

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-53-60



# Жидкостная биопсия колоректального рака: новый подход к оценке aberrантного метилирования гена *SEPT9*

И.В. Ботезату, В.Н. Кондратова, А.М. Строганова, С.Л. Дранко, А.В. Лихтенштейн

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Анатолий Владимирович Лихтенштейн [alicht@mail.ru](mailto:alicht@mail.ru)

**Введение.** Гиперметилированные CpG-островки в промоторах генов-супрессоров (в частности, *SEPT9*) – клинически значимые опухолевые маркеры, широко используемые в жидкостной биопсии. Для количественной оценки гиперметилированных ДНК обычно используют полимеразную цепную реакцию в реальном времени с метилспецифическими праймерами. Этот метод требует нормализации данных, зависит от степени вариабельности числа копий генов-калибраторов и весьма трудоемок.

**Цель исследования** – разработка альтернативного метода оценки aberrантного метилирования посредством количественного анализа плавления ДНК (qDMA, quantitative DNA melting analysis).

**Материалы и методы.** Образцы ДНК, выделенные из плазмы крови здоровых доноров и больных колоректальным раком, анализировали методом qDMA, включающим: 1) асимметричную полимеразную цепную реакцию с метил-независимыми индивидуально подобранными праймерами к гену *SEPT9*; 2) использование зонда TaqMan, гибридирующегося с 2 CpG-динуклеотидами ампликона; 3) постамплификационное плавление гибридов зонд/ампликон; 4) количественный анализ плавления ДНК.

**Результаты.** Метод испытан на гене *SEPT9* (применялся в жидкостной биопсии колоректального рака). Различия в степени метилирования *SEPT9* между группами здоровых ( $n = 41$ ) и больных ( $n = 39$ ) людей статистически значимы ( $p < 0,0001$ ). Определена диагностическая эффективность qDMA: AUC ROC (area under curve – площадь под ROC-кривой) – 0,812 (после перекрестной валидации – 0,801), чувствительность – 90 %, специфичность – 66 %.

**Заключение.** Предлагаемый метод количественной оценки aberrантно метилированных ДНК прост, реализуется в закрытом формате, не требует нормализации и построения стандартных кривых. Предполагается возможность его оптимизации посредством применения мультиплексного варианта с одновременным анализом нескольких маркеров.

**Ключевые слова:** жидкостная биопсия, колоректальный рак, ген *SEPT9*, анализ плавления ДНК

**Для цитирования:** Ботезату И.В., Кондратова В.Н., Строганова А.М. и др. Жидкостная биопсия колоректального рака: новый подход к оценке aberrантного метилирования гена *SEPT9*. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(4):53–60. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-53-60.

## Liquid biopsy of colorectal cancer: a new approach to evaluation of aberrant methylation of the *SEPT9* gene

I.V. Botezatu, V.N. Kondratova, A.M. Stroganova, S.L. Dranko, A.V. Lichtenstein

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Contacts:** Anatoly Vladimirovitch Lichtenstein [alicht@mail.ru](mailto:alicht@mail.ru)

**Introduction.** Hypermethylated CpG islands in the promoters of suppressor genes (in particular, *SEPT9*) are clinically significant markers of malignant growth that are widely used in liquid biopsy. Real-time polymerase chain reaction with methylation-specific primers is commonly used to quantify hypermethylated DNA. The method requires data normalization, depends on copy number variability of the calibrator genes, and is rather laborious.

**The study subject** is to develop an alternative qDMA method (quantitative DNA Melting Analysis).

**Materials and methods.** DNA samples isolated from blood plasma of healthy donors and colorectal cancer patients were analyzed by the method including: 1) asymmetric polymerase chain reaction with methylation-independent

individually selected primers for the SEPT9 gene; 2) using the TaqMan probe hybridizing to two CpG dinucleotides in the amplicon; 3) post-amplification melting of probe/amplicon hybrids; 4) quantitative analysis of DNA melting. **Results.** The method was tested on the SEPT9 gene in liquid biopsy of colorectal cancer. Differences in SEPT9 methylation in healthy donors ( $n = 41$ ) and cancer patients ( $n = 39$ ) were statistically significant ( $p < 0.0001$ ). Analytical sensitivity and diagnostic efficiency of qDMA were determined: AUC (area under curve) ROC – 0.812 (according to the result of 10-fold cross-validation AUC ROC – 0.801), sensitivity – 90%, specificity – 66%.

**Conclusion.** The proposed method for the quantitative assessment of aberrantly methylated DNA is simple, implemented in the closed-tube format, does not require normalization and usage of standard curves. The possibility of optimization through the use of a multiplex variant with simultaneous analysis of several markers is assumed.

**Key words:** liquid biopsy, colorectal cancer, SEPT9 gene, DNA melting analysis

**For citation:** Botezatu I.V., Kondratova V.N., Stroganova A.M. et al. Liquid biopsy of colorectal cancer: a new approach to evaluation of aberrant methylation of the SEPT9 gene. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2021;8(4):53–60. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-53-60.

## ВВЕДЕНИЕ

Жидкостная биопсия основана на анализе циркулирующих в плазме крови нуклеиновых кислот (ДНК, мРНК (матричной РНК), микроРНК) и направлена на скрининг, раннюю диагностику и прогноз онкологического заболевания, выявление остаточной болезни, мониторинг эффективности терапии и эволюции опухолевых клонов [1, 2]. Одной из главных мишеней этой биопсии являются гиперметилированные CpG-островки в промоторах генов-супрессоров, для выявления которых применяют, как правило, бисульфитную обработку ДНК и различные варианты анализа на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) [3–6].

При использовании наиболее широко применяемой в клинической практике ПЦР в реальном времени с метилспецифическими праймерами (МС-ПЦР – MS-PCR) возникает ряд проблем. Во-первых, необходимо учитывать непредсказуемую гетерогенность CpG-островков (имеется в виду разнообразие паттернов их метилирования) [7]. В связи с этим использование метилспецифических праймеров (т.е. праймеров, содержащих CpG-динуклеотиды) может исказить общую картину: избирательно амплифицировать лишь какую-то субпопуляцию метилированных последовательностей. Во-вторых, в дополнение к построению стандартной кривой для анализируемого гена (в данном случае *SEPT9*) для нормализации количественных показателей необходимо построение стандартной кривой также для гена-калибратора (обычно *ACT1NB*), не содержащего CpG-динуклеотиды и не подверженного изменению числа копий [8–11]. Показаны, однако, значительная вариабельность результатов при использовании одного калибратора [12] и необходимость использования нескольких из них [13], что усложняет анализ. В-третьих, принято считать, что гены-калибраторы во всех отношениях подобны исследуемому гену, но это всего лишь более или менее вероятное предположение. Степень деградации ДНК и скорость ее поступления в кровоток могут быть неодинаковыми для разных генов, что в ряде случаев приводит к различиям в числе копий и длине соответствующих фрагментов и, соответственно, к разной кинетике их амплификации. В-четвертых, для обработанной бисульфитом ДНК

известен феномен предпочтительной амплификации неметилированных последовательностей [14], который может привести к неверным результатам.

Некоторые из этих проблем могут быть устранены, во-первых, использованием метилнезависимых праймеров (т.е. праймеров, не содержащих CpG-динуклеотиды) и, во-вторых, отказом от применения ПЦР в реальном времени в пользу ПЦР с анализом результатов по конечной точке (end-point ПЦР), предполагающей анализ конечного продукта, а не кинетики его синтеза. Наиболее удобен при этом реализуемый «в закрытом формате» метод HRMA (high resolution melting analysis – анализ плавления ДНК с высоким разрешением) [15, 16]. Однако и он имеет ряд ограничений: появление неспецифических пиков плавления ДНК при использовании интеркалирующих красителей, сложность количественного анализа плавления длинных ампликонов, проблема предпочтительной амплификации неметилированных последовательностей.

В данной работе для оценки aberrантного метилирования ДНК применен метод qDMA, разработанный нами ранее для выявления генных мутаций [17, 18]. Испытание qDMA проводили на гене *SEPT9* как маркере, наиболее востребованном в жидкостной биопсии разных форм рака [19, 20].

**Цель исследования** – разработка альтернативного метода оценки aberrантного метилирования посредством количественного анализа плавления ДНК (qDMA, quantitative DNA melting analysis).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клинические образцы.** В исследование включены случайно отобранные 39 пациентов с колоректальным раком, проходивших лечение в клинике Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, и 41 здоровый донор. Клинические характеристики больных представлены в табл. 1.

Выделение ДНК проводили методом фенол-хлороформной депротеинизации [17].

**Бисульфитная конверсия ДНК.** К ДНК, выделенной из 1 мл плазмы крови, прибавляли 300 нг ДНК спермы

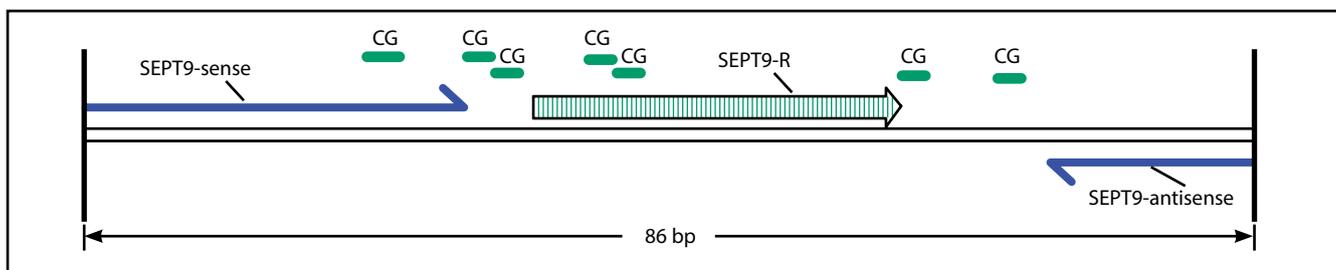
**Таблица 1.** Клинические характеристики пациентов с колоректальным раком**Table 1.** Clinical characteristics of patients with colorectal cancer

Показатель Parameter	Число пациентов, абс. (n = 39) Number of patients, abs. (n = 39)
Пол: Gender:	
мужской male	16
женский female	23
Возраст: Age:	
медиана median	58
интервал range	31–84
Стадия Stage	
Tis	1
T3	23
T4	13
Tx	2
Локализация: Localization:	
слепая кишка caecum	1
ободочная кишка colon	24
прямая кишка rectum	14

лосоя во избежание потерь из-за неспецифической сорбции, что повышало выход конвертированной ДНК (каждый опыт включал соответствующий контроль). Бисульфитную обработку ДНК проводили с использованием DNA Methylation-Gold Kit TM (Cat. № D5005, Zymo Research, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. ДНК элюировали 20 мкл буфера для элюции и хранили при 20 °С. В реакцию (объем – 25 мкл) вносили 3 мкл конвертированной ДНК.

**Асимметричная ПЦР и количественный анализ плавления ДНК.** Последовательность ампликона 5 гена *SEPT9* (GenBank Accession number NC\_000017) [21] амплифицировали в 2 параллелях посредством асимметричной ПЦР с зондом TaqMan. Праймеры и зонд подбирали с помощью программ Integrative Genomics Viewer (v. 2.8.2), Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Corp., Карлсбад, Калифорния, США), SnapGene Viewer 5.3.2 (GSL Biotech LLC, Сан-Диего, США) и MeltCalc [22]. Последовательности праймеров и зонда TaqMan представлены в табл. 2, а их взаимное расположение – на рис. 1. Зонд SEPT9-R (27 оснований) взаимодействует с 2 CpG-динуклеотидами (chr17: 75369601–75369604, human hg19) – индикаторами метилирования *SEPT9*.

Асимметричную ПЦР вели в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Инкубационная смесь (25 мкл) содержала: 50 мМ Трис-НСl, рН 8,8; 50 мМ КСl; 4 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,25 мМ каждого дНТФ; 0,2 мкМ зонда SEPT9-R; 0,08 мкМ праймера SEPT9-sense и 0,4 мкМ праймера SEPT9-antisense; 2,5 ед Hot-rescue

**Рис. 1.** Схема расположения праймеров, зонда *SEPT9-R* (с флуорофором ROX) и CpG-динуклеотидов (отмечены зелеными штрихами) в ампликоне *SEPT9***Fig. 1.** Schematic presentation of primers, *SEPT9-R* TaqMan probe (with ROX fluorophore) and CpG dinucleotides (marked with green strokes) in the *SEPT9* amplicon**Таблица 2.** Последовательности праймеров и зонда TaqMan для ампликона *SEPT9***Table 2.** Sequences of primers and the TaqMan probe for the *SEPT9* amplicon

Праймеры, зонд Primers, probe	Последовательности Sequences
SEPT9-sense	5'-GTTGTTTATTAGTTATTATGTA <u>AGG</u> ATTT*
SEPT9-antisense	5'-AACCCAACACCCACC
SEPT9-R	5'-ROX-TTAATGTGTAGTTGGATGGGATTATTT-BHQ2**

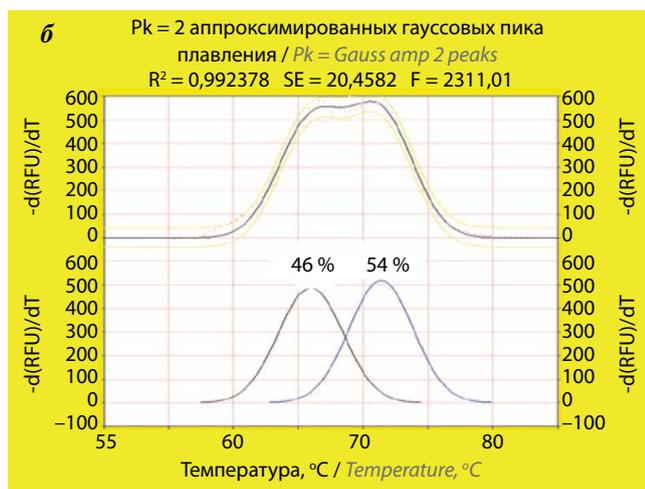
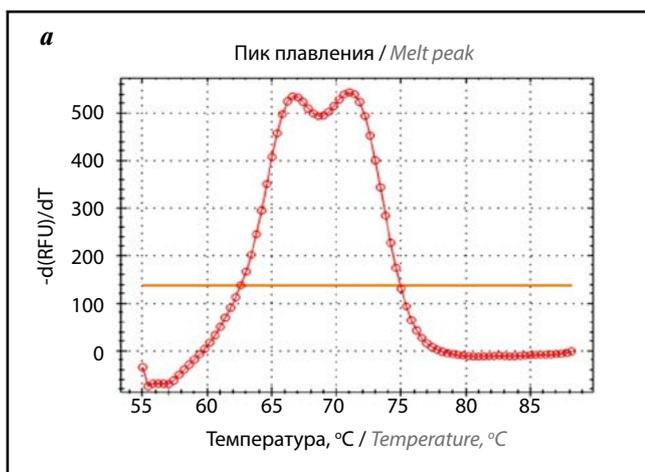
\*Неспаренное основание A в праймере выделено подчеркиванием. \*\*Основания T в зонде *SEPT9-R*, возникающие в результате бисульфитной конверсии неметилированных CpG-динуклеотидов, выделены жирным шрифтом.

\*Mismatched base A in the primer is underlined. \*\*The T bases in the *SEPT9-R* probe resulting from bisulfite conversion of unmethylated CpG dinucleotides are shown in bold.

Taq polymerase («Синтол», Москва); 3 мкл раствора ДНК. Условия ПЦР: начальная денатурация – 5 мин при 95 °С; 55 циклов по 13 с при 95 °С, 40 с при 58 °С, 30 с при 72 °С (с регистрацией флуоресценции).

Дуплексы зонд/ампликон плавят по завершении ПЦР: денатурация – 1 мин при 95 °С, ренатурация – 2 мин при 52 °С, плавление – от 35 до 75 °С (инкремент – 0,4 °С, выдержка – 6 с, скорость нагревания – 3,3 °С/с).

Количественный анализ плавления ДНК с использованием программы PeakFit (v. 4.12.00; SeaSolve Software Inc., Сан-Хосе, Калифорния, США) проводили, как описано ранее [17, 18]. Для измерения площадей под гауссовыми пиками плавления после вычитания фона использовали итеративную процедуру аппроксимации кривой методом наименьших квадратов (рис. 2).



**Рис. 2.** Количественный анализ плавления ДНК: а – показания модуля плавления CFX96; б – компьютерная обработка (над рисунком – статистические показатели аппроксимации кривой). Обработка сигнала включает удаление фона, разделение перекрывающихся пиков, определение площадей под гауссовыми пиками. SE – стандартная ошибка;  $R^2$  – коэффициент детерминации

**Fig. 2.** Quantitative DNA melting analysis: a – readings of the CFX96 melting module; б – computer processing (above the figure – statistical indicators of curve approximation). Signal processing includes background removal, separation of overlapping peaks, determination of areas under Gaussian peaks. SE – standard error;  $R^2$  – coefficient of determination

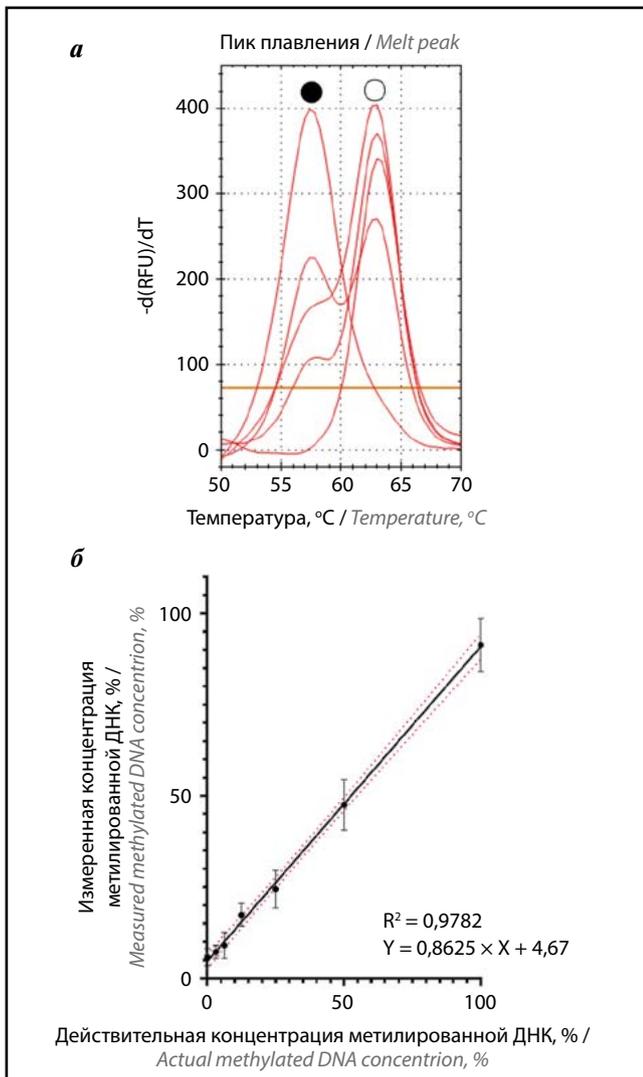
**Статистический анализ.** Статистический анализ проведен с помощью GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США) и онлайн-сервера CombiROC [23]. Для сравнения уровня метилирования *SEPT9* в ДНК плазмы крови здоровых доноров и больных колоректальным раком использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Линейный регрессионный анализ проводили для оценки чувствительности qDMA, логистический регрессионный анализ – для построения ROC-кривых и определения AUC (area under curve – площади под ROC-кривой). Десятикратная перекрестная валидизация (10-fold cross-validation) была предпринята для исключения эффекта over-fitting и определения диагностической эффективности qDMA [23]. Все статистические тесты были двусторонними, статистически значимой принята величина  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для количественной оценки aberrантного метилирования в метод qDMA введен ряд модификаций, в частности: 1) дизайн максимально коротких ампликонов; 2) асимметричная ПЦР с «ручным» подбором метилнезависимых праймеров; 3) расположение зонда TaqMan над 2 CpG-динуклеотидами – «индикаторами» степени метилирования *SEPT9* (см. рис. 1); 4) замена в зонде оснований С на Т; 5) количественный анализ пиков плавления, соответствующих метилированному и неметилированному аллелям *SEPT9* в исходном образце ДНК.

Указанные модификации основаны на следующих соображениях. ДНК плазмы крови фрагментирована, в силу чего амплификация происходит тем эффективнее, чем короче ампликон. Выбор метилнезависимых праймеров обусловлен необходимостью вовлечения в анализ всех (а не выборочных) аллелей *SEPT9*. Известные программы подбора праймеров и зондов, как правило, не справляются с этой задачей, что делает неизбежным «ручной» дизайн (имеются в виду «подгонка» величин  $T_m$ , контроль некомплементарности 3'-концов, отсутствия палиндромов, неспецифической амплификации, гашения флуоресценции и т.п.). Когда в процессе «подгонки» избежать присутствия CpG-динуклеотида в праймере не удавалось, основание С заменяли в нем неспаренным основанием А, «не различающим», судя по термодинамическим показателям, метилированные и неметилированные CpG-динуклеотиды. Что касается замены оснований С на Т в зонде TaqMan, то они имели целью сделать его последовательность комплементарной неметилированным аллелям. Это должно было снизить эффект предпочтительного синтеза неметилированных аллелей [14, 24, 25].

Зонды TaqMan, изначально предложенные для ПЦР в реальном времени [26], нашли применение также в постамплификационном плавлении ДНК [27]. Оно становится возможным при условии проведения асимметричной ПЦР, когда оказавшаяся в избытке нить ампликона может взаимодействовать с зондом. Образующийся



**Рис. 3.** Определение аналитической чувствительности qDMA посредством серийных разведений метилированной ДНК (конечная концентрация 100, 50, 25, 12,5 и 0 % – 6 повторов) в неметилированной ДНК: а – пики плавления неметилированной и метилированной ДНК (указаны символами о и • соответственно); б – линейная регрессия фактической и измеренной концентраций метилированной ДНК. Планки погрешностей – средние с 95 % доверительным интервалом.  $R^2$  – коэффициент детерминации

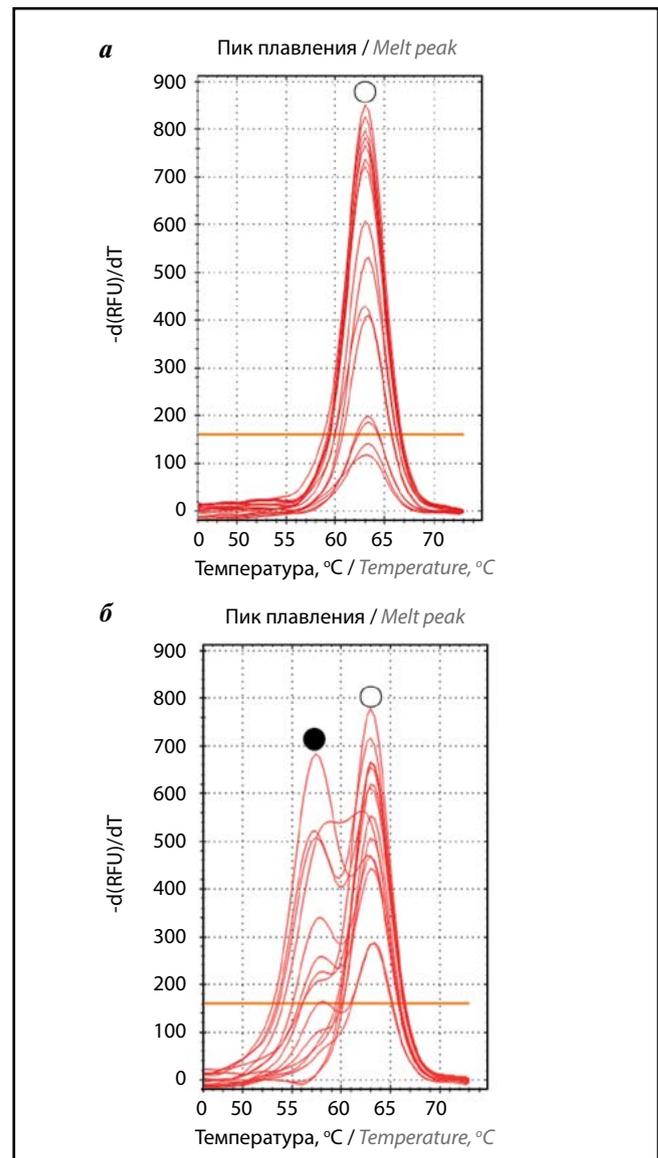
**Fig. 3.** Determination of the analytical sensitivity of qDMA by serial dilutions of methylated DNA (final concentration 100, 50, 25, 12.5 and 0 % – 6 repeats) in unmethylated DNA: а – melt peaks of unmethylated and methylated DNA (indicated by symbols o and •, respectively); б – linear regression of the actual and measured concentrations of methylated DNA. Error bars are means with 95 % confidence intervals.  $R^2$  – coefficient of determination

короткий гибрид крайне чувствителен к неспаренным основаниям и претерпевает при плавлении сильно выраженный температурный сдвиг, не требующий для визуализации и количественной оценки использования технологии HRMA [24, 27, 28].

**Аналитическая чувствительность qDMA.** Диагностический метод характеризуют 3 показателя: LoB (Limit of Blank) – предел негативного контроля, LoD (Limit of Detection) – предел обнаружения, LoQ (Limit of Quantitation) – предел количественного измерения [29].

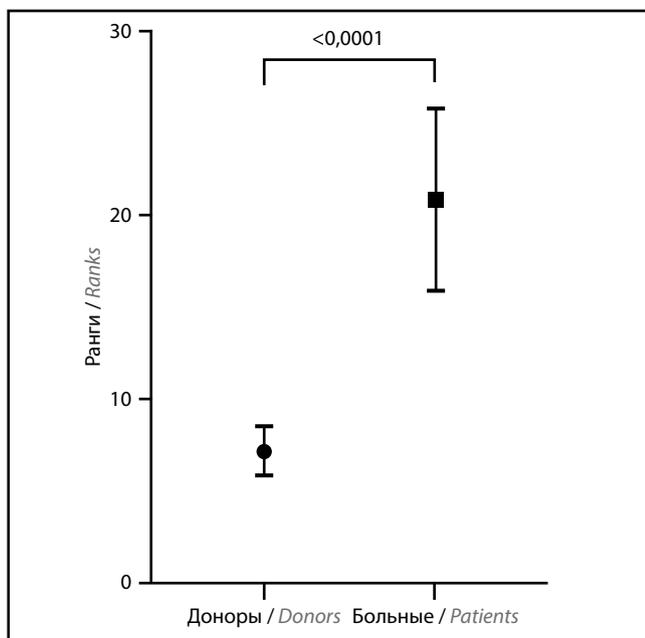
LoB – наибольший ложноположительный результат, регистрируемый при повторных измерениях негативного (не содержащего исследуемое вещество) контроля. В 20 образцах неметилированной ДНК с помощью qDMA определяли процентное содержание метилированной ДНК. Показатели суммировали, находили среднее и стандартное отклонение (SD). Величина LoB, определяемая по формуле  $LoB = \text{среднее} + 1,645 \times SD$ , составила 6,5 %.

LoD – минимальная концентрация анализируемого вещества, которую можно надежно отличить от LoB. Величина LoD, определенная аналогично LoB, но по иной формуле ( $LoD = \text{среднее} + 3 \times SD$ ), составила 8,7 %.



**Рис. 4.** Профили плавления SEPT9: а – здоровые доноры (15 образцов), б – больные колоректальным раком (15 образцов). Пики плавления неметилированной и метилированной ДНК указаны символами о и • соответственно

**Fig. 4.** Patterns of SEPT9 melting: а – healthy donors (15 samples); б – colorectal cancer patients (15 samples). Melt peaks of unmethylated and methylated DNA are indicated by symbols o and •, respectively



**Рис. 5.** Сравнение степени метилирования *SEPT9* в циркулирующей ДНК плазмы крови здоровых доноров и больных колоректальным раком (непараметрический критерий Манна–Уитни). Планки погрешностей – средние с 95 % доверительным интервалом  
**Fig. 5.** Comparison of *SEPT9* methylation in circulating DNA from healthy donors and colorectal cancer patients (nonparametric Mann–Whitney test). The bars indicate the mean with 95 % confidence interval

LoQ – минимальная концентрация, при которой анализируемое вещество может быть не только обнаружено, но и количественно измерено. Для определения величины LoQ серийные разведения метилированной ДНК в неметилированной ДНК (по 6 параллелей каждого образца с конечной концентрацией метилированной ДНК – 100, 50, 25, 12,5 и 0 %) анализировали методом qDMA (рис. 3а). Регрессионный анализ выявляет хорошую корреляцию между реальным содержанием метилированной ДНК в исследованных образцах и результатами количественных измерений пиков плавления (рис. 3б). Величина LOQ составила 12 % метилированного *SEPT9* как наименьшая процентная концентрация, определяемая с показателем CV (coefficient of variance) <20 % [29].

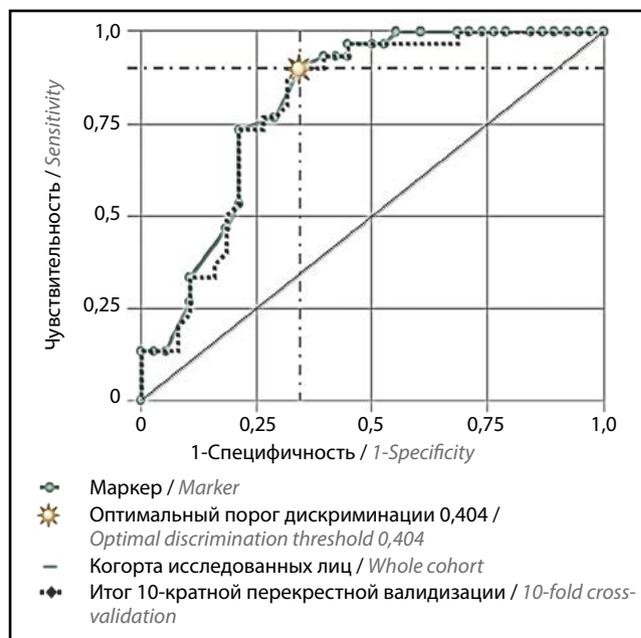
**Таблица 3.** Количественные показатели чувствительности и специфичности qDMA

**Table 3.** Quantitative indicators of sensitivity and specificity of qDMA

Тип данных Dataset type	AUC	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %
Вся когорта Whole cohort	0,812	90,0	65,8
Десятикратная перекрестная валидизация 10-fold cross-validation	0,801	90,0	65,8

**Примечание.** AUC – area under curve (площадь под кривой ROC).

**Note.** AUC – area under curve.



**Рис. 6.** Диагностическая эффективность qDMA  
**Fig. 6.** Diagnostic efficiency of qDMA

**Диагностическая эффективность qDMA.** Исследование проведено на когорте, включающей 41 здорового донора и 39 больных колоректальным раком. Выделенные из плазмы крови образцы ДНК обрабатывали бисульфитом, после чего подвергали асимметричной ПЦР с зондом *SEPT9-R* и последующим qDMA. На рис. 4 представлены профили плавления дуплексов *SEPT9-R*/ампликон здоровых и больных людей (по 15 образцов тех и других), демонстрирующие явные различия в степени метилирования *SEPT9*. Различия статистически достоверны (рис. 5).

Пригодность qDMA гена *SEPT9* для жидкостной биопсии колоректального рака оценивали посредством ROC-анализа (рис. 6). Величина AUC, определяющая эффективность диагностического теста, составила 0,812 (чувствительность – 90 %, специфичность – 66 %), что можно считать хорошим результатом, особенно учитывая первую попытку применения этого метода и использование лишь одного маркера, а не панели нескольких

маркеров. Указанные показатели сохранили свои прежние значения после процедуры 10-кратной перекрестной валидации (cross-validation) (табл. 3).

### ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании показана принципиальная возможность использования qDMA для оценки аберрантного метилирования клинически значимых генов. Учитывая малый размер зондируемой «мишени» (всего 2 CpG-динуклеотида), можно предположить, что, несмотря на известную гетерогенность паттернов метилирования CpG-островков [7], значительная масса CpG-динуклеотидов подвергается метилированию синхронно и координированно. Это наблюдение уравнивает шансы предлагаемого нами qDMA и общепринятого HRMA, использующего интеркалирующие красители и способного анализировать ампликон целиком (и, следовательно, десятки CpG-динуклеотидов) [5, 30–32].

Таким образом, хотя qDMA и уступает HRMA в раз- мере анализируемой последовательности, он имеет преимущества в простоте исполнения, возможности мультиплексного анализа, специфичности и чувствительности. Последнее обусловлено дестабилизирующим эффектом неспаренных оснований, который тем сильнее, чем короче анализируемый дуплекс. Поэтому в qDMA значительно отчетливее, чем в HRMA (где часто имеет место суперпозиция плавления нескольких структурных доменов), выражены температурные

сдвиги, и они легче поддаются количественному анализу. Таким образом, метод qDMA, не требующий необходимых для HRMA оборудования и программного обеспечения, имеет ряд преимуществ: он более прост в использовании и позволяет осуществлять одновременный количественный анализ нескольких маркеров.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод асимметричной ПЦР с использованием зондов TaqMan, метилнезависимых праймеров и пост-амплификационного количественного анализа плавления ДНК (qDMA), предлагаемый для количественной оценки аберрантно метилированных ДНК, реализуется в закрытом формате, прост в исполнении, не требует нормализации и построения стандартных кривых. Предполагается возможность повышения его диагностической эффективности посредством применения мультиплексного варианта для одновременного анализа нескольких маркеров. Кроме того, увеличение анализируемой «мишени» (т.е. числа зондируемых CpG-динуклеотидов) повышает эффективность теста (здесь не представлено). Прямое сопоставление на 1 когорте испытуемых лиц разных подходов – общепринятого (ПЦР в реальном времени с метилспецифическими праймерами) и оригинального (асимметричной ПЦР с метилнезависимыми праймерами, зондами TaqMan и qDMA) – является предметом дальнейших исследований.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Serrano M.J., Garrido-Navas M.C., Diaz Mochon J.J. et al. Precision prevention and cancer interception: the new challenges of liquid biopsy. *Cancer Discovery* 2020;10(11):1635–44. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-0466.
- Cescon D.W., Bratman S.V., Chan S.M. et al. Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology. *Nature Cancer* 2020;1:276–90. DOI: 10.1038/s43018-020-0043-5.
- Xiong Z., Laird P.W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997;25(12):2532–4. DOI: 10.1093/nar/25.12.2532.
- Worm J., Aggerholm A., Guldborg P. In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis. *Clinical Chemistry* 2001;47(7):1183–9.
- Tse M.Y., Ashbury J.E., Zwingerman N. et al. A refined, rapid and reproducible high resolution melt (HRM)-based method suitable for quantification of global LINE-1 repetitive element methylation. *BMC Research Notes* 2011;4:565. DOI: 10.1186/1756-0500-4-565.
- Quillien V., Lavenu A., Karayan-Tapon L. et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer* 2012;118(17):4201–11. DOI: 10.1002/cncr.27392.
- Korshunova Y., Maloney R.K., Lakey N. et al. Massively parallel bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA. *Genome Res* 2008;18(1):19–29. DOI: 10.1101/gr.6883307.
- Sepulveda A.R., Jones D., Ogino S. et al. CpG methylation analysis-current status of clinical assays and potential applications in molecular diagnostics: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2009;11(4):266–78. DOI: 10.2353/jmoldx.2009.080125.
- Egger G., Wielscher M., Pulverer W. et al. DNA methylation testing and marker validation using PCR: diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diagn* 2012;12(1):75–92. DOI: 10.1586/erm.11.90.
- Dietrich D., Jung M., Puetzer S. et al. Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 DNA methylation and cytology in benign, paramalignant and malignant pleural effusions. *PLoS ONE* 2013;8(12):e84225. DOI: 10.1371/journal.pone.0084225.
- De Vos L., Gevensleben H., Schrock A. et al. Comparison of quantification algorithms for circulating cell-free DNA methylation biomarkers in blood plasma from cancer patients. *Clin Epigenetics* 2017;9(1):125. DOI: 10.1186/s13148-017-0425-4.
- Pharo H.D., Honne H., Vedeld H.M. et al. Experimental factors affecting the robustness of DNA methylation analysis. *Sci Rep* 2016;6:33936. DOI: 10.1038/srep33936.
- Pharo H.D., Andresen K., Berg K.C.G. et al. A robust internal control for high-precision DNA methylation analyses by droplet digital PCR. *Clin Epigenetics* 2018;10:24. DOI: 10.1186/s13148-018-0456-5.
- Warnecke P.M., Stirzaker C., Melki J.R. et al. Detection and measurement of PCR

- bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res* 1997;25(21):4422–6. DOI: 10.1093/nar/25.21.4422.
15. Wojdacz T.K., Hansen L.L., Dobrovic A. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. *BMC Res Notes* 2008;1:54. DOI: 10.1186/1756-0500-1-54.
  16. Wojdacz T.K., Borgbo T., Hansen L.L. Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications. *Epigenetics* 2009;4(4):231–4. DOI: 10.4161/epi.9020.
  17. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Shelepov V.P. et al. Asymmetric mutant-enriched polymerase chain reaction and quantitative DNA melting analysis of KRAS mutation in colorectal cancer. *Anal Biochem* 2020;590:1–9. DOI: 10.1016/j.ab.2019.113517.
  18. Kondratova V.N., Botezatu I.V., Shelepov V.P. et al. SLAM-MS: mutation scanning of stem-loop amplicons with TaqMan probes by quantitative DNA melting analysis. *Sci Rep* 2020;10:5476. DOI: 10.1038/s41598-020-62173-x.
  19. Лазаревич Н.Л., Абрамов П.М., Федорова М.Д. и др. Идентификация нового сайта метилирования в промоторном районе гена *Sept9* для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы. *Успехи молекулярной онкологии* 2019;6(4):26–37. [Lazarevich N.L., Abramov P.M., Fedorova M.D. et al. Identification of a new methylation site in the *Sept9* promoter region for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6:26–37. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-26-37.
  20. Sui J., Wu X., Wang C. et al. Discovery and validation of methylation signatures in blood-based circulating tumor cell-free DNA in early detection of colorectal carcinoma: a case-control study. *Clin Epigenetics* 2021;13:26. DOI: 10.1186/s13148-020-00985-4.
  21. Wasserkort R., Kalmar A., Valcz G. et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer* 2013;13:398. DOI: 10.1186/1471-2407-13-398.
  22. Schutz E., von Ahnen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques* 1999;27(6):1218–22, 1224. DOI: 10.2144/99276bc04.
  23. Mazzara S., Rossi R.L., Grifantini R. et al. CombiROC: an interactive web tool for selecting accurate marker combinations of omics data. *Sci Rep* 2017;7:45477. DOI: 10.1038/srep45477.
  24. Botezatu I.V., Panchuk I.O., Stroganova A.M. et al. TaqMan probes as blocking agents for enriched PCR amplification and DNA melting analysis of mutant genes. *Biotechniques* 2017;62(2):62–8. DOI: 10.2144/000114515.
  25. Montgomery J.L., Rejali N., Wittwer C.T. The influence of nucleotide sequence and temperature on the activity of thermostable DNA polymerases. *J MolDiagn* 2014;16(3):305–13. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2014.01.006.
  26. Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J. et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995;4(6):357–62. DOI: 10.1101/gr.4.6.357.
  27. Huang Q., Liu Z., Liao Y. et al. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes. *PLoS ONE* 2011;6(4):e19206. DOI: 10.1371/journal.pone.0019206.
  28. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova C.A. et al. Optimization of melting analysis with Taqman probes for detection of KRAS, NRAS and BRAF mutations. *Anal Biochem* 2015;491:75–83. DOI: 10.1016/j.ab.2015.09.005.
  29. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 2008;29(Suppl 1):S49–52.
  30. Wojdacz T.K., Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 2007;35(6):e41. DOI: 10.1093/nar/gkm013.
  31. Malentacchi F., Forni G., Vinci S. et al. Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol. *Nucleic Acids Res* 2009;37(12):e86. DOI: 10.1093/nar/gkp383.
  32. Spitzwieser M., Entfellner E., Werner B. et al. Hypermethylation of CDKN2A exon 2 in tumor, tumor-adjacent and tumor-distant tissues from breast cancer patients. *BMC Cancer* 2017;17:260. DOI: 10.1186/s12885-017-3244-2.

#### Вклад авторов

И.В. Ботезату, В.Н. Кондратова: разработка дизайна, проведение экспериментов;  
 А.М. Строганова: получение и характеристика клинических образцов;  
 С.Л. Дранко: получение клинических образцов;  
 А.В. Лихтенштейн: разработка концепции исследования, написание статьи.

#### Autors' contributions

I.V. Botezatu, V.N. Kondratova: developing the concept design, conducting experiments;  
 A.M. Stroganova: obtaining and characterization of clinical samples;  
 S.L. Dranko: obtaining clinical samples;  
 A.V. Lichtenstein: developing the concept design, article writing.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

И.В. Ботезату / I.V. Botezatu: <https://orcid.org/0000-0002-0297-4963>  
 В.Н. Кондратова / V.N. Kondratova: <https://orcid.org/0000-0003-0614-8789>  
 А.М. Строганова / A.M. Stroganova: <https://orcid.org/0000-0002-7297-5240>  
 С.Л. Дранко / S.L. Dranko: <https://orcid.org/0000-0003-3315-0817>  
 А.В. Лихтенштейн / A.V. Lichtenstein: <https://orcid.org/0000-0002-0190-5069>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Финансируется в рамках государственной темы.  
**Financing.** It is funded under the state budget theme.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.  
**Compliance with patient rights and principles of bioethics.** All patients gave written informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 22.09.2021. **Принята к публикации:** 19.11.2021.  
**Article submitted:** 22.09.2021. **Accepted for publication:** 19.11.2021.