

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-85-96>

Гипометилирование *LINE-1* и гиперметилирование *HIST1H4F* как онкомаркеры в жидкостной биопсии колоректального рака

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

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анатолий Владимирович Лихтенштейн alicht@mail.ru

Введение. Локальное гиперметилирование промоторов уникальных генов и глобальное гипометилирование генома – хорошо известные проявления ассоциированного с канцерогенезом aberrantного метилирования. Мы исследовали этот феномен в качестве возможного диагностического маркера для жидкостной биопсии колоректального рака, используя оригинальный метод количественного анализа плавления гибридов ДНК-зонд (quantitative DNA melting analysis with hybridization probes, qDMA-HP).

Цель исследования – количественная оценка метилирования гена *HIST1H4F* и транспозона *LINE-1* в циркулирующей ДНК плазмы крови больных колоректальным раком.

Материалы и методы. Проанализированы обработанные бисульфитом образцы ДНК, выделенные из плазмы крови здоровых доноров и онкологических больных. Метилирование *HIST1H4F* оценивали с помощью асимметричной полимеразной цепной реакции с гибридизуемым зондом и плавлением гибридов ампликон/зонд после завершения амплификации. Для тестирования многократно повторяющихся и характеризующихся выраженным полиморфизмом последовательностей *LINE-1* использовали асимметричную полимеразную цепную реакцию с гибридизуемым зондом и интеркалирующим красителем SYBR Green, после чего плавили гибриды и анализировали многокомпонентные профили плавления.

Результаты. Показана высокая диагностическая эффективность панели маркеров *LINE-1* и *HIST1H4F* в жидкостной биопсии колоректального рака: площадь под ROC-кривой 0,92; чувствительность 100 %; специфичность 84 %. Перекрестная валидизация подтверждает этот результат. Гиперметилирование *HIST1H4F* и гипометилирование *LINE-1* статистически значимо коррелируют (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,4$; $p = 0,01$).

Заключение. Метод qDMA-HP можно использовать для количественной оценки aberrantного метилирования клинически значимых генов.

Ключевые слова: опухолевый маркер, жидкостная биопсия, колоректальный рак, *HIST1H4F*, *LINE-1*, анализ плавления ДНК

Для цитирования: Кондратова В.Н., Ботезату И.В., Строганова А.М. и др. Гипометилирование *LINE-1* и гиперметилирование *HIST1H4F* как онкомаркеры в жидкостной биопсии колоректального рака. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):85–96.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-85-96>

LINE-1 hypomethylation and *HIST1H4F* hypermethylation as oncomarkers in liquid biopsy of colorectal cancer

V.N. Kondratova, I.V. Botezatu, 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 115522, Russia

Contacts: Anatoly Vladimirovitch Lichtenstein alicht@mail.ru

Introduction. Local hypermethylation of gene promoters and global genome hypomethylation are well-known manifestations of aberrant methylation associated with carcinogenesis. We investigated this phenomenon as a possible diagnostic marker for liquid biopsy of colorectal cancer using the original quantitative DNA melting analysis with hybridization probes (qDMA-HP) method.

Aim. To quantify the methylation of *HIST1H4F* promoter and *LINE-1* transposon in circulating blood plasma DNA of colorectal cancer patients.

Materials and methods. Bisulfite-treated DNA samples isolated from blood plasma of healthy donors and cancer patients were analyzed. *HIST1H4F* methylation was assessed by asymmetric polymerase chain reaction with hybridized probe and post-amplification melting of probe/amplicon hybrids. To test for repetitive and highly polymorphic *LINE-1* sequences, asymmetric polymerase chain reaction with hybridized probe and SYBR Green intercalating dye was used, followed by melting of hybrids and analysis of multicomponent melt curves.

Results. High diagnostic efficiency of *LINE-1* and *HIST1H4F* methylation markers in liquid biopsy of colorectal cancer was demonstrated with the area under the ROC curve = 0.92, sensitivity – 100 %, specificity – 84 %. Cross validation supports this result. Hypermethylation of *HIST1H4F* and hypomethylation of *LINE-1* are statistically significantly correlated (Spearman correlation coefficient $r = 0.4$; $p = 0.01$).

Conclusion. The qDMA-HP is suitable for quantitative assessment of aberrant methylation of various clinically significant genes.

Keywords: tumor marker, liquid biopsy, colorectal cancer, *HIST1H4F*, *LINE-1*, DNA melting analysis

For citation: Kondratova V.N., Botezatu I.V., Stroganova A.M. et al. *LINE-1* hypomethylation and *HIST1H4F* hypermethylation as oncomarkers in liquid biopsy of colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2024;11(2):85–96. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-85-96>

ВВЕДЕНИЕ

Аберрантное метилирование ДНК — один из эпигенетических механизмов канцерогенеза — включает 2 разнонаправленных процесса: локальное (опухолевоспецифическое и тканеспецифическое [1, 2]) гиперметилирование CpG-островков в промоторах уникальных генов и глобальное гипометилирование генома [3–8]. Оба процесса имеют важные функциональные последствия: локальное гиперметилирование промотора подавляет активность прилежащего гена, тогда как глобальное гипометилирование генома активирует последовательности, до недавнего времени относимые к так называемой мусорной ДНК (junk DNA) [9], но играющие большую роль в биологической эволюции [10]: многократные повторы, транспозоны, некодирующие последовательности. В итоге аберрантное метилирование ДНК приводит к дестабилизации генома и нарушениям внутриклеточных сигнальных путей [6, 11–13].

Знания, полученные при исследовании феномена аберрантного метилирования ДНК, транслируются в клиническую медицину и способствуют появлению новых методов диагностики. В частности, растет число эпигенетических онкомаркеров, одни из которых (гиперметилированные CpG-островки) специфически ассоциированы с определенными видами рака [14–17], тогда как другие (гипометилированные многократные повторы *Alu*, *LINE-1*) присущи многим из них [6, 11, 18–21]. Сканирование аберрантно метилированных последовательностей ДНК широко применяется в жидкостной биопсии рака (имеется в виду анализ ДНК плазмы крови) для выявления остаточной болезни, прогноза онкологического заболевания, эволюции опухолевых клонов и мониторинга эффективности терапии [22–27].

В лабораторной практике обычно применяют метод метил-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ) с приме-

нением обработанной бисульфитом ДНК [28–34]. Однако этот метод имеет существенные недостатки: он не учитывает вариабельности паттернов метилирования ДНК и поэтому может количественно преуменьшать данный феномен [35, 36], кроме того, он предполагает проведение трудоемкой процедуры нормализации данных с использованием генов-калибраторов [37, 38].

Разработанный нами метод количественного анализа метилирования ДНК, включающий асимметричную ПЦР с метил-независимыми праймерами, гибридуемые зонды (известные как зонды TaqMan) и постамплификационное плавление гибридов зонд/ампликон [39, 40], лишен указанных недостатков. В рекомендациях Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE) зонды TaqMan именуются гидролизуемыми [41], но в предлагаемом методе они выполняют функцию гибридуемых зондов и обозначаются поэтому соответственно. Ранее мы применяли мультиплексный метод qDMA-HP для анализа аберрантного метилирования двух генов (*SEPT9* и *HIST1H4F*) в жидкостной биопсии колоректального рака. Продемонстрирована высокая диагностическая эффективность предложенного подхода [42, 43].

Цель исследования — оценить на той же когорте больных и тем же методом диагностический потенциал панели, состоящей из принципиально разных маркеров: промотора гена *HIST1H4F*, одного из генов гистонового кластера, универсально гиперметилированного в опухолях разного происхождения [44], и многократно повторяющегося транспозона *LINE-1*, отражающего глобальное гипометилирование генома [6, 11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические образцы. В ретроспективное исследование включены 38 больных колоректальным раком (16 мужчин и 22 женщины), получавших лечение

в клинике Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина, и 18 доноров (10 мужчин и 8 женщин) без выявленной онкологической патологии. Медиана возраста пациентов составила 58 (31–84) лет.

Клиническая характеристика больных колоректальным раком представлена в табл. 1.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с колоректальным раком, вошедших в исследование

Table 1. Clinical characteristics of patients with colorectal cancer included in the study

Показатель Parameter	Число пациентов, n Number of patients, n
Стадия по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM): Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) stage:	
TisN0M0	1
T3N0M0	4
T3N1M1	3
T3N2M0	5
T3N2M1	2
T3NxM0	3
T3NxM1	5
T4N0M1	1
T4N1M0	3
T4N1M1	2
T4N2M0	2
T4N2M1	4
T4NxM1	1
TxNxM1	2
Локализация: Location:	
слепая кишка caecum	1
ободочная кишка colon	23
прямая кишка rectum	14

Для получения плазмы из образцов крови (2–4 мл) использовали метод двойного центрифугирования при комнатной температуре (по 10 мин при 1000g и 16000g); аликвоты плазмы хранили при –60 °C до использования. Ранее на этой когорте больных проведен анализ метилирования коррелирующих маркеров *SEPT9* и *HIST1H4F* [43]. Полученные результаты стимулировали дополнительное, представленное в настоящей работе, исследование контрастирующих маркеров *HIST1H4F* и *LINE-1*.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из плазмы крови методом фенол-хлороформной депротеинизации [39] и подвергали бисульфитной конверсии, как описано ранее [42]. Для серийных разведений использовали коммерческий набор метилированной и неметилированной ДНК (EpiTect PCR Human control DNA set, Qiagen, Германия).

Асимметричная полимеразная цепная реакция с гибридизуемым зондом и плавление ДНК. Последовательность CpG-островка гена *HIST1H4F* (GenBank Accession number NC_000006) амплифицировали посредством асимметричной ПЦР с гибридизуемым зондом (последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 2). Зонд HIST1-ROX (24 основания) взаимодействовал с тремя CpG-динуклеотидами (chr6:26240752–26240763, human hg19). Асимметричную ПЦР проводили в 96-луночных планшетах на приборах CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) и QuantStudio 5 (Applied Biosystems, Life Technologies, США). Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 50 mM Трис-НCl; pH 8,8; 50 mM KCl; 4 mM MgCl₂; 0,25 mM каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (дНТФ); 0,2 мкМ зонда HIST1-ROX; 0,04 мкМ праймера HIST1-sense; 0,4 мкМ праймера HIST1-antisense; 2,5 ед. Hot-rescue Taq-полимеразы («Синтол», Россия); 3 мкл раствора ДНК. Условия ПЦР: начальная денатурация – 5 мин при 95 °C; 55 циклов по 13 с при 95 °C, 40 с при 58 °C, 30 с при 72 °C (с регистрацией флуоресценции). Плавление гибридов зонд/ампликон: денатурация – 1 мин при 95 °C, ренатурация – 2 мин при 52 °C, плавление – от 35 до 75 °C (инкремент 0,4 °C, выдержка 6 с, скорость нагревания 3,3 °C/c).

Ампликон *LINE-1* (GenBank Accession number X52235) амплифицировали с помощью асимметричной ПЦР с зондом LINE-1-ROX (27 оснований; табл. 2), взаимодействующим с тремя CpG-динуклеотидами. Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 50 mM Трис-НCl; pH 8,8; 50 mM KCl; 4 mM MgCl₂; 0,25 mM каждого дНТФ; 0,1 мкМ зонда LINE-1-ROX; SYBR Green I (1:20000); 0,04 мкМ праймера LINE-1-sense; 0,8 мкМ праймера LINE-1-antisense; 1 ед. Hot-rescue Taq-полимеразы («Синтол», Россия); 3 мкл раствора ДНК. Условия ПЦР: начальная денатурация – 10 мин при 95 °C; 40 циклов по 20 с при 95 °C, 20 с при 54 °C, 20 с при 72 °C (с регистрацией флуоресценции). Плавление дуплексов зонд/ампликон: денатурация – 1 мин при 95 °C, ренатурация – 2 мин при 40 °C, плавление – от до 95 °C (инкремент 0,3 °C, выдержка 20 с).

Для построения графиков и количественных расчетов отрицательные первые производные кривых плавления (–d(RFU)/dt) экспортировали в Excel. Для аппроксимации экспериментальной кривой гауссовыми пиками и определения их площадей использовали программу PeakFit (v.4.12.00; SeaSolve Software Inc., США), как описано ранее [39, 40].

Статистический анализ. Анализ проводили с помощью GraphPad Prism 9.3.0 (GraphPad Software, США), онлайн-серверов CombiROC [45] и Cutoff Finder [46]. Для сравнения уровня метилирования *HIST1H4F* и *LINE-1* в ДНК плазмы крови здоровых доноров и больных колоректальным раком применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для оценки корреляции между феноменами гиперметилирования *HIST1H4F* и гипометилирования *LINE-1* определяли

коэффициент Спирмена. Все статистические тесты двусторонние; различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 2. Последовательности праймеров и зондов

Table 2. Sequences of primers and probes

Праймер/зонд Primer/probe	Последовательность Sequence
Ампликон <i>HIST1H4F</i> (105 bp) <i>Amplicon HIST1H4F (105 bp)</i>	
Праймер <i>HIST1</i> -sense Primer <i>HIST1</i> -sense	5'-AAAGTGTGAGTG ATAATATATAGGG
Праймер <i>HIST1</i> -antisense Primer <i>HIST1</i> -antisense	5'-AATCTCCTCATAA ATAAAACCC
Зонд <i>HIST1</i> -ROX ^a (sense) Probe <i>HIST1</i> -ROX ^a (sense)	5'-ROX- AAGTTTGTATTGTTGTT TGGTT-BHQ2
Ампликон <i>LINE-1</i> (100 bp) <i>Amplicon LINE-1 (100 bp)</i>	
Праймер <i>LINE-1</i> -sense Primer <i>LINE-1</i> -sense	5'-TGTTAGATAGTGGG CGTAGGTT
Праймер <i>LINE-1</i> -antisense Primer <i>LINE-1</i> -antisense	5'-ACTCCCTAACCCCTTAC
Зонд <i>LINE-1</i> -ROX ^b (sense) Probe <i>LINE-1</i> -ROX ^b (sense)	5'-ROX- CGAGTCGAAGTAGGCG GAGGTATTGTT-BHQ2

^aПоследовательность зонда комплементарна конвертированной (обработанной бисульфитом) неметилированной ДНК.

^bПоследовательность зонда комплементарна конвертированной метилированной ДНК.

^aThe probe sequence is complementary to the converted (bisulfite-treated) unmethylated DNA.

^bThe sequence of the probe is complementary to the converted methylated DNA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метод количественного анализа плавления гибридов ДНК-зонд [39, 40, 47] основан на том же принципе, что и широко известный метод анализа кривых плавления высокого разрешения (high resolution melting analysis, HRMA) [48–51], а именно на анализе тепловой денатурации двунитевой ДНК как способе выявления дефектов вторичной структуры. Достоинство обоих методов заключается в том, что они реализуются в закрытом формате (т. е. без дополнительных процедур). Это сокращает затраты времени и труда и минимизирует риск взаимного загрязнения клинических образцов. Однако методы HRMA и qDMA-HP различаются. В первом случае для мониторинга плавления ДНК используются интеркалирующие красители (SYBR Green, EvaGreen и др.), а во втором — гибризируемые зонды (олигонуклеотиды с флуорофором и гасителем на концах). Это различие определяет

ключевые особенности данных методов, их достоинства и недостатки. Так, в HRMA флуоресцирующий краситель интеркалирует между основаниями двунитевого ампликона, что многократно усиливает его свечение (при плавлении дуплекса флуоресценция возвращается к исходному уровню). Таким образом, большой ампликон, иногда содержащий десятки CpG-динуклеотидов, тестируется целиком, но с относительно невысоким разрешением из-за присутствия неспецифических продуктов амплификации, побочного формирования множества гетеродуплексов, а также слабой выраженности температурных сдвигов, индуцированных в длинных дуплексах одиночными неспаренными основаниями. В свою очередь, qDMA-HP способен зондировать лишь короткие последовательности (20–30 пар оснований), но с высоким разрешением, обусловленным сильным эффектом неспаренных оснований в коротких дуплексах. Этот подход предполагает асимметричный вариант ПЦР для формирования избытка одной из двух нитей ампликона как мишени гибридизационного зондирования. Целью включения в реакционную среду ПЦР наряду с флуоресцентным зондом интеркалирующего красителя SYBR Green был мониторинг амплификации в реальном времени. В предыдущей работе установлено, что даже очень короткий участок aberrантного метилирования (1–4 CpG-динуклеотида) может быть эффективным диагностическим маркером [42, 43]. В данной работе этот подход применен к существенно различающимся объектам: гиперметилированному уникальному гену *HIST1H4F* [44] и гипометилированному многократно повторяющемуся транспозону *LINE-1* [6, 12, 13, 18].

Анализ метилирования *HIST1H4F*. Различия в степени метилирования промотора *HIST1H4F* в циркулирующих ДНК (цДНК) здоровых доноров и больных колоректальным раком (3 образца из каждой группы) представлены на рис. 1. Пики метилированной (ДНК-М+) и неметилированной (ДНК-М–) ДНК характеризуются существенным различием температур плавления (из-за присутствия в ДНК-М+ неспаренных оснований) и хорошо разделены на температурной шкале. Серийные разведения ДНК-М+ в ДНК-М– демонстрируют линейную зависимость измеренной по площади соответствующего пика концентрации метилированного *HIST1H4F* от фактически присутствующей в исследуемом образце (полученное соотношение использовано для коррекции экспериментальных данных) (см. рис. 2). Предел количественного измерения (limit of quantitation), т. е. минимальная концентрация, при которой анализируемое вещество может быть не только обнаружено, но и надежно измерено, составил 12 % метилированного *HIST1H4F* (это наименьшая концентрация, определяемая при коэффициенте вариации (coefficient of variance) менее 20 % [52]).

Метилированный *HIST1H4F* в качестве онкомаркера при колоректальном раке оценивали с помощью

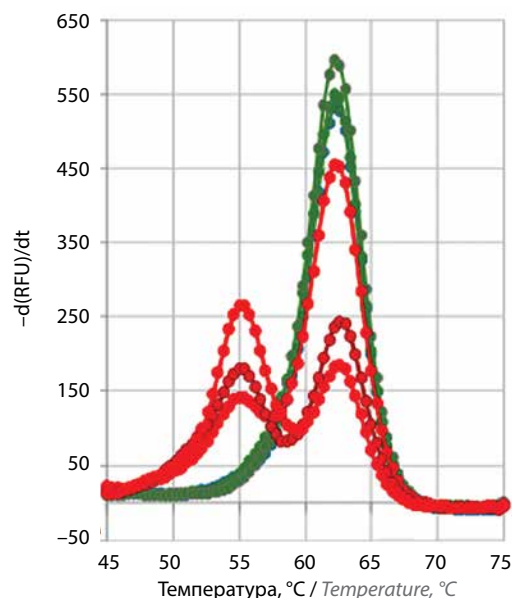


Рис. 1. Пики плавления маркера *HIST1H4F* в обработанной бисульфитом ДНК плазмы крови здоровых доноров (3 образца; отмечены зеленым цветом) и больных колоректальным раком (3 образца; отмечены красным цветом). $-d(RFU)/dt$ — отрицательные первые производные кривых плавления

Fig. 1. Melt peaks of the *HIST1H4F* marker in bisulfite-treated DNA from blood plasma of healthy donors (3 samples in green) and colorectal cancer patients (3 samples in red). $-d(RFU)/dt$ — negative first derivatives of melting curves

предлагаемого нами метода. Различия в уровне метилирования *HIST1H4F* в ДНК плазмы крови здоровых доноров (среднее значение — 8,5 %; стандартное отклонение (standard deviation, SD) — 1,7 %) и онкологических больных (среднее значение — 26,8 %, SD — 20,2 %) статистически значимы ($p = 0,0002$) (рис. 3, а). Результаты ROC-анализа свидетельствуют о диагностической эффективности данного теста: площадь под ROC-кривой (area under ROC curve, AUC) оказалась равна 0,8; диагностические чувствительность и специфичность при избранном пороге метилирования составили соответственно 63 и 100 % (рис. 3, б). Каскадная диаграмма визуализирует правильную и неправильную классификации здоровых доноров и больных колоректальным раком в исследованной когорте (рис. 3, в).

Анализ метилирования *LINE-1* методом qDMA-НР.

Данный анализ сильно осложнен наличием множества повторяющихся последовательностей, составляющих примерно 20 % генома человека [50], и неизбежным присутствием в них полиморфизмов [18]. Последние проявляются неспаренными основаниями в дуплексах зонд/ампликон и формируют при плавлении гетерогенный профиль (рис. 4), скрывающий до некоторой степени искомый эффект метилирования (см. рис. 1). Кроме того, согласно данным литературы, величина ассоциированного с канцерогенезом эффекта

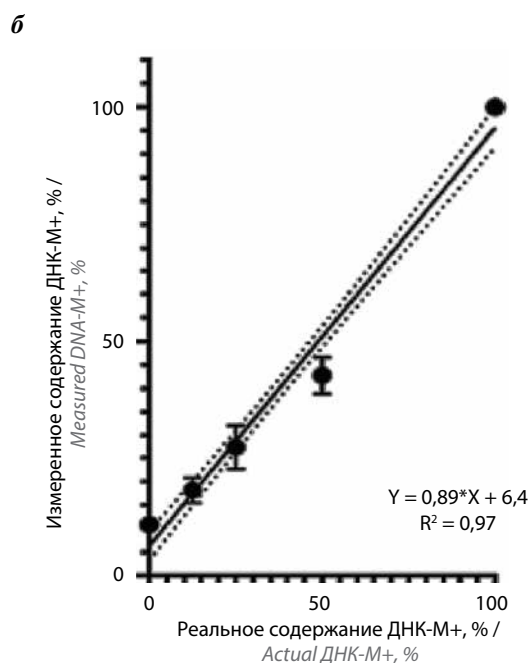
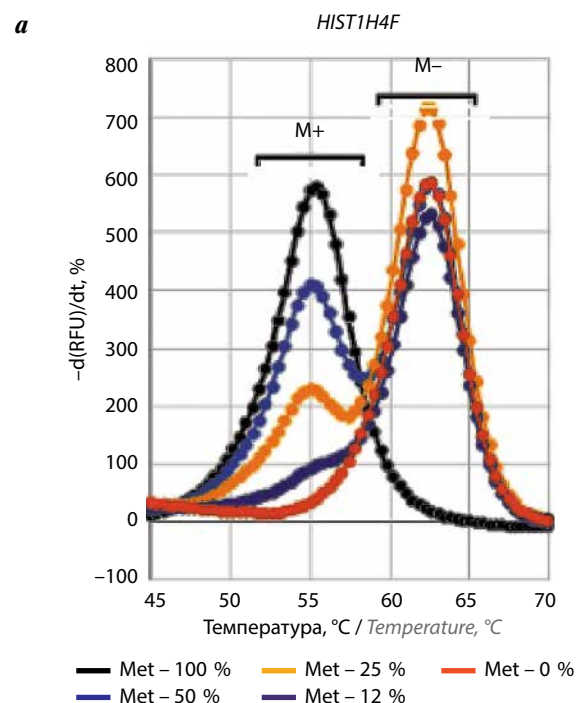


Рис. 2. Серийные разведения ДНК-M+ (конечные концентрации 100; 50; 25; 12,5; 0 %) в ДНК-M-: а — пики плавления ДНК-M+ и ДНК-M-. Графики плавления, отражающие разные концентрации метилированной ДНК (Met %), обозначены линиями разного цвета; б — линейная регрессия фактической и измеренной концентраций ДНК-M+. Планки погрешностей — средние значения с 95 % доверительными интервалами

Fig. 2. Serial dilutions of DNA-M+ (final concentrations 100; 50; 25; 12.5; 0 %) in DNA-M-: а — melt peaks of DNA-M+ and DNA-M-. Melt curves showing different concentrations of methylated DNA (Met %) are indicated by lines of different colors; б — linear regression of actual and measured DNA-M+ concentrations. Error bars are means with 95 % confidence intervals

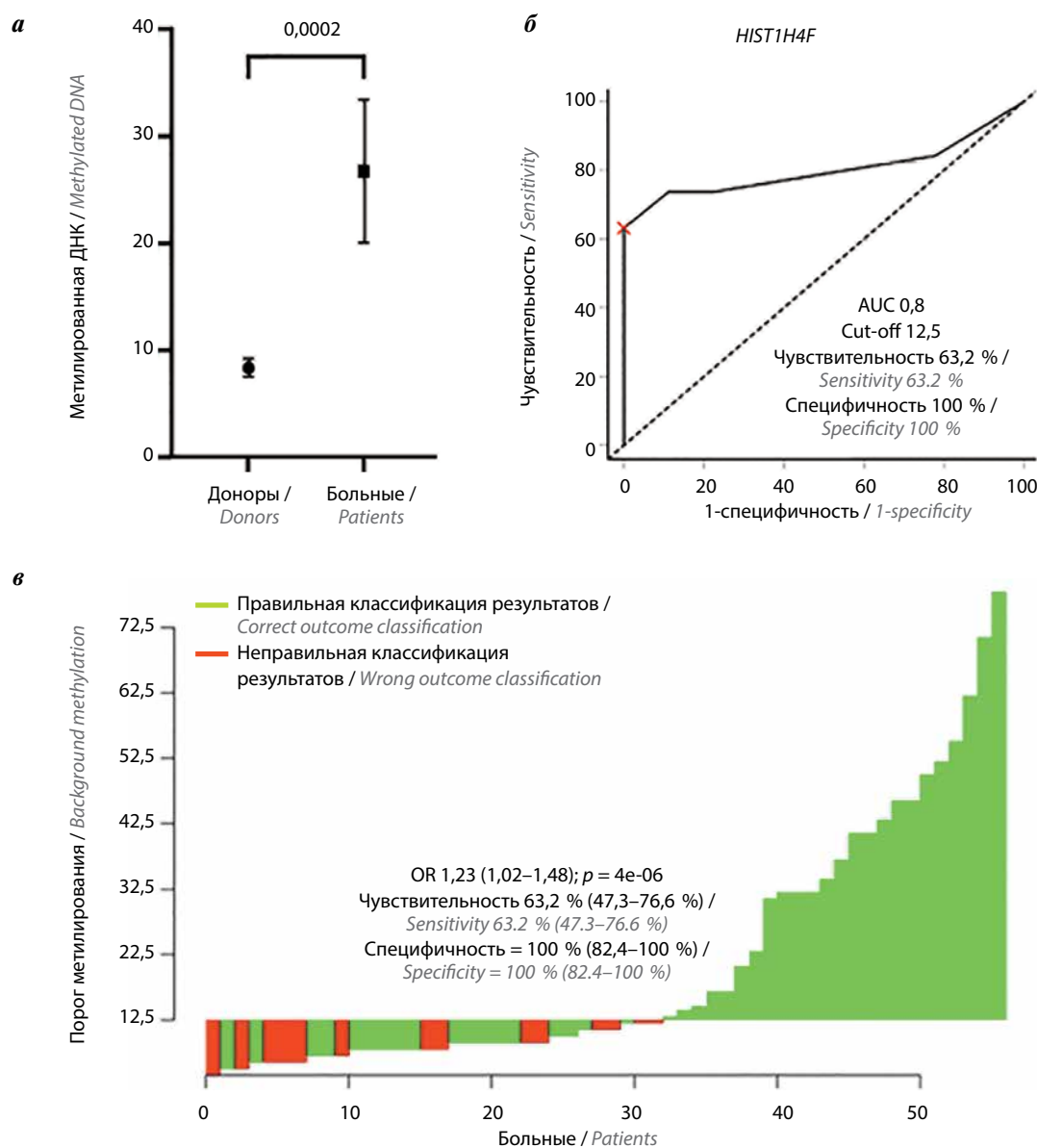


Рис. 3. Диагностическая эффективность HIST1H4F в жидкостной биопсии колоректального рака: а – сравнение уровней метилирования HIST1H4F в циркулирующих ДНК здоровых доноров и пациентов с колоректальным раком (непараметрический U-критерий Манна–Уитни, планки погрешностей – средние значения с 95 % доверительным интервалом); б – результаты ROC-анализа; в – каскадная диаграмма, иллюстрирующая правильную и неправильную классификации здоровых доноров и пациентов с колоректальным раком в исследованной когорте. AUC – площадь под ROC-кривой; cut-off – порог метилирования; OR – отношение шансов

Fig. 3. Diagnostic performance of HIST1H4F in liquid biopsy of colorectal cancer: а – comparison of HIST1H4F methylation levels in circulating DNA of healthy donors and colorectal cancer patients (nonparametric Mann–Whitney U test; error bars are mean with 95 % confidence interval); б – ROC analysis results; в – waterfall chart illustrating correct and incorrect outcome classification of healthy donors and colorectal cancer patients in the studied cohort. AUC – area under ROC curve; cut-off – background methylation; OR – odds ratio

деметилования генома относительно невелика: примерно 6 % при суммарном сравнении нормальных и опухолевых тканей [11] и примерно 20 % в случае колоректального рака (от 76 % метилирования в нормальной слизистой до 56 % – в опухолевой) [53]. Тем не менее предварительное сопоставление кривых плавления *LINE-1* в плазме крови здоровых доноров и онкологических больных (3 образца из каждой группы) показало увеличение фракции неметилированной ДНК у пациентов с колоректальным раком (рис. 5) и стимулировало дальнейшее сравнительное исследование.

Применение qDMA-НР для оценки серийных разведений ДНК-М+ в ДНК-М– демонстрирует линейную зависимость измеренной концентрации ДНК-М– от концентрации, фактически присутствующей в исследуемом образце (рис. 6). Степень деметилования *LINE-1* в цДНК больных колоректальным раком оценивали с помощью определения процентного содержания фракции ДНК-М– в температурном интервале 46–58 °C. Обнаружено, что уровень неметилированных последовательностей *LINE-1* в цДНК статистически значимо ($p < 0,0001$) выше у онкологических больных (среднее

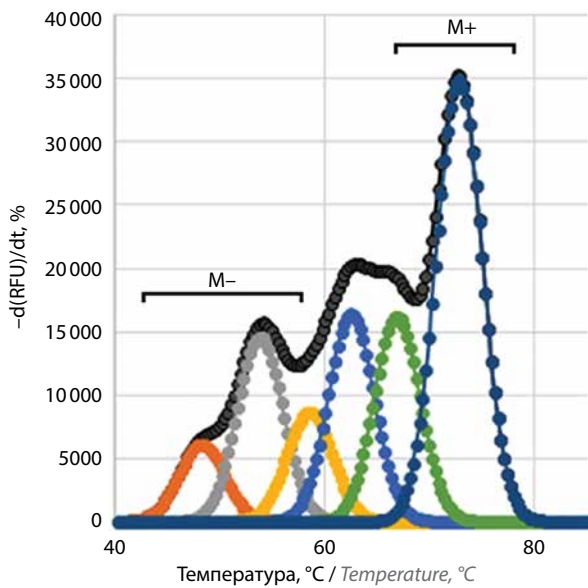


Рис. 4. Пики плавления маркера LINE-1 в обработанной бисульфитом ДНК плазмы крови здорового донора. Экспериментальная кривая аппроксимирована 6 гауссовыми пиками. Позиции метилированных (M+) и неметилированных (M-) LINE-1 обозначены на рисунке скобками. Промежуточные пики предположительно обусловлены однонуклеотидными полиморфизмами в многократно повторяющихся последовательностях

Fig. 4. Melt peaks of the LINE-1 marker in bisulfite-treated blood plasma DNA from a healthy donor. The experimental curve is approximated by 6 Gaussian peaks. The positions of methylated (M+) and unmethylated (M-) LINE-1 are indicated in the figure by brackets. The intermediate peaks are presumably due to single-nucleotide polymorphisms in the repetitive sequences

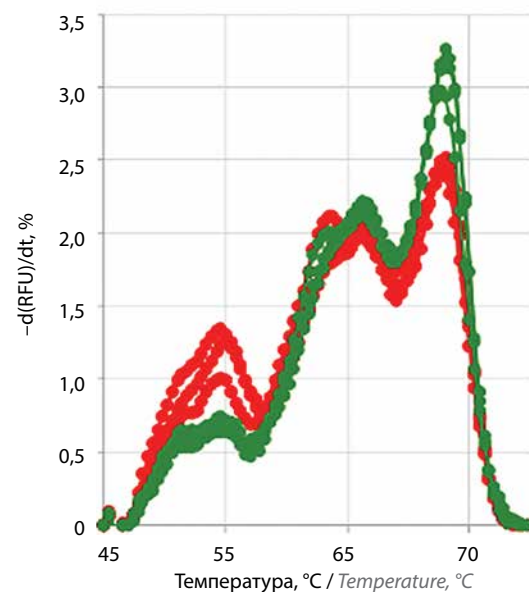


Рис. 5. Пики плавления маркера LINE-1 в обработанной бисульфитом ДНК плазмы крови здоровых доноров (3 образца; помечены зеленым цветом) и больных колоректальным раком (3 образца; помечены красным цветом)

Fig. 5. Melt peaks of the LINE-1 marker in bisulfite-treated DNA from blood plasma of healthy donors (3 samples in green) and colorectal cancer patients (3 samples in red)

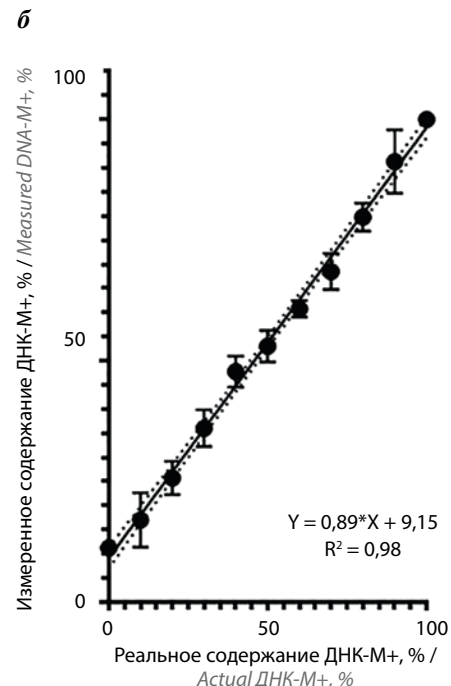
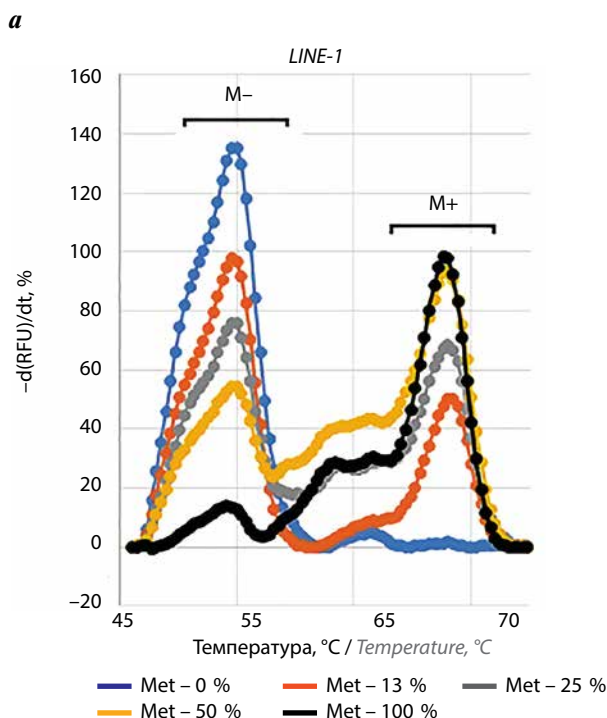


Рис. 6. Серийные разведения ДНК-M+ (конечные концентрации 100; 50; 25; 12,5; 0 %) в ДНК-M-: а – пики плавления ДНК-M+ и ДНК-M-. Графики плавления, отражающие разные концентрации метилированной ДНК (Met %), обозначены линиями разного цвета; б – линейная регрессия фактической и измеренной концентраций ДНК-M+. Планки погрешностей – средние значения с 95 % доверительными интервалами

Fig. 6. Serial dilutions of DNA-M+ (final concentrations 100; 50; 25; 12.5; 0 %) in DNA-M-: а – melt peaks of DNA-M+ and DNA-M-; melt curves showing different concentrations of methylated DNA (Met %) are indicated by lines of different colors; б – linear regression of actual and measured DNA-M+ concentrations. Error bars are means with 95 % confidence intervals

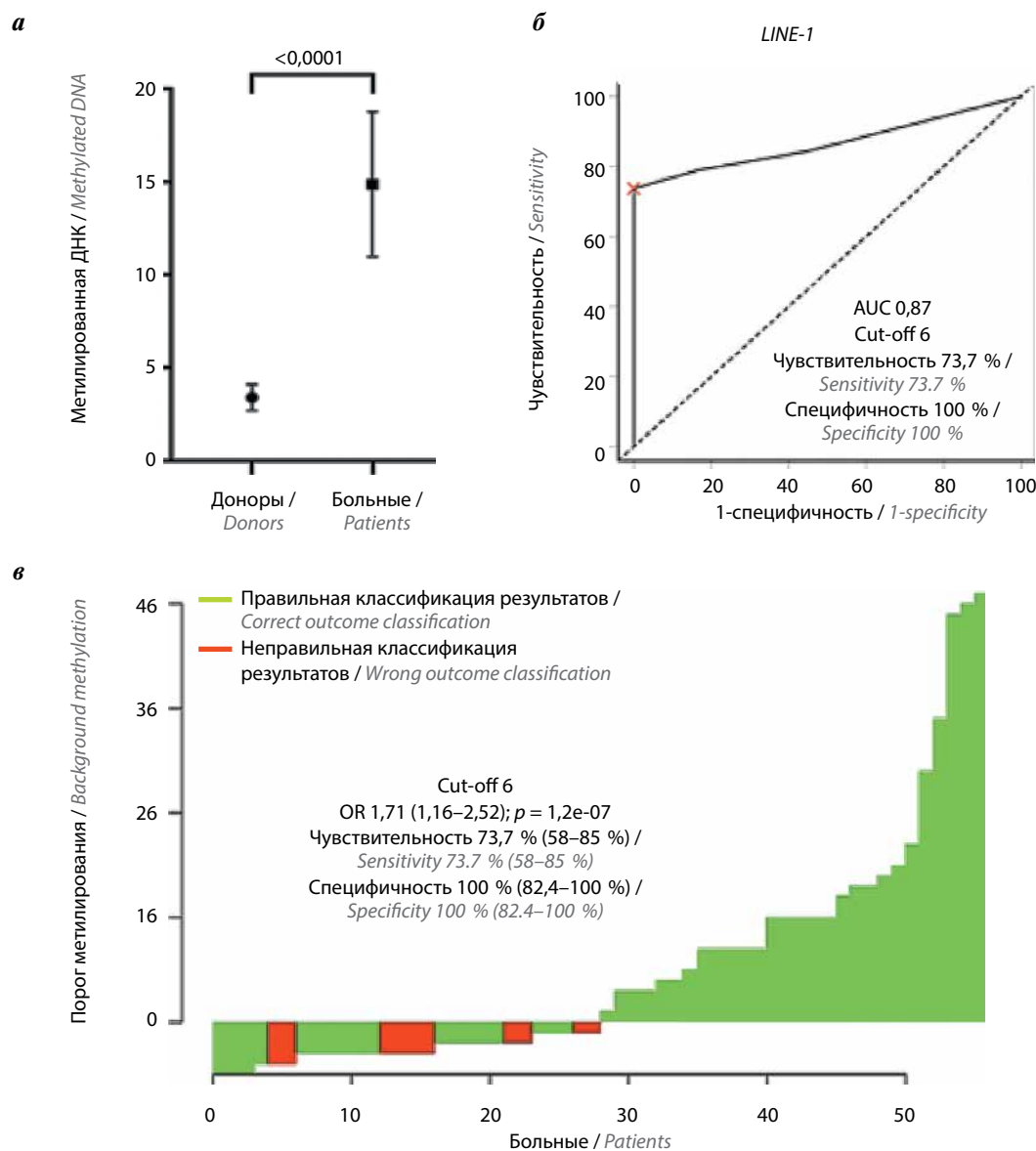


Рис. 7. Диагностическая эффективность *LINE-1* в жидкостной биопсии колоректального рака: *а* – сравнение уровней метилирования *LINE-1* в циркулирующих ДНК здоровых доноров и пациентов с колоректальным раком (непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни, планки погрешностей – средние значения с 95 % доверительным интервалом); *б* – ROC-анализ (площадь под ROC-кривой (*AUC*) 0,87; чувствительность 74 %; специфичность 100 %); *в* – каскадная диаграмма, иллюстрирующая правильную и неправильную классификации здоровых доноров и больных в исследованной когорте. Cut-off – порог метилирования; OR – отношение шансов

Fig. 7. Diagnostic performance of *LINE-1* in liquid biopsy of colorectal cancer: *a* – comparison of *LINE-1* methylation levels in circulating DNA of healthy donors and colorectal cancer patients (nonparametric Mann–Whitney *U* test; error bars are mean with 95 % confidence interval); *b* – ROC analysis (area under ROC curve (*AUC*) 0.87; sensitivity 74 %; specificity 100 %); *v* – waterfall chart illustrating correct and incorrect outcome classification of healthy donors and patients in the studied cohort. Cut-off – background methylation; OR – odds ratio

значение – 14,9 %, SD – 11,9 %), чем у здоровых доноров (среднее значение – 3,4 %, SD – 1,5 %) (рис. 7, *а*). Результаты ROC-анализа (*AUC* = 0,87; чувствительность – 74 %; специфичность – 100 %) (рис. 7, *б*, *в*), согласуются с предположением о диагностической значимости феномена деметилирования *LINE-1* у больных колоректальным раком [12, 21, 54–56].

Оценка панели маркеров *HIST1H4F* и *LINE-1*. Между феноменами гиперметилирования *HIST1H4F* и гипометилирования *LINE-1* в ДНК колоректального рака обнаружена статистически значимая корреляция (коэф-

фициент Спирмена $r = 0,4$; $p = 0,01$) (рис. 8), что соответствует данным литературы [23, 57–60].

Исходя из того, что панель нескольких маркеров эффективнее одиночных [26], полученные данные подвергли CombiROC-анализу, позволяющему оценить оптимальную комбинацию [45]. На рис. 9 и в табл. 3 представлены результаты, свидетельствующие о высокой диагностической эффективности исследуемой панели как изначально, так и после 10-кратной перекрестной валидации (*AUC* > 0,9; чувствительность 100 %; специфичность 84 %).

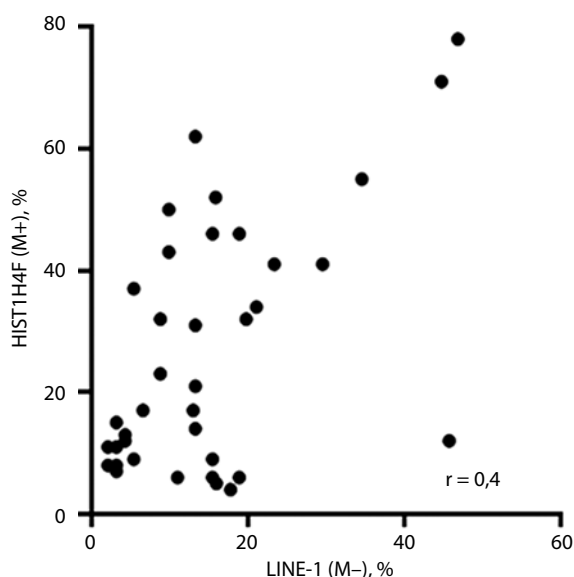


Рис. 8. Корреляция между гиперметилированием *HIST1H4F* (M+) и гипометилированием *LINE-1* (M-) в циркулирующей ДНК плазмы крови больных колоректальным раком (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,4$)

Fig. 8. Correlation between hypermethylation of *HIST1H4F* (M+) and hypomethylation of *LINE-1* (M-) in circulating DNA of colorectal cancer patients (Spearman rank correlation coefficient $r = 0.4$)

Таблица 3. CombiROC-анализ диагностической эффективности панели *HIST1H4F* и *LINE-1* в жидкостной биопсии колоректального рака

Table 3. Combi ROC-analysis of the diagnostic effectiveness of *HIST1H4F* and *LINE-1* panels in liquid biopsy of colorectal cancer

Показатель Parameter	Вся когорта Whole cohort	Десятикратная перекрестная валидизация 10-fold cross-validation
Площадь под ROC-кривой Area under ROC curve	0,921	0,904
Чувствительность, % Sensitivity, %	100	100
Специфичность, % Specificity, %	84,2	84,2

ОБСУЖДЕНИЕ

Многократно повторяющиеся диспергированные короткие элементы *Alu* (размер 282 п. о.) и длинные элементы *LINE-1* (размер до 6000 п. о.) составляют значительную часть гаплоидного генома человека (~1 млн копий, ~10 % генома и ~0,5 млн копий, ~20 % генома соответственно) [18] и содержат CpG-динуклеотиды, которые в нормальных соматических клетках метилированы на 80–90 % [61]. В опухолевых тканях повторы *LINE-1* часто деметилированы (в среднем на ~6,5 %, хотя этот показатель варьирует в зависимости от типа опухоли) [62]. Метилирование *Alu* и *LINE-1* коррелирует

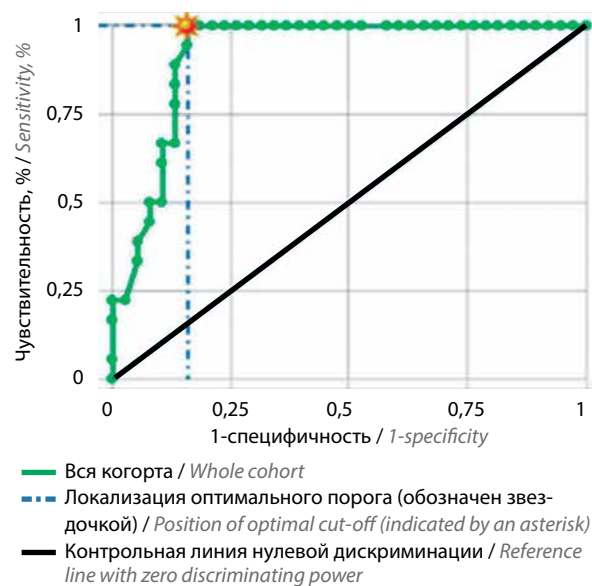


Рис. 9. Диагностическая эффективность метода количественного анализа плавления гибридов ДНК-зонд с использованием панели *HIST1H4F* и *LINE-1*. Результаты CombiROC-анализа

Fig. 9. Diagnostic performance of quantitative DNA melting analysis with hybridization probes using *HIST1H4F* and *LINE-1* panel. The results of CombiROC analysis

с глобальным метилированием генома и может служить суррогатным маркером этого феномена [6, 18, 62].

Исследование многократных повторов методом qDMA-НР осложнено присутствием в них полиморфизмов, имитирующих феномен метилирования CpG-динуклеотидов. По этой причине наша попытка использовать в качестве суррогатного маркера геномного гипометилирования повторы *Alu* оказалась безуспешной (здесь не представлено). В меньшей степени полиморфизмы препятствовали анализу повторов *LINE-1*. Это позволило обнаружить у больных колоректальным раком статистически значимое увеличение их неметилированной фракции, что согласуется с результатами других исследований [2, 21, 26]. Обнаружена невысокая корреляция гипометилирования *LINE-1* с гиперметилированием *HIST1H4F*. Однако с учетом того, что значительный, если не основной, вклад в цДНК плазмы крови вносят нормальные клетки, истинная корреляция этих феноменов (т. е. в самой опухолевой ткани) может быть значительно выше.

Таким образом, предлагаемый метод сканирования aberrантного метилирования клинически значимых генов может быть использован в практической медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективное применение qDMA-НР в жидкостной биопсии колоректального рака свидетельствует о возможности внедрения этого простого мультиплексного, не требующего нормализации и реализуемого в закрытом формате метода в клиническую практику.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Costello J.F., Fruhwald M.C., Smiraglia D.J. et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000;24(2):132–8. DOI: 10.1038/72785
- Chalitchagorn K., Shuangshoti S., Hourpai N. et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* 2004;23(54):8841–6. DOI: 10.1038/sj.onc.1208137
- Лихтенштейн А.В., Киселева Н.П. Метилирование ДНК и канцерогенез. *Биохимия* 2001;66(3):235–55. DOI: 10.1023/a:1010249510906
Lichtenstein A.V., Kiseljova N.P. DNA methylation and carcinogenesis. *Biokhimiya = Biochemistry* 2001;66(3):235–55. (In Russ.). DOI: 10.1023/a:1010249510906
- Залетаев Д.В., Немцова М.В., Бочков Н.П. Метилирование ДНК как этиологический фактор канцерогенеза. *Вестник Российской академии медицинских наук* 2002;6–11. Zaletaev D.V., Nemtsova M.V., Bochkov N.P. DNA methylation as an etiologic factor in carcinogenesis. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences* 2002;6–11. (In Russ.).
- Robertson K.D. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005;6(8):597–610. DOI: 10.1038/nrg1655
- Ross J.P., Rand K.N., Molloy P.L. Hypomethylation of repeated DNA sequences in cancer. *Epigenomics* 2010;2(2):245–69. DOI: 10.2217/epi.10.2
- Немцова М.В., Михайленко Д.С., Кузнецова Е.Б. и др. Инактивация эпигенетических регуляторов вследствие мутаций в солидных опухолях. *Биохимия* 2020;85(7):735–48. DOI: 10.1134/S0006297920070020
Nemtsova M.V., Mikhaylenko D.S., Kuznetsova E.B. et al. Inactivation of epigenetic regulators due to mutations in solid tumors. *Biochemistry (Mosc)* 2020;85(7):735–48. (In Russ.). DOI: 10.1134/S0006297920070020
- Estecio M.R., Gharibyan V., Shen L. et al. LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability. *PLoS One* 2007;2(5):e399. DOI: 10.1371/journal.pone.0000399
- Ohno S. So much “junk” DNA in our genome. *Brookhaven Symp Biol* 1972;23:366–70.
- Fedoroff N.V. Transposable elements, epigenetics, and genome evolution. *Science* 2012;338(6108):758–67. DOI: 10.1126/science.338.6108.758
- Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Gervas P.A. et al. Aberrant methylation of LINE-1 transposable elements: a search for cancer biomarkers. *Cells* 2020;9(9):2017. DOI: 10.3390/cells9092017
- Cajuso T., Sulo P., Tanskanen T. et al. Retrotransposon insertions can initiate colorectal cancer and are associated with poor survival. *Nat Commun* 2019;10:4022. DOI: 10.1038/s41467-019-11770-0
- Rodriguez-Martin B., Alvarez E.G., Baez-Ortega A. et al. Pan-cancer analysis of whole genomes identifies driver rearrangements promoted by LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* 2020;52(3):306–19. DOI: 10.1038/s41588-019-0562-0
- Bouras E., Karakioulaki M., Bougioukas K.I. et al. Gene promoter methylation and cancer: an umbrella review. *Gene* 2019;710:333–40. DOI: 10.1016/j.gene.2019.06.023
- Markou A., Londra D., Tserpeli V. et al. DNA methylation analysis of tumor suppressor genes in liquid biopsy components of early stage NSCLC: a promising tool for early detection. *Clin Epigenetics* 2022;14(1):61. DOI: 10.1186/s13148-022-01283-x
- Yang J., Wang Q., Zhang Z.Y. et al. DNA methylation-based epigenetic signatures predict somatic genomic alterations in gliomas. *Nat Commun* 2022;13:4410. DOI: 10.1038/s41467-022-31827-x
- Yang X., Wen X., Guo Q. et al. Predicting disease-free survival in colorectal cancer by circulating tumor DNA methylation markers. *Clin Epigenetics* 2022;14:160. DOI: 10.1186/s13148-022-01383-8
- Weisenberger D.J., Campan M., Long T.I. et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res* 2005;33(21):6823–36. DOI: 10.1093/nar/gki987
- Piskareva O., Lackington W., Lemass D. et al. The human L1 element: a potential biomarker in cancer prognosis, current status and future directions. *Curr Mol Med* 2011;11(4):286–303. DOI: 10.2174/156652411795677954
- Kitkumthorn N., Mutirangura A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. *Clin Epigenetics* 2011;2(2):315–30. DOI: 10.1007/s13148-011-0032-8
- Nagai Y., Sunami E., Yamamoto Y. et al. LINE-1 hypomethylation status of circulating cell-free DNA in plasma as a biomarker for colorectal cancer. *Oncotarget* 2017;8(7):11906–16. DOI: 10.18632/oncotarget.14439
- Gainetdinov I.V., Kapitskaya K.Y., Rykova E.Y. et al. Hypomethylation of human-specific family of LINE-1 retrotransposons in circulating DNA of lung cancer patients. *Lung Cancer* 2016;99:127–30. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.07.005
- Liu Z.J., Huang Y., Wei L. et al. Combination of LINE-1 hypomethylation and RASSF1A promoter hypermethylation in serum DNA is a non-invasion prognostic biomarker for early recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Neoplasia* 2017;64(5):795–802. DOI: 10.4149/neo_2017_519
- 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 Discov* 2020;10(11):1635. 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. *Nat Cancer* 2020;1(3):276–90. DOI: 10.1038/s43018-020-0043-5
- Nassar F.J., Msheik Z.S., Nasr R.R. et al. Methylated circulating tumor DNA as a biomarker for colorectal cancer diagnosis, prognosis, and prediction. *Clin Epigenetics* 2021;13(1):111. DOI: 10.1186/s13148-021-01095-5
- Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Azhikina T.L. et al. Long interspersed nuclear element-1 methylation status in the circulating DNA from blood of patients with malignant and chronic inflammatory lung diseases. *Eur J Cancer Prevent* 2021;30(2):127–31. DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000601
- 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
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- 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;9:125. DOI: 10.1186/s13148-017-0425-4
- Dietrich D., Hasinger O., Liebenberg V. et al. DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients. *Diagn Mol Pathol* 2012;21(2):93–104. DOI: 10.1097/PDM.0b013e318240503b
- Dietrich D., Hasinger O., Banez L.L. et al. Development and clinical validation of a real-time PCR assay for PITX2 DNA methylation to predict prostate-specific antigen recurrence

- in prostate cancer patients following radical prostatectomy. *J Mol Diagn* 2013;15(2):270–9. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2012.11.002
33. 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
 34. Grutzmann R., Molnar B., Pilarsky C. et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One* 2008;3(11):e3759. DOI: 10.1371/journal.pone.0003759
 35. 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
 36. 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
 37. Egger G., Wielscher M., Pulverer W. et al. DNA methylation testing and marker validation using PCR: diagnostic applications. *Exp Rev Mol Diagn* 2012;12(1):75–92. DOI: 10.1586/erm.11.90
 38. 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
 39. 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
 40. 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(1):5476. DOI: 10.1038/s41598-020-62173-x
 41. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55(4):611–22. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797
 42. 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
 - 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. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-53-60
 43. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Stroganova A.M. et al. Aberrant methylation scanning by quantitative DNA melting analysis with hybridization probes as exemplified by liquid biopsy of SEPT9 and HIST1H4F in colorectal cancer. *Clinica Chimica Acta* 2023;551:117591. DOI: 10.1016/j.cca.2023.117591
 44. Dong S.H., Li W., Wang L. et al. Histone-related genes are hypermethylated in lung cancer and hypermethylated HIST1H4F could serve as a pan-cancer biomarker. *Cancer Res* 2019;79(24):6101–12. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1019
 45. 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
 46. Budczies J., Klauschen F., Sinn B.V. et al. Cutoff finder: a comprehensive and straightforward web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 2012;7(12):e51862. DOI: 10.1371/journal.pone.0051862
 47. 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
 48. Wittwer C.T. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat* 2009;30(6):857–9. DOI: 10.1002/humu.20951
 49. Erali M., Wittwer C.T. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* 2010;50(4):250–61. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.01.013
 50. Tse M.Y., Ashbury J.E., Zwinger 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 Res Notes* 2011;4:565. DOI: 10.1186/1756-0500-4-565
 51. Stanzer S., Balic M., Strutz J. et al. Rapid and reliable detection of LINE-1 hypomethylation using high-resolution melting analysis. *Clin Biochem* 2010;43(18):1443–8. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.09.013
 52. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 2008;29(Suppl. 1):S49–52.
 53. Antelo M., Balaguer F., Shia J. et al. A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer. *PLoS One* 2012;7(9):e45357. DOI: 10.1371/journal.pone.0045357
 54. Akimoto N., Zhao M., Ugai T. et al. Tumor long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) hypomethylation in relation to age of colorectal cancer diagnosis and prognosis. *Cancers* 2021;13(9):2016. DOI: 10.3390/cancers13092016
 55. Debernardi C., Libera L., Berrino E. et al. Evaluation of global and intragenic hypomethylation in colorectal adenomas improves patient stratification and colorectal cancer risk prediction. *Clin Epigenetics* 2021;13(1):154. DOI: 10.1186/s13148-021-01135-0
 56. Iacopetta B., Grieco F.F., Phillips M.F. et al. Methylation levels of LINE-1 repeats and CpG island loci are inversely related in normal colonic mucosa. *Cancer Sci* 2007;98(9):1454–60. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00548.x
 57. Ren J., Cui J.P., Luo M. et al. The prevalence and persistence of aberrant promoter DNA methylation in benzene-exposed Chinese workers. *PLoS One* 2019;14(8):e0220500. DOI: 10.1371/journal.pone.0220500
 58. Sahnane N., Magnoli F., Bernasconi B. et al. Aberrant DNA methylation profiles of inherited and sporadic colorectal cancer. *Clin Epigenetics* 2015;7:131. DOI: 10.1186/s13148-015-0165-2
 59. Stefanoli M., La R.S., Sahnane N. et al. Prognostic relevance of aberrant DNA methylation in g1 and g2 pancreatic neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 2014;100(1):26–34. DOI: 10.1159/000365449
 60. Ogino S., Kawasaki T., Nosho K. et al. LINE-1 hypomethylation is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2008;122(12):2767–73. DOI: 10.1002/ijc.23470
 61. Yang A.S., Estéio M.R.H., Doshi K. et al. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 2004;32(3):e38–8. DOI: 10.1093/nar/gnh032
 62. Barchitta M., Quattrocchi A., Maugeri A. et al. LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9(10):e109478. DOI: 10.1371/journal.pone.0109478

Вклад авторов

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

Authors' contributions

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

ORCID авторов / ORCID of authors

В.Н. Кондратова / V.N. Kondratova: <https://orcid.org/0000-0003-0614-8789>
И.В. Ботезату / I.V. Botezatu: <https://orcid.org/0000-0002-0297-4963>
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. Исследование финансируется в рамках госбюджетной темы (регистрационный № 122022100090-1).

Funding. The research is funded within the framework of the state budget theme (No. 122022100090-1).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.