl<sub>2</sub> – 0,5–4 мМ, концентрации праймеров – 0,3–2 пкмоль/мкл, а также их соотношение в смеси.

В ходе оптимизации условий мсПЦР установлено, что наиболее оптимальными наборами праймеров для определения статуса метилирования гена *RASSF1* являются пары 1.1 и 1.2 в концентрациях по 5 пкмоль на реакцию. Данные пары праймеров имеют 3 общих CpG-сайта и 5 различных (2 в первой паре праймеров и 3 во второй). Наиболее оптимальный протокол проведения реакции амплификации: 95 °C – 15 мин; 95 °C – 15 с, 54 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (45 циклов); 72 °C – 5 мин; 4 °C – ∞. Результаты исследования образцов ДНК, полученных из НМРЛ и лейкоцитов периферической крови, представлены на рис. 6.

**Последовательности праймеров для мсПЦР**  
**Sequences of oligonucleotides for msPCR**

Патогенный вариант	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
Promotor 1.1	FM – TTTTGTATTTAGGTTTTATTGCGC RM – CCGTACTTCGCTAACTTTAACG FU – ATTTAGGTTTTATTGTGTGG RU – CCATAACTTCACTAACTTTAACACT
Promotor 1.2	FM – TTAGCGTTAAAGTTAGCGAAGTAC RM – TACCGTATAAAATTACACCGCAT FU – AGTGTAAAGTTAGTGAAGTATGG RU – ACTACCATAAAATTACACACAAT
Promotor 1.3	FM – GGTAGTTAAGGGTAGCGTAGTC RM – TTCAACGATAAAACGAAAATAACG FU – GGGTAGTTAAGGGTAGTGTAGTT RU – TCAACAATAAAACAAAAATAACAAA

П р и м е ч а н и е. Праймеры: F – прямой, R – обратный, M – метилированный, U – неметилированный.

**Валидация результатов методом секвенирования.** Очистку продуктов ПЦР и секвенирования производили методом прямого осаждения спиртом в мягких условиях. Для анализа данных использовали генетический анализатор ABI 3500 (ThermoFisher, США). Полученные последовательности ДНК сравнивали с референсными последовательностями, размещеными в электрон-



Рис. 5. Первый промотор гена *RASSF1*. Серым цветом выделены CpG-нуклеотиды, крупным шрифтом – CpG-нуклеотиды, входящие в состав панели TCGA, жирным шрифтом – олигонуклеотиды для мсПЦР (пара 1.2 зачеркнута)

Fig. 5. First promoter of the *RASSF1* gene. CpG nucleotides highlighted in gray, CpG nucleotides included in the TCGA panel are indicated in large font, and oligonucleotides for MS-PCR are highlighted in bold (pair 1.2. crossed out)

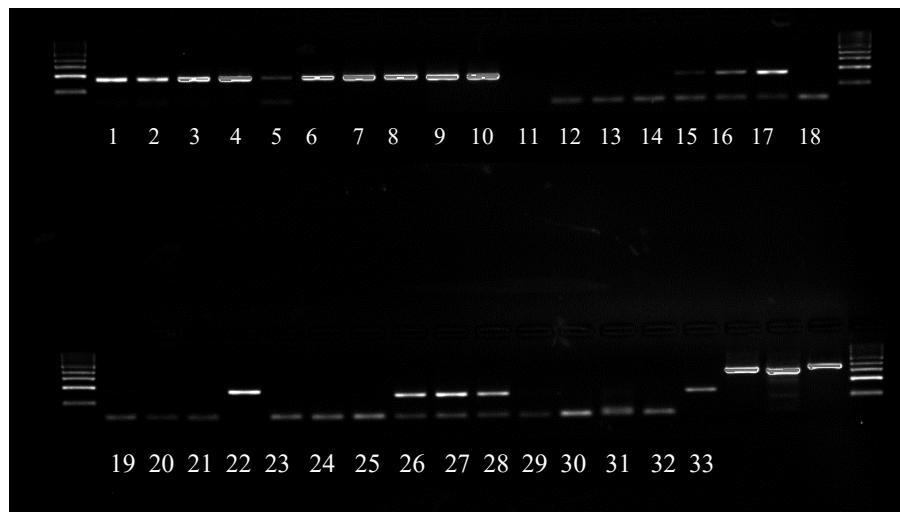


Рис. 6. Результаты гель-электрофореза продуктов мсПЦР: I–II – неметилированная пара праймеров № 2 175 bp (I–6 – НМРЛ, 7–10 – кровь, II – обработка метилтрансферазой), I2–22 – метилированная пара праймеров № 2 174 bp (I2–17 – НМРЛ, 18–21 – кровь, 22 – обработка метилтрансферазой), 23–33 – метилированная пара праймеров № 1 146 bp (23–28 – НМРЛ, 29–32 – кровь, 33 – обработка метилтрасферазой)

Fig. 6. Results of gel electrophoresis msPCR products: 1–11 – unmethylated primer pair No. 2, 175 bp (1–6 – NSCLC, 7–10 – blood, 11 – methyltransferase treatment), 12–22 – methylated primer pair No. 2, 174 bp (12–17 – NSCLC, 18–21 – blood, 22 – methyltransferase treatment), 23–33 – methylated primer pair No. 1, 146 bp (23–28 – NSCLC, 29–32 – blood, 33 – methyltransferase treatment)

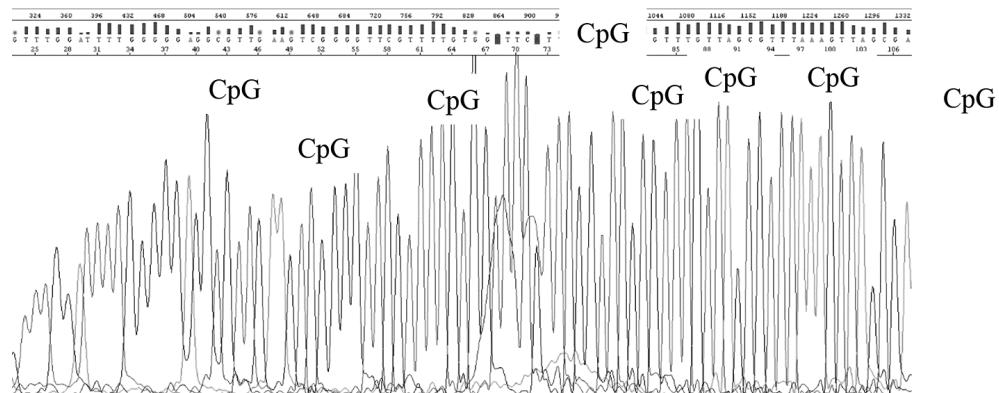


Рис. 7. Электрофорограмма контрольного образца с использованием метилированной пары праймеров 1.1

Fig. 7. Electropherogram of the control sample using methylated primer pair 1.1

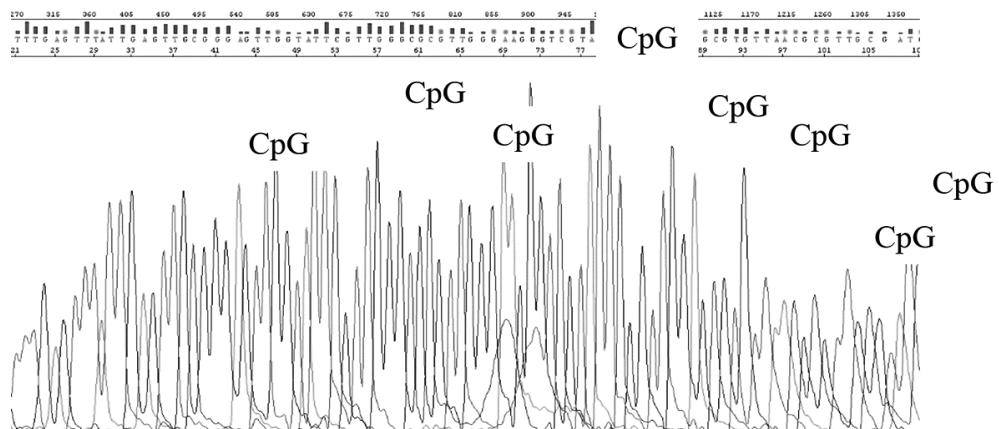


Рис. 8. Электрофорограмма контрольного образца с использованием метилированной пары праймеров 1,2

Fig. 8. Electropherogram of the control sample using methylated primer pair 1.2

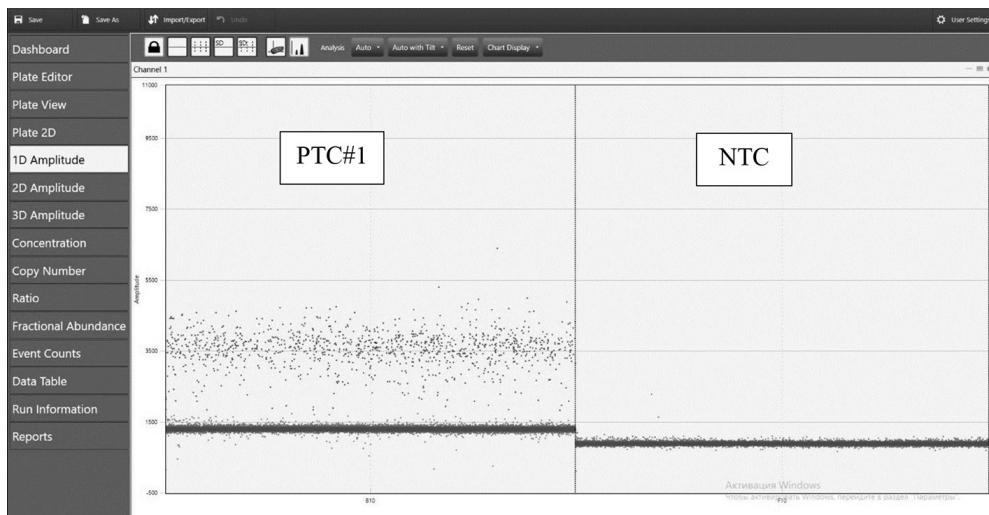


Рис. 9. Результаты цкПЦР метилированного образца опухолевой ткани (РТС № 1) и отрицательного контроля (NTC, ДНК лейкоцитов периферической крови)

Fig. 9. Results of ddPCR analysis of the methylated tumor tissue (PTC No. 1) and the negative control (NTC, DNA from peripheral blood leukocyte)

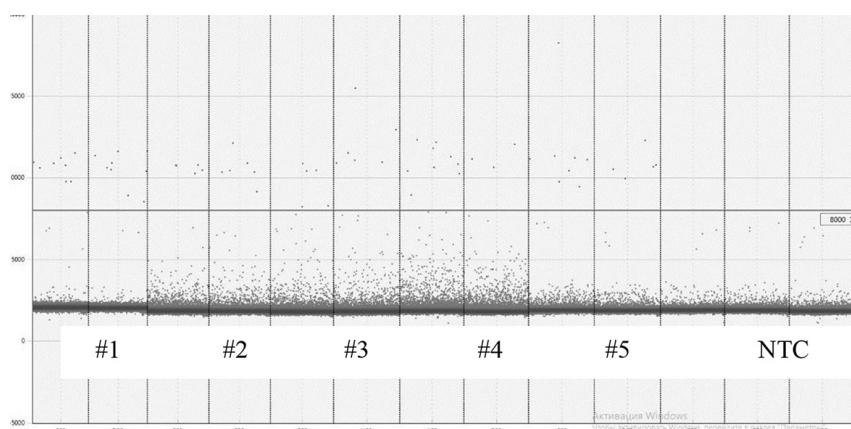


Рис. 10. Результаты цкПЦР серийных образцов плазмы (№ 1–5) от одного пациента с наличием метилирования промотора гена *RASSF1* в опухолевой ткани (дубли) и отрицательного контроля (NTC, вода, триплет)

Fig. 10. Results of ddPCR analysis of series plasma samples (No. 1–5) from a single patient, showing the presence of *RASSF1* promoter methylation in tumor tissue (duplicates) and negative control (NTC, water, triplet)

ной базе данных NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Электрофореграммы контрольных образцов ДНК, обработанных метилтрансферазой, приведены на рис. 7, 8.

*Цифровая капельная ПЦР.* Отобранные пары олигонуклеотидов далее использовали для разработки метода оценки статуса метилирования гена *RASSF1* с помощью цифровой капельной ПЦР (цкПЦР).

цоДНК выделяли из плазмы крови (объем 2 мл). Средняя концентрация образцов составила 0,34 нг/мкл, средняя концентрация цоДНК после бисульфитной конверсии – 0,03 нг/мкл.

В ходе оптимизации условий цкПЦР установлено, что наиболее специфичным набором праймеров является пара 1.1 в концентрациях по 150 нмоль на реакцию, так как пара праймеров 1.2 дает неспецифическую амплификацию неустановленного фрагмента ДНК. Оптимальный протокол проведения реакции амплификации: 95 °C – 5 мин; 95 °C – 30 с, 54 °C – 1 мин (40 циклов); 4 °C – 5 мин; 90 °C – 5 мин; 4 °C – ∞. Дополнительная обработка рестриктазой не проводилась в связи с низкой концентрацией и значительной фрагментацией ДНК. При анализе цоДНК реакцию ставили в дублях.

Среднее количество капель, пригодных для анализа одного образца, составило 20 тыс. на образец для FFPE и 40 тыс. для цДНК. Пороговый уровень для детекции метилирования промоторной области гена *RASSF1* – 3 сигнала.

Дискриминация положительного (FFPE) и отрицательного (ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови) контролей представлена на рис. 9.

Разработанную методику использовали для детекции цДНК пациентов с плоскоклеточным раком легкого в рамках проекта БРФФИ-РНФ № 131, что позволило увеличить исследуемую выборку НМРЛ на 40 %. Пример результатов тестирования 5 серийных образцов плазмы от одного пациента с НМРЛ, у которого ранее в опухоли было выявлено метилирование промотора гена *RASSF1*, представлено на рис. 10.

**Заключение.** Нами разработан метод детекции цДНК у пациентов с НМРЛ, основанный на исследовании специфичного опухолевого маркера, а именно статуса метилирования промоторной области гена *RASSF1* с помощью цифровой капельной ПЦР. Опыт поиска опухоль-специфичных мишенией на основе анализа данных TCGA может быть использован при внедрении в клиническую практику молекулярных технологий изучения внеклеточной ДНК для диагностики заболевания и мониторинга эффективности проводимого противоопухолевого лечения.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ М23 РНФ № 131.

**Acknowledgements.** The work was carried out within the framework of the BRFFR M-23 RSF, grant No. 131.

### Список использованных источников

1. Methylation dynamics of RASSF1A and its impact on cancer / G. Malpeli, G. Innamorati, I. Decimo [et al.] // Cancers. – 2019. – Vol. 11, N 7. – Art. 959. <https://doi.org/10.3390/cancers11070959>
2. RASSF1A, puppeteer of cellular homeostasis, fights tumorigenesis, and metastasis – an updated review / F. Dubois, E. Bergot, G. Zalcman, G. Levallet // Cell Death and Disease. – 2019. – Vol. 10, N 12. – Art. 928. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2169-x>
3. Association of RASSF1A promoter methylation with lung cancer risk: a meta-analysis / Y.-Z. Huang, W. Wu, K. Wu [et al.] // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2014. – Vol. 15, N 23. – P. 10325–10328. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.23.10325>
4. DNA methylation analysis of the SHOX2 and RASSF1A panel using cell-free DNA in the diagnosis of malignant pleural effusion / N. Zhang, Z. Liu, K. Li [et al.] // Journal of Oncology. – 2023. – Vol. 2023. – Art. 5888844. <https://doi.org/10.1155/2023/5888844>
5. Hypermethylated RASSF1A as circulating tumor DNA marker for disease monitoring in neuroblastoma / L. Zogchel, E. Wezel, J. Wijk [et al.] // JCO Precision Oncology. – 2020. – Vol. 4. – P. 291–306. <https://doi.org/10.1200/PO.19.00261>
6. Prognostic value of RASSF1A methylation status in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: A meta-analysis of prospective studies / H. Hu, Y. Zhou, M. Zhang, R. Ding // Biomarkers. – 2019. – Vol. 24, N 3. – P. 207–216. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2019.1583771>
7. National Cancer Institute. The Cancer Genome Atlas. URL: <https://portal.gdc.cancer.gov> (date of access: 12.05.2025).
8. TFSitescan. – URL: <http://www.ifti.org/cgi-bin/ifti/Tfsitescan.pl> (date of access: 12.05.2025).
9. The Li Lab. MethPrimer 2.0. – URL: <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi> (date of access: 12.05.2025).
10. Integrated DNA technologies. OlygoAnalyzer. – URL: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> (date of access: 12.05.2025).

### References

1. Malpeli G., Innamorati G., Decimo I., Bencivenga M., Kamdje A. H. N., Perris R., Bassi C. Methylation dynamics of RASSF1A and its impact on cancer. *Cancers*, 2019, vol. 11, no. 7, art. 959. <https://doi.org/10.3390/cancers11070959>
2. Dubois F., Bergot E., Zalcman G., Levallet G. RASSF1A, puppeteer of cellular homeostasis, fights tumorigenesis, and metastasis – an updated review. *Cell Death and Disease*, 2019, vol. 10, no. 12, art. 928. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2169-x>
3. Huang Y.-Z., Wu W., Wu K., Xu X.-N., Tang W.-R. Association of RASSF1A promoter methylation with lung cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, vol. 15, no. 23, pp. 10325–10328. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.23.10325>
4. Zhang N., Liu Z., Li K., Xing X., Long C., Liu F., She B., Che N. DNA methylation analysis of the SHOX2 and RASSF1A panel using cell-free DNA in the diagnosis of malignant pleural effusion. *Journal of Oncology*, 2023, vol. 2023, art. 5888844. <https://doi.org/10.1155/2023/5888844>
5. Zogchel L., Wezel E., Wijk J., Stutterheim J., Bruins W. S. C., Zappeij-Kannegieter L. [et al.]. Hypermethylated RASSF1A as circulating tumor DNA marker for disease monitoring in neuroblastoma. *JCO Precision Oncology*, 2020, vol. 4, pp. 291–306. <https://doi.org/10.1200/PO.19.00261>

6. Hu H., Zhou Y., Zhang M., Ding R. Prognostic value of RASSF1A methylation status in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: A meta-analysis of prospective studies. *Biomarkers*, 2019, vol. 24, no. 3, pp. 207–216. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2019.1583771>
7. National Cancer Institute. *The Cancer Genome Atlas*. Available at: <https://portal.gdc.cancer.gov> (accessed 12.05.2025).
8. TFSitescan. Available at: <http://www.ifti.org/cgi-bin/ifti/Tfsitescan.pl> (accessed 12.05.2025).
9. The Li Lab. *MethPrimer 2.0*. Available at: <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi> (accessed 12.05.2025).
10. Integrated DNA technologies. *OlygoAnalyzer*. Available at: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> (accessed 12.05.2025).

## Інформація об авторах

*Смирнов Сергей Юрьевич* – биолог. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н. Н. Александрова (223040, а/т Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: rustledeath24@gmail.com

*Медведь Антонина Викторовна* – врач клинической лабораторной диагностики. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н. Н. Александрова (223040, а/т Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: dr.medvedav@gmail.com

*Пивоварчик Сергей Николаевич* – врач-онколог. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н. Н. Александрова (223040, а/т Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: serginio0290@rambler.ru

*Вахомчик Татьяна Георгиевна* – врач-радиолог. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н. Н. Александрова (223040, а/т Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: chik-city@tut.by

*Короткевич Павел Евгеньевич* – канд. мед. наук, доцент, заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н. Н. Александрова (223040, а/т Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: pavelkorotkevich@mail.ru

*Субоч Елена Ивановна* – канд. мед. наук, доцент, заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н. Н. Александрова (223040, а/т Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: helen\_suboch@mail.ru

*Портянко Анна Сергеевна* – д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н. Н. Александрова (223040, а/т Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: a\_port@mail.ru

## Information about the authors

*Siarhei Y. Smirnov* – biologist. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: rustledeath24@gmail.com

*Antonina V. Medvedz* – doctor of clinical laboratory diagnostic. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: dr.medvedav@gmail.com

*Siarhei N. Pivavarchyk* – oncologist. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: serginio0290@rambler.ru

*Tatsiana G. Vakhomchyk* – radiologist. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: chik-city@tut.by

*Pavel E. Karatkevich* – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Head of the Department. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: pavelkorotkevich@mail.ru

*Helen I. Subach* – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Head of the Department. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: helen\_suboch@mail.ru

*Anna S. Portyanko* – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: a\_port@mail.ru