https://doi.org/10.34883/PI.2025.13.4.015
УДК 616.24-006.6:615.849]:575.191(476)

Смирнов С.Ю., Медведь А.В., Пашкевич А.М., Карпейчик Ю.С., Пивоварчик С.Н., Вахомчик Т.Г., Короткевич П.Е., Субоч Е.И., Портянко А.С.✉
Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

Индукция выброса циркулирующей опухолевой ДНК в кровоток с помощью локального облучения опухолевого очага у пациентов с немелкоклеточным раком легкого

Конфликт интересов: не заявлен.
Вклад авторов: Смирнов С.Ю. – концепция исследования, анализ полученных данных, редактирование; Медведь А.В., Пашкевич А.М. – анализ полученных данных, интерпретация данных; Карпейчик Ю.С., Пивоварчик С.Н., Вахомчик Т.Г., Короткевич П.Е. – сбор и обработка биоматериала, подготовка текста к печати; Субоч Е.И., Портянко А.С. – обработка, редактирование, подготовка текста к печати.

Подана: 19.09.2025
Принята: 10.11.2025
Контакты: genelab.omr@gmail.com

Резюме

Введение. Жидкостная биопсия – это современный диагностический подход, направленный на идентификацию опухоль-специфичных маркеров в плазме крови. Основной проблемой при работе со свободными циркулирующими нуклеиновыми кислотами является их крайне низкая концентрация в кровотоке. Как правило, циркулирующая опухолевая ДНК (цоДНК) составляет до 2,5% от общей фракции циркулирующей ДНК (несколько копий на 1 мл плазмы).
Актуальным направлением научных исследований в области жидкостной биопсии при злокачественных новообразованиях является поиск и разработка методов и подходов, позволяющих повысить чувствительность технологий детекции онкогенных вариантов в плазме крови. Одним из таких подходов может являться локальное облучение опухолевого очага, приводящее к массовому распаду опухолевых клеток и выбросу цоДНК в кровоток.
Цель. Изучить влияние локального облучения опухолевого очага на концентрацию цоДНК в плазме крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ).
Материалы и методы. Материалом для исследования послужил биологический материал (опухолевая ткань, кровь) 50 пациентов с распространенной или метастатической формой НМРЛ, проходивших лечение на базе РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова с 2022 года по 2025 год. Всем пациентам была проведено облучение опухолевого очага в рамках стандартной радиотерапии (III стадия) или же разово в дозе 4 Гр (IV стадия). Образцы крови были забраны в следующие временные интервалы: до облучения, спустя 6, 12, 24 и 48 часов после первой дозы облучения. Количественный анализ фракции цоДНК с онкогенными вариантами в генах KRAS, EGFR, BRAF и метилированием промотора гена RASSF1 был выполнен методом цифровой капельной ПЦР.

Результаты. В исследование кинетики цоДНК включено 18 пациентов. До облучения цоДНК детектирована в плазме 14 пациентов (73,7%) с последующим ростом концентрации после облучения у 12 человек (85,7%). Статистически значимых различий в концентрациях цоДНК между временными интервалами забора биоматериала не обнаружено. При исследовании цоДНК 3 пациентов с НМРЛ, у которых отмечено прогрессирование заболевания на фоне терапии EGFR-ингибиторами, при отрицательном результате теста на онкогенный вариант EGFR T790M в одном случае зафиксировано наличие данного варианта в цоДНК спустя 48 часов после разового локального облучения опухолевого очага (VAF=0,02%).
Заключение. Индукция выброса цоДНК в кровоток с помощью разового локального облучения опухолевого очага может являться одним из перспективных подходов к повышению диагностической чувствительности жидкостной биопсии. Однако, принимая во внимание значительную гетерогенность концентрации цоДНК в различные временные интервалы после облучения, необходимы дальнейшие исследования факторов, способных влиять на кинетику циркулирующих нуклеиновых кислот.
Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, облучение, циркулирующая опухолевая ДНК, цифровая капельная ПЦР, EGFR T790M

Smirnou S., Miadzvedz A., Pashkevich A., Karpeichyk Y., Pivavarchyk S., Vakhomchyk T., Karatkevich P., Subach H., Portyanko A.✉
N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk, Belarus

Induction of Circulating Tumor DNA Release into the Bloodstream through Local Irradiation of the Tumor Site in Patients with Small Cell Lung Cancer

Conflict of interest: nothing to declare.
Authors' contribution: Smirnou S. – research concept, data analysis, editing; Miadzvedz A., Pashkevich A. – data analysis, data interpretation; Karpeichyk Y., Pivavarchyk S., Vakhomchyk T., Karatkevich P. – collection and processing of biological material, manuscript preparation for printing; Subach E., Portyanko A. – processing, editing, manuscript preparation for printing.

Submitted: 19.09.2025
Accepted: 10.11.2025
Contacts: genelab.omr@gmail.com

Abstract

Introduction. Liquid biopsy is a popular diagnostic approach aimed at identifying tumor-specific markers in blood plasma. The main challenge when working with cell-free circulating nucleic acids is their extremely low concentration in the bloodstream. Typically, circulating tumor DNA (ctDNA) accounts for up to 2.5% of the total cell-free DNA fraction (a few copies per 1 ml of plasma).
An important area of scientific research in the field of liquid biopsy for malignant tumors is the search for and development of methods and approaches that can improve the sensitivity of detecting oncogenic variants in blood plasma. One of the such approach may be local tumor site irradiation, leading to massive tumor cell destruction and the release of ctDNA into the bloodstream.

Purpose. To study the effect of local tumor site irradiation on the concentration of ctDNA in the blood plasma of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC).
Materials and methods. The study utilized biological materials (tumor tissue, blood) from 50 patients with advanced or metastatic NSCLC treated at the N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus from 2022 to 2025. All patients received tumor site irradiation as a part of standard radiotherapy (Stage III), or a single dose of 4 Gy (Stage IV). Blood samples were collected at the following time points: before irradiation, and 6, 12, 24, and 48 hours after the first irradiation dose. Quantitative analysis of the ctDNA fraction containing oncogenic variants in the KRAS, EGFR, BRAF genes, and methylation of the RASSF1 gene promoter was performed using digital droplet PCR.
Results. The kinetics of ctDNA was studied in 18 patients. Before irradiation, ctDNA was detected in the plasma of 14 patients (73.7%), with a subsequent increase in concentration after irradiation in 12 patients (85.7%). No statistically significant differences in ctDNA concentrations were found between the sampling time points. In three NSCLC patients with disease progression on EGFR-inhibitor therapy and negative test results for the EGFR T790M oncogenic variant, in one case, the presence of this variant was detected in ctDNA 48 hours after a single local tumor irradiation (VAF = 0.02%).
Conclusion. The induction of ctDNA release into the bloodstream via a single local tumor site irradiation may be a promising approach to enhance the diagnostic sensitivity of liquid biopsy. However, considering the significant heterogeneity of ctDNA concentration across different time intervals after irradiation, further studies are needed to investigate factors that can influence the kinetics of circulating nucleic acids.
Keywords: non-small cell lung cancer, irradiation, circulating tumor DNA, digital droplet PCR, EGFR T790M

■ ВВЕДЕНИЕ

Жидкостная биопсия – это современный диагностический подход, направленный на идентификацию опухоль-специфичных маркеров в плазме крови. Ключевыми преимуществами метода являются его неинвазивный характер, а также возможность учета опухолевой гетерогенности [1].

Основными технологиями детекции циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) являются цифровая ПЦР и секвенирование нового поколения. Несмотря на их высокую аналитическую чувствительность (до 0,01%), многие опухоли (глиомы, рак почки, рак щитовидной железы и др.) характеризуются низкой способностью выделять цоДНК в кровоток, в особенности на ранних стадиях канцерогенеза [2]. Исследование цоДНК таких злокачественных новообразований требует применения высокочувствительных методов диагностики (ультраглубокое секвенирование, Beaming-PCR и др.) [3, 4].

В настоящее время жидкостная биопсия не в состоянии полностью заменить классическую биопсию для получения достоверных результатов о молекулярно-генетическом профиле опухоли, что отражено в современных рекомендациях по лечению злокачественных новообразований легких [5]. Существующая вероятность ложноотрицательного результата тестирования предполагает необходимость исследования тканевого материала.

Одним из основных направлений научных исследований в области жидкостной биопсии является разработка новых методов и подходов, позволяющих детектировать низкие количества цоДНК. Такими примерами являются исследование больших объемов плазмы крови (8–20 мл) и увеличение кратности покрытия NGS-секвенирования.

В качестве альтернативного подхода может быть использовано облучение опухолевого очага для индукции выброса цоДНК в кровоток, вызванного массивным разрушением опухолевых клеток.

В исследовании Viktoria Kim и соавт., изучавших влияние радиотерапии на индукцию выброса цоДНК у 26 пациентов с увеальной меланомой и отсутствием цоДНК в плазме крови до начала лечения, было обнаружено, что после окончания терапии цоДНК детектировалась в 8 (31%) случаях. Частота аллельной фракции, по данным авторов, составила 0,25–2% [6].

Схожие результаты были получены и в работе Walls и соавт., изучавших кинетику цоДНК во время радиотерапии у пациентов с НМРЛ. Концентрация цоДНК была измерена до проведения лечения, а также спустя 72 часа и 7 дней с момента его начала. Было обнаружено повышение концентрации цоДНК в плазме крови через 72 часа с момента проведения 1-го курса радиотерапии и последующее ее снижение [7].

В исследовании Jae Myoung Noh и соавт. было обнаружено, что радиотерапия повышает диагностическую чувствительность детекции варианта NRAS Q61K в образцах плазмы крови ксенографтных моделей рака легкого в 4,5 раза. При этом важно отметить, что при дозе 6 Гр повышался только уровень цоДНК, но не свободной циркулирующей ДНК. Анализ кинетики цоДНК в образцах крови 11 пациентов с раком легкого, проведенный этой же группой исследователей, выявил 2-кратное повышение уровня цоДНК через 24–48 часов с момента начала радиотерапии в 10 (91%) случаях [8].

Екатериной Кулигиной и соавт., изучавшими концентрацию цоДНК в серийных образцах плазмы крови пациентов с колоректальным раком после проведения радиотерапии во временные промежутки (до облучения, через 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 и 96 часов после начала терапии), было обнаружено повышение уровня цоДНК у 5 из 9 пациентов (55,6%) [9].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить влияние локального облучения опухолевого очага на концентрацию цоДНК в плазме крови пациентов с НМРЛ.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 50 пациентов с НМРЛ III–IV стадии заболевания, проходивших лечение на базе РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова с 2022 по 2025 год. Всем пациентам была проведено облучение опухолевого очага в рамках стандартной радиотерапии (III стадия) или же разово в дозе 4 Грей (IV стадия). Исследование было одобрено этическим комитетом.

Онкогенные варианты в генах KRAS, EGFR, BRAF, метилирование промотора гена RASSF1A были обнаружены в 26 случаях (52%). В исследование кинетики цоДНК было включено 18 из 26 пациентов, их клинические характеристики представлены в табл. 1.

Таблица 1
Характеристики пациентов, включенных в исследование кинетики цоДНК после локального облучения опухолевого очага
Table 1
Characteristics of patients included in the study of ctDNA kinetics after local tumor irradiation

№	Гистологический тип	Стадия	TNM	Мишень цоДНК
1	Аденокарцинома	4	T2N3M1	RASSF1 met
2	Аденокарцинома	3	T3N2M0	BRAF V600E
3	Аденокарцинома	4	T2N2M1	KRAS
4	Аденокарцинома	4	T4N0M1	KRAS
5	Аденокарцинома	3	T3N3M0	BRAF V600E
6	Аденокарцинома	4	T3N2M1	KRAS
7	Аденокарцинома	4	T2N2M1	EGFR L858R
8	Аденокарцинома	4	TxNxM1	EGFR del
9	Аденокарцинома	4	T4N2M1	EGFR L858R
10	Аденокарцинома	2	T2N0M0	EGFR del
11	Аденокарцинома	3	T4N3M0	EGFR del
12	Аденокарцинома	4	T4N2M1	EGFR del
13	Аденокарцинома	4	T3N0M1	EGFR del
14	Аденокарцинома	4	T2N0M1	RASSF1 met
15	Аденокарцинома	4	T3N1M1	KRAS
16	Плоскоклеточный рак	4	T3N3M1	RASSF1 met
17	Плоскоклеточный рак	3	T3N2M0	RASSF1 met
18	Плоскоклеточный рак	4	T4N2M1	RASSF1 met

У трех пациентов с наличием онкогенного варианта в гене EGFR (№ 8, 12, 13) за время проведения исследования было зафиксировано прогрессирование заболевания на фоне терапии EGFR-ингибиторами. Исследование плазмы крови на момент прогрессирования показало отсутствие в кровотоке цоДНК с мутацией резистентности EGFR T790M. Всем пациентам было проведено дополнительное исследование плазмы крови на наличие данной мутации после разового локального облучения опухоли.

Забор и обработка образцов плазмы крови. Не менее 10 мл крови было забрано в каждый из следующих временных интервалов: до облучения, спустя 6, 12, 24 и 48 часов после первой дозы облучения. Забор крови осуществлялся в пробирки с ЭДТА. Образцы плазмы крови были получены не позже 2 часов после забора крови путем двухстадийного центрифугирования (350 g / 15 минут и последующие 16 000 g / 10 минут при комнатной температуре). Супернатант был аликвотирован в пробирки 2 мл и помещен на хранение при –70 °C до момента использования. Выделение цоДНК проводили с использованием набора реагентов MagListo cfDNA kit (Bioier, Корея) из объема 2 мл, согласно инструкции производителя. Концентрация выделенной цоДНК измерялась спектрофлуориметрически с использованием набора реагентов Equalbit HS dsDNA Assay kit (Vazyme, США), среднее значение составило 0,32 нг/мкл.

Цифровая капельная ПЦР. Количественный анализ фракции цоДНК с онкогенными вариантами в генах KRAS, EGFR, BRAF и метилированием промотора гена

RASSF1A был проведен с использованием систем цифровой капельной ПЦР QX200/QX600 (Bio-Rad, США). Все исследования проводились в дублях с использованием мастер-миксов и готовых наборов реагентов (EGFR del19, EGFR T790M, KRAS screen kit) согласно инструкции производителя (Bio-Rad, США), а также с использованием кастомных олигонуклеотидов и подобранных условий ПЦР для вариантов BRAF V600E, EGFR L858R, RASSF1A met (могут быть предоставлены по запросу). Используемый объем ДНК для реакции составил не менее 8 мкл, общий объем реакционной смеси 22–24 мкл. Каждая постановка включала не менее 3 образцов отрицательного контроля (вода). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения QX Manager Software 2.1. Standard Edition (Bio-Rad, США). Информативными считались все реакции с 3 и более каплями, содержащими целевую ДНК-мишень, при отсутствии в отрицательных контролях положительных сигналов выше порогового уровня.

Статистический анализ данных. Количественные данные представлены в виде медиан, для их сравнения использован непараметрический критерий Манна – Уитни. Для анализа частот встречаемости качественных признаков в двух группах использован точный критерий Фишера. Статистически значимыми считались результаты при $p<0,05$. Анализ проведен с использованием набора софта «Статистика 10.0».

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

До облучения цоДНК детектирована в плазме 14 из 18 пациентов (73,7%) с последующим ростом концентрации после облучения у 12 человек (85,7%), минимально с нуля до 0,11 копий/мкл, а максимально – в 20,4 раза (медиана в 1,9 раза). Концентрация цоДНК (медиана) в различные временные интервалы после облучения представлена на рис. 1.

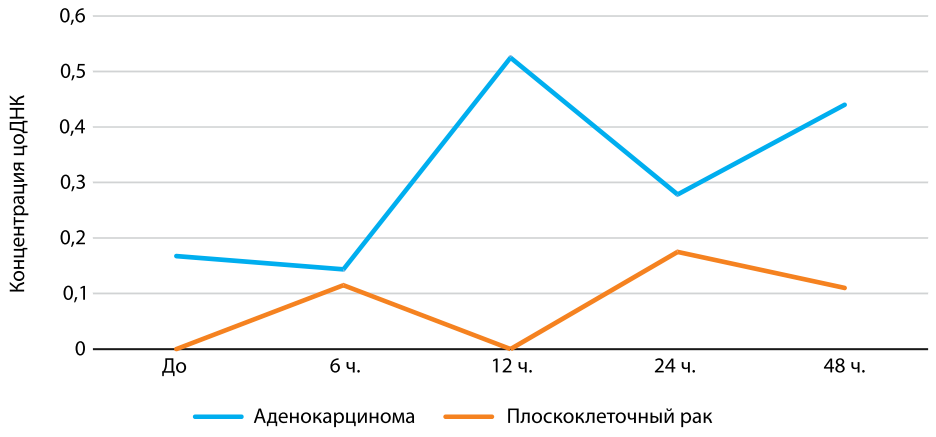

Рис. 1. Медиана концентрации цоДНК (копий/мкл) у пациентов с НМРЛ в различные временные интервалы после проведения локального облучения
Fig. 1. Median concentration of ctDNA (copies/μL) in patients with NSCLC at various time intervals after local irradiation

Таблица 2
Концентрации цоДНК (копий/мкл) у пациентов с НМРЛ в различные временные интервалы после проведения локального облучения
Table 2
Concentration of ctDNA (copies/ µL) in patients with NSCLC at various time intervals after local irradiation

№	До	6	12	24	48
1	0,93	0,526	1,71	0,365	0,546
2	0,169	0,178	0,105	0,277	0,334
3	0,52	0,098	0,425	0,756	1,48
4	0,25	0,34	0,69	0,72	0,83
5	0,12	0,19	1,8	1	1
6	0,166	0,067	0,208	0,135	0,24
7	3,61	1,72	4,04	1,28	2,85
8	0,03	0,295	0,625	0,237	0,614
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0,649	0,109	0,086	0,058	0,225
13	77,1	33,1	119	142	43,5
14	0,14	0,07	0,69	0,28	0
15	0,19	1,4	1,1	0,44	0,19
16	0,21	0,115	0	0,175	0,11
17	0	0,23	0	0,185	0,265
18	0	0,11	0	0	0,11

Изменения в концентрации цоДНК в различные временные интервалы после проведения облучения представлены в табл. 2.

Статистически значимых различий в концентрациях цоДНК между различными временными интервалами забора биоматериала не обнаружено.

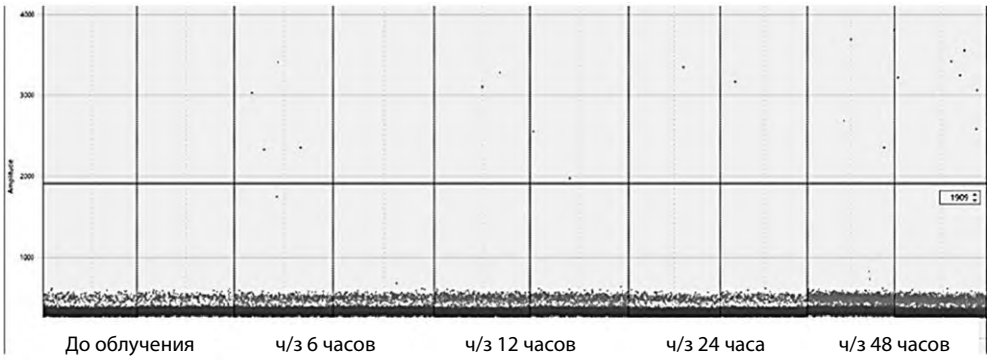

Рис. 2. Результат тестирования цоДНК, выделенной из серийных образцов плазмы пациента № 8 (мишень EGFR T790M)
Fig. 2. Test result of circulating tumor DNA (ctDNA) extracted from serial plasma samples of a patient №8 (target EGFR T790M)

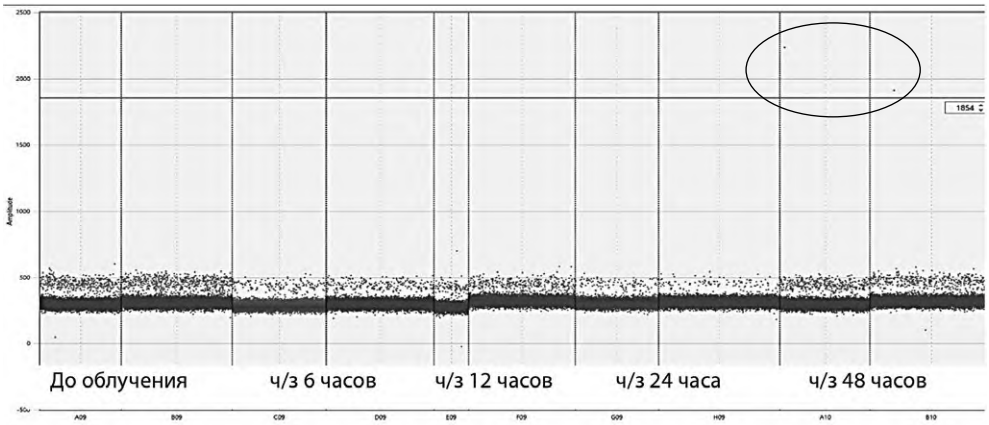

Рис. 3. Результат тестирования цоДНК, выделенной из серийных образцов плазмы пациента № 12 (мишень EGFR T790M)
Fig. 3. Test result of circulating tumor DNA (ctDNA) extracted from serial plasma samples of a patient № 12 (target EGFR T790M)

При исследовании цоДНК пациентов № 8, 12 и 13 на наличие онкогенного варианта T790M в гене EGFR в трех случаях вариант не детектировался в образцах плазмы крови до облучения.

У пациента № 13 обнаружена цоДНК с мутацией EGFR T790M в плазме крови до облучения при повторном заборе материала спустя месяц после проведенного исследования. Данная особенность встречается в нашей практике впервые, однако упоминается в литературных данных, что указывает на важность повторного забора биоматериала для исследования спустя определенный временной промежуток при отрицательном результате исследования [10].

У пациента № 8 через 48 часов после проведения облучения вариант EGFR T790M обнаружен с VAF 0,02%. Во временные интервалы 6, 12 и 24 часа также отмечены положительные сигналы целевого продукта амплификации, однако в количестве ниже порогового уровня. Стоит отметить, что данному пациенту при прогрессировании заболевания также была проведена биопсия опухолевого очага, исследование которой не выявило наличия онкогенного варианта EGFR T790M. Таким образом, исследование цоДНК в данном случае являлось более информативным подходом к диагностике мутаций вторичной резистентности на фоне терапии EGFR-ингибиторами.

Пациент № 12 характеризовался отрицательным результатом исследования во все временные промежутки. Вместе с тем во временной интервал 48 часов после облучения были обнаружены единичные положительные сигналы целевого продукта амплификации в количестве ниже порогового уровня.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Индукция выброса цоДНК в кровоток с помощью разового локального облучения опухолевого очага может являться одним из перспективных подходов к повышению диагностической чувствительности жидкостной биопсии у пациентов с НМРЛ. Несмотря на то, что наиболее высокая концентрация цоДНК отмечена через 12

и 48 часов с момента облучения, исследованная выборка пациентов характеризуется значительной гетерогенностью уровней цоДНК в различные временные интервалы. Необходимы дальнейшие исследования факторов, способных влиять на кинетику циркулирующих нуклеиновых кислот.

Исследование проведено при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) в рамках договора № М23РНФ-131.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Shields M.D., Chen K., Dutcher G. et al. Making the Rounds: Exploring the Role of Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Non-Small Cell Lung Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(16). doi: 10.3390/ijms23169006
2. Kuligina E., Yanus G., Imyanitov E. Improvement of the sensitivity of circulating tumor DNA-based liquid biopsy: current approaches and future perspectives. *Explor Target Antitumor Ther*. 2025;8(6). doi: 10.37349/etat.2025.1002333
3. García-Foncillas J., Alba E., Aranda E. et al. Incorporating BEAMing technology as a liquid biopsy into clinical practice for the management of colorectal cancer patients: an expert taskforce review. *Ann Oncol.* 2017;28(12):2943–2949.
4. Gong B., Deveson I., Mercer T. et al. Ultra-deep sequencing data from a liquid biopsy proficiency study demonstrating analytic validity. *Scientific Data.* 2022;9. doi: 10.1038/s41597-022-01276-8
5. Rolfo C., Mack P., Scagliotti G. et al. Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer. *Journal of Thoracic oncology*. 2021;16(10):1647–1662.
6. Kim V., Guberina M., Bechrakis N. et al. Release of Cell-Free Tumor DNA in the Plasma of Uveal Melanoma Patients Under Radiotherapy. *Invest Ophtalmol Vis Sci*. 2023;64(13). doi: 10.1167/iovs.64.13.35
7. Walls G., McConnell L., McAleese J. et al. Early circulating tumour DNA kinetics measured by ultra-deep next-generation sequencing during radical radiotherapy for non-small cell lung cancer: a feasibility study. *Radiat Oncol*. 2020;15(132). doi: 10.1186/s13014-020-01583-7
8. Noh J., Kim Y., Lee H. et al. Targeted Liquid Biopsy Using Irradiation to Facilitate the Release of Cell-Free DNA from a Spatially Aimed Tumor Tissue. *Cancer Res Treat*. 2022;54(1):40–53.
9. Kuligina E., Moiseyenko D., Belukhin S. Tumor irradiation may facilitate the detection of tumor-specific mutations in plasma. *World J Clin Oncol.* 2021;12(12):1215–1226.
10. Filipits M., Kainz V., Sebek V. et al. Epidermal Growth Factor Receptor T790M Mutation Testing in Non-Small Cell Lung Cancer: An International Collaborative Study to Assess Molecular EGFR T790M Testing in Liquid Biopsy. *Cancers (Basel)*. 2023;15(13). doi: 10.3390/cancers15133528