

ОБНАРУЖЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК В БЕЗЪЯДЕРНЫХ ФРАКЦИЯХ КРОВИ У ПАЦИЕНТКИ С РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ

Кононова И.В.¹, Мамаева С.Н.², Алексеев В.А.¹, Васильев И.В.³, Николаева Н.А.²,
Иноземцева Л.О.⁴

¹ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», Якутск, e-mail: irinakon.07@mail.ru;

²ФГАОУ ВО «СВФУ имени М.К. Аммосова», Якутск;

³ГБУ РС (Я) «Якутский республиканский онкологический диспансер», Якутск;

⁴ФГАОУ ВО Первый МГМУ им И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва

В статье представлены результаты исследования, посвященного выявлению фрагмента ДНК, кодирующего белок L1 вируса папилломы человека (L1 ВПЧ), и фрагмента ДНК, кодирующего β -глобин генома человека, в плазме, эритроцитарной взвеси (ЭВ) и ЭВ, обработанной трипсином, у пациентки с раком шейки матки (РШМ), к которой не был применен ни один из видов его лечения. Детекцию фрагментов ДНК осуществляли методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров MY09/11 и PC03/04 соответственно. В плазме фрагмент ДНК L1 ВПЧ и фрагмент ДНК, кодирующий β -глобин, отсутствовали. В ЭВ не наблюдалось безусловного отсутствия продуктов амплификации с праймерами для ДНК L1 ВПЧ и подтвердилось наличие генов β -глобина. В ЭВ, обработанной трипсином, присутствие продуктов амплификации изучаемых генов исходной ДНК не было подтверждено, поэтому можно предположить, что ДНК, которая может быть маркером РШМ, прикреплена к поверхности эритроцитов с помощью рецепторов. Так как полагается, что циркулирующая внеклеточная ДНК, содержащая копии генома ВПЧ, происходит из трансформированных клеток и может быть ранним биомаркером РШМ, а ген β -глобина человека активно экспрессируется клетками карциномы шейки матки, то исследование может быть началом для создания доступного по стоимости и легко воспроизводимого малоинвазивного молекулярно-генетического теста для раннего выявления РШМ.

Ключевые слова: циркулирующая опухолевая ДНК, малоинвазивный тест раннего выявления рака.

DETECTION OF CIRCULATING DNA IN NON NUCLEAR BLOOD COMPONENTS IN THE PATIENT WITH CERVICAL CANCER

Kononova I.V.¹, Mamaeva S.I.², Alekseev V.A.¹, Vasiliev I.V.³, Nikolaeva N.A.²,
Inozemtseva L.O.⁴

¹FGBNU «Yakut Scientific Center of Complex Medical Problems», Yakutsk, e-mail: irinakon.07@mail.ru;

²FGAOU VO «M. K. Ammosov North-Eastern Federal University», Yakutsk;

³GBU RS(Ya) «Yakutian Republican Oncology Center», Yakutsk;

⁴FGAOU VO First MGMU named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow

The article presents the results of a study on the detection of a DNA fragment encoding human papillomavirus L1 protein (HPV L1) and a DNA fragment encoding human genome β -globin. The detection was accomplished in plasma, erythrocyte suspension (ES) and trypsin-treated ES in a patient with cervical cancer (CC) to which none of the types of CC treatment was used. The detection of DNA fragments was carried out by real-time PCR using primers MY09/11 and PC03/04, respectively. In plasma, the HPV L1 DNA fragment and the DNA fragment encoding β -globin were absent. In ES, there was no unconditional absence of amplification products with primers for HPV L1 DNA, and the presence of β -globin genes was confirmed. In the ES treated with trypsin, the presence of amplification products of the studied genes of the original DNA was not confirmed, so it can be assumed that DNA, which can be a marker of CC, is attached to the surface of erythrocytes by receptors. Since it is believed that circulating extracellular DNA containing copies of the HPV genome originates from transformed cells and can be an early biomarker for CC, and the human β -globin gene is actively expressed by cervical carcinoma cells, the study may be the beginning of creating an affordable and easy reproducible minimally invasive molecular genetic test for CC early detection.

Keywords: circulating tumor DNA, minimally invasive test, early detection of cancer.

Рак шейки матки (РШМ) является распространенным видом рака среди женщин во всем мире. Наиболее высокую нагрузку РШМ дает на страны с низким и средним уровнями доходов

из-за ограниченного доступа к услугам общественного здравоохранения. ВОЗ признала РШМ глобальной проблемой общественного здравоохранения. [1]. В России, которая является страной со средним уровнем доходов [2], уровень заболеваемости РШМ значительно превышает целевой уровень, установленный ВОЗ для его элиминации [3]. Для профилактики РШМ и его раннего выявления в России бесплатно 1 раз в 3 года среди женщин проводится цитологический скрининг [4]. Однако заболеваемость РШМ и смертность от него в России на протяжении более чем 10 последних лет не снижаются [5].

Причиной РШМ является вирус папилломы человека (ВПЧ). Этот факт был признан в 1996 г. Всемирной организацией здравоохранения, Европейской исследовательской организацией по генитальным инфекциям и новообразованиям (European Research Organization on Genital Infection and Neoplasia) и Национальными Институтами Здравоохранения США на их совместной конференции по РШМ (National Institutes of Health Consensus Conference on Cervical Cancer) [6]. В 2021 г. ВОЗ выпустила новое руководство по профилактике РШМ, в котором отмечено, что тестирование методом выявления ДНК ВПЧ в рамках профилактики РШМ зарекомендовало себя как более эффективный метод по сравнению с другими используемыми в настоящее время методами скрининга [7].

Скрининг на РШМ проводится в соответствии с установленным порядком через достаточно длительные временные промежутки, и его целью в первую очередь является профилактика РШМ. Выявление РШМ во время скрининга в России происходит немногим более чем в трети его случаев – по информации интернет-портала Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер», РШМ в 2020 г. был выявлен во время профилактических медицинских осмотров у 39,3% заболевших им в Карелии, и это соответствует среднероссийскому показателю [8]. На этом же интернет-портале указано, что в Карелии РШМ на ранних стадиях диагностируется в 69% случаев. Следовательно, в оставшемся 31% случаев (немногим менее чем треть) РШМ диагностируется на стадиях, в которых успешность его лечения снижается. Возможно, это частично связано с тем, что женщины уклоняются от психологически некомфортной процедуры гинекологического осмотра. Известно, что перед гинекологическим осмотром все пациентки испытывают тревогу [9].

Поэтому актуальны исследования, посвященные раннему выявлению РШМ с помощью малоинвазивных процедур. Поиск маркеров РШМ в крови для его раннего выявления является одним из направлений таких исследований. Можно ожидать, что пациентки будут меньше уклоняться от тестов, определяющих маркеры РШМ в крови, чем от гинекологического осмотра, так как при венепункции уровень тревоги низкий [10]. Исследователи предлагают для раннего выявления РШМ определять циркулирующую опухолевую ДНК РШМ.

Существует мнение, что признаком наличия опухолевой ДНК РШМ в крови является обнаружение циркулирующей ДНК ВПЧ, так как полагается, что циркулирующая внеклеточная ДНК, содержащая одну или несколько копий генома ВПЧ, происходит из трансформированных клеток и может быть ранним биомаркером РШМ [11].

В основном циркулирующую ДНК ВПЧ для выявления РШМ определяют в образцах плазмы и сыворотки с помощью ПЦР в различных ее модификациях, используя праймеры для амплификации фрагмента ДНК, кодирующего участок белка E7 ВПЧ (ДНК E7 ВПЧ), так как считается, что ДНК E7 ВПЧ является оптимальным кандидатом в маркеры РШМ [12]. На примере кератиноцитов было показано, что белок E7 стимулирует репликацию и клеточное деление таким образом, что клетки остаются способными к репликации даже после их дифференцировки [13]. В исследовании E. Jeannot и соавт. с использованием праймеров для амплификации ДНК E7 ВПЧ чувствительность способа с помощью капельной цифровой ПЦР (Droplet Digital PCR) составила 87% [14]. А в исследовании P. Rungkamoltip и соавт. чувствительность с помощью схожего способа составила 31%, а после его модификации выросла до 100% [15].

Цель исследования. В этой статье мы представляем результаты проведенного нами стартового исследования по созданию малоинвазивного молекулярно-генетического теста для раннего выявления РШМ, который будет основан на детекции в крови определенных фрагментов циркулирующей ДНК. Поскольку для широкого использования тест должен быть легко воспроизводим и экономически доступен, были поставлены следующие задачи: во-первых, провести исследование методом ПЦР-РВ, который осуществляется на универсальном, широко распространенном лабораторном оборудовании, и, во-вторых, использовать в исследовании праймеры, которые широко применяются в клинических и лабораторных исследованиях, а значит, должны быть доступны, в том числе по их стоимости. В рамках этих задач было запланировано выполнить детекцию ДНК в крови у пациентки с РШМ, используя праймеры для амплификации фрагмента ДНК, кодирующего участок белка L1 ВПЧ (ДНК L1 ВПЧ). Также было решено выполнить детекцию фрагмента ДНК, кодирующего участок β -глобина генома человека, в крови у этой же пациентки. Детекцию указанных фрагментов ДНК осуществили во фракциях крови, практически не содержащих клеточных ядер, а именно в плазме и эритроцитарной фракции.

Опираясь на результаты научных работ сторонних исследователей и нашего анализа этих работ, ниже мы приводим доводы для обоснования принятых решений о совместной детекции этих фрагментов ДНК как возможного маркера РШМ в указанных фракциях крови.

Во-первых, хотя известно, что при развитии РШМ изменения в инфицированной клетке прерывают репликацию ВПЧ, поэтому вирионы-потомки не продуцируются [16] и экспрессия

L1 плохо поддерживается [17], все-таки не все инфицированные клетки у пациентов с РШМ подвергаются раковой трансформации, соответственно репликация ВПЧ при РШМ может все-таки присутствовать.

Во-вторых, есть вероятность, что ВПЧ может связываться с эритроцитами на их поверхности. На примере эксперимента с мышами показано связывание с поверхностными рецепторами их эритроцитов вирусоподобных частиц, имеющих белок L1, полученный из вируса папилломы крупного рогатого скота типа 1 [18]. К тому же рецептор ВПЧ – гепарансульфат [19] – идентифицирован на эритроцитах человека [20].

В-третьих, поскольку в исследовании С.Е. Сосудца и соавт. показано, что ДНК L1 ВПЧ может быть обнаружена в плазме женщин не только с РШМ, но и с дисплазиями шейки матки [21], в качестве возможного показателя малигнизации клеток шейки матки мы посчитали факт присутствия в безъядерных фракциях крови у пациенток с РШМ вместе с фрагментами ДНК ВПЧ также фрагментов ДНК β-глобина генома человека, так как известно, что ген β-глобина человека активно экспрессируется клетками карциномы шейки матки [22].

В-четвертых, эритроциты способны нести на своей поверхности экстрацеллюлярные везикулы [23], часть которых представлена экзосомами [24], в том числе, по нашему мнению, опухолевыми экзосомами. Имеются доказательства наличия в экзосомальной ДНК опухолевого происхождения всего генома опухолевых клеток [25]. Поэтому мы не исключили присутствия в эритроцитарной фракции заключенных в экзосомы фрагментов ДНК, кодирующих белок L1 ДНК ВПЧ, и фрагментов ДНК, кодирующих β-глобин генома человека.

В-пятых, эритроциты способны нести на своей поверхности ДНК, связанную с поверхностью клетки (cell-surface-bound extracellular DNA), которая, как было показано, образуется не без участия опухолевых клеток [26]. И поэтому, по нашему мнению, при РШМ не исключается возможность присутствия на поверхности эритроцитов ДНК, которая включает гены, кодирующие белок L1 ДНК ВПЧ, и гены, кодирующие β-глобин генома человека.

Материалы и методы исследования. Исследование было проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WORLD MEDICAL ASSOCIATION, DECLARATION OF HELSINKI). Также на него было получено одобрение Местного комитета по биомедицинской этике Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова (Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия) в соответствии с протоколом № 13 от 4 апреля 2018 г., Решение № 2.

Материалом для исследования явилась венозная кровь пациентки с впервые выявленным РШМ, жительницы Якутии. На момент забора крови к пациентке не был

применен ни один из видов лечения РШМ. Пациентка дала письменное информированное согласие на проведение исследования.

Венозная кровь была забрана путем венепункции в вакуумные контейнеры для забора крови с КЗ-EDTA. Из крови были подготовлены 3 вида биоматериала – образцы плазмы (1), эритроцитарной взвеси (2) и эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином (3). Третий вид биоматериала служил контролем присутствия искомых фрагментов ДНК на поверхности эритроцитов, а также контролем чистоты эритроцитарной взвеси. Если после обработки трипсином в эритроцитарной взвеси будут обнаружены фрагменты ДНК β-глобина генома человека, то это не будет исключать наличия в ней ядерных клеток, например нейтрофилов.

Для разделения крови на фракции ее сначала центрифугировали при 1600 об/мин в течение 10 минут. На этом этапе были получены образцы плазмы (1) и эритроцитарная фракция. Затем эритроцитарную фракцию объемом 1 мл трижды отмыли фосфатным буфером для получения образца эритроцитарной взвеси (2). Образец эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином (3), получили следующим образом: в половину объема образца эритроцитарной взвеси, приготовленной способом, который описан выше, добавили 0,25%-ный раствор трипсина в соотношении 1:1 и инкубировали при температуре 37°C в течение 10 минут, после инкубации центрифугировали для получения осадка; затем нижнюю часть осадка трижды отмыли фосфатным буфером, и этот биоматериал был включен в исследование как образец эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином.

Все образцы до выделения ДНК и проведения ПЦР-РВ хранились в морозильнике при температуре –20°C.

ДНК из образцов была выделена с помощью фенол-хлороформного метода. Концентрацию и качество выделенной ДНК определяли с использованием наноспектрофотометра, следуя инструкции производителя [27].

ПЦР-РВ проводилась на амплификаторе CFX96 (Biorad) с использованием готовой реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR+LowROX (Evrogen) согласно параметрам, рекомендуемым производителем [28].

Для детекции фрагментов ДНК, кодирующих белок L1 ДНК ВПЧ, и фрагментов ДНК, кодирующих β-глобин генома человека, использовались праймеры MY09/11 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'/5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') и PC03/04 (5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'/5'-CAACTTCATCCACGTTCAAC-3') соответственно.

Длину ампликонов определяли методом электрофореза в агарозном геле.

Результаты исследования и их обсуждение. Во всех 3 образцах ДНК была обнаружена и выделена в достаточной концентрации: в образцах плазмы и эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином, концентрация ДНК была выше верхней границы

чувствительности наноспектрофотометра, а в эритроцитарной взвеси концентрация имела значение 3773 нг/мл.

В результате проведения ПЦР-РВ с праймерами МУ09/11 и РС03/04 было выявлено следующее:

– для ДНК, извлеченной из плазмы: фрагмент ДНК, кодирующий белок L1 ДНК ВПЧ, и фрагмент ДНК, кодирующий β -глобин генома человека, обнаружены не были (рис. 1);

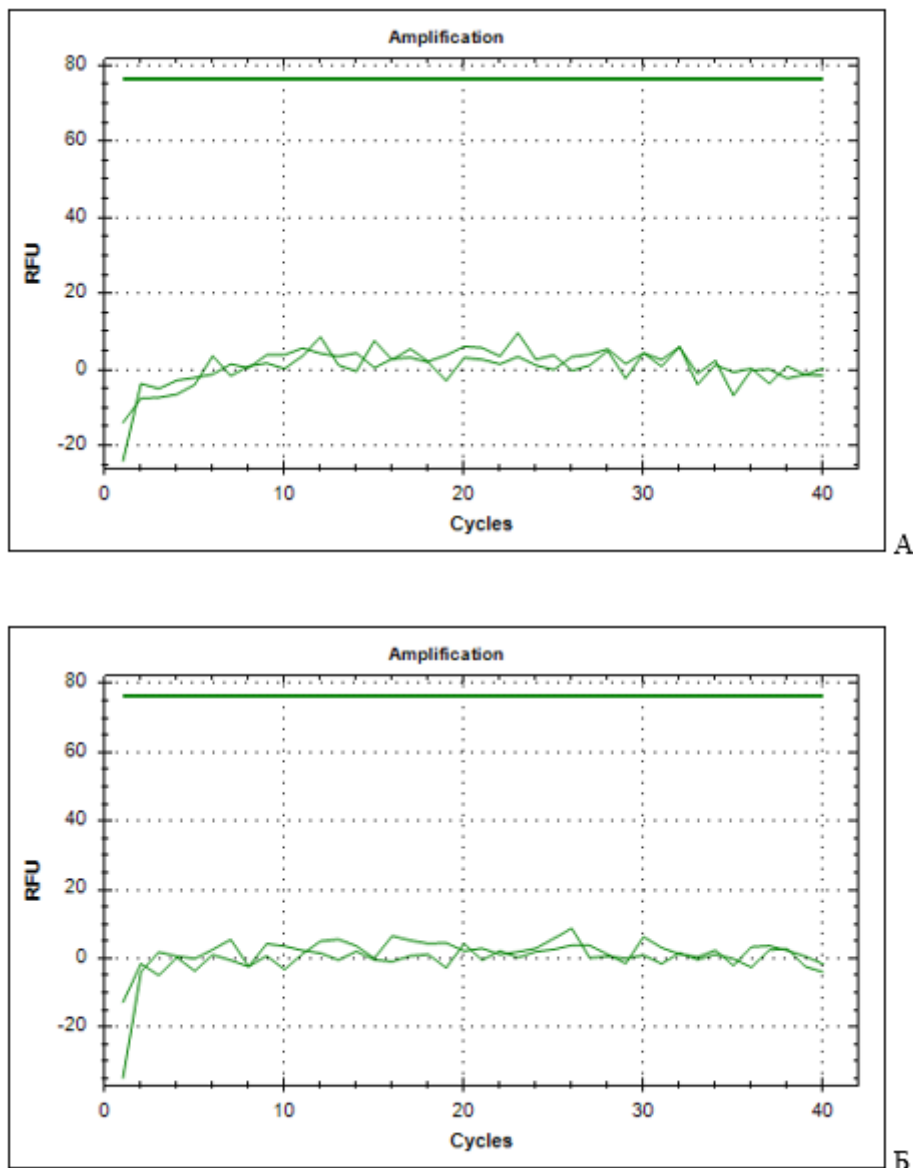
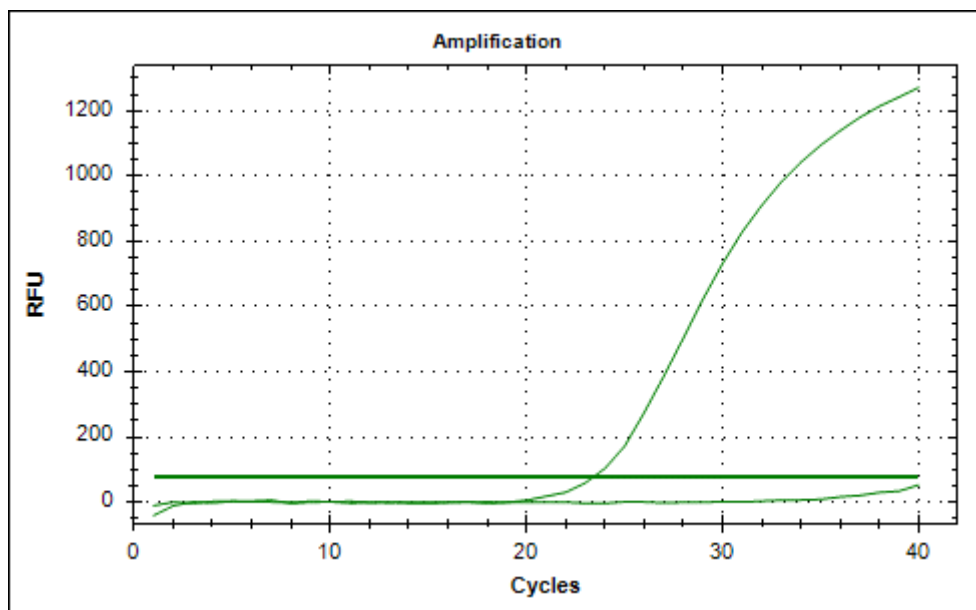
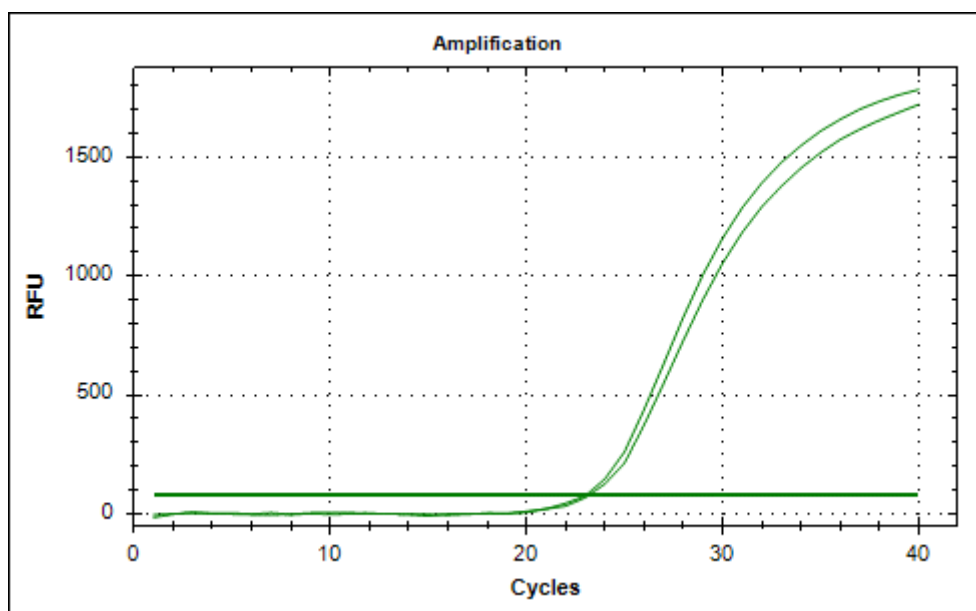


Рис. 1. Графики накопления флуоресцентного сигнала амплификации фрагментов ДНК, выделенной из плазмы пациентки с РШМ. А – амплификация фрагмента ДНК, кодирующего белок L1 ДНК ВПЧ, и Б – кодирующего β -глобин генома человека

– для ДНК, извлеченной из эритроцитарной взвеси: для фрагмента ДНК L1 ВПЧ был получен сомнительный результат амплификации, в то время как фрагмент ДНК, кодирующий β -глобин генома человека, был обнаружен (рис. 2);



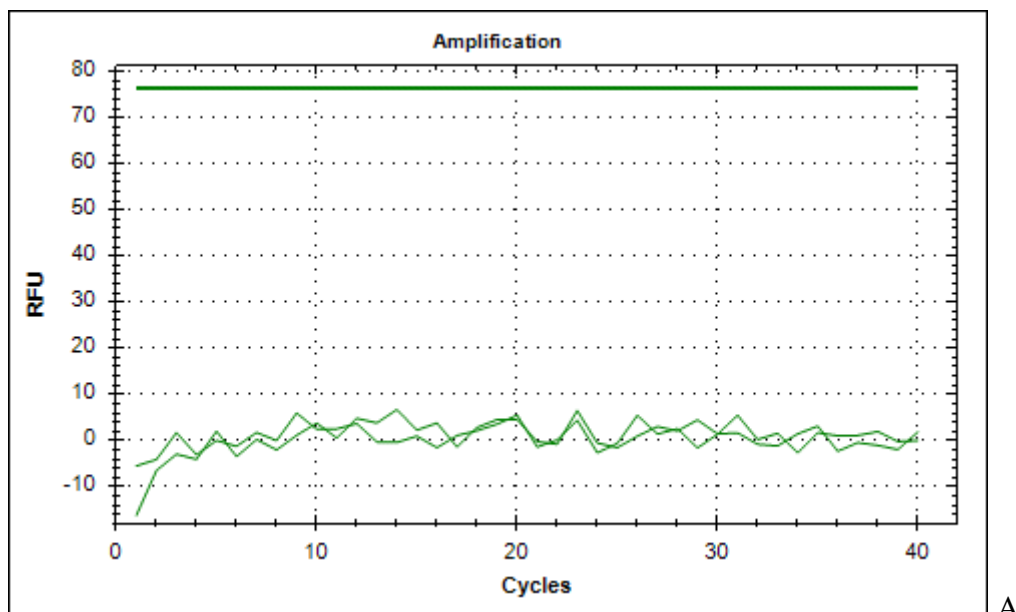
А



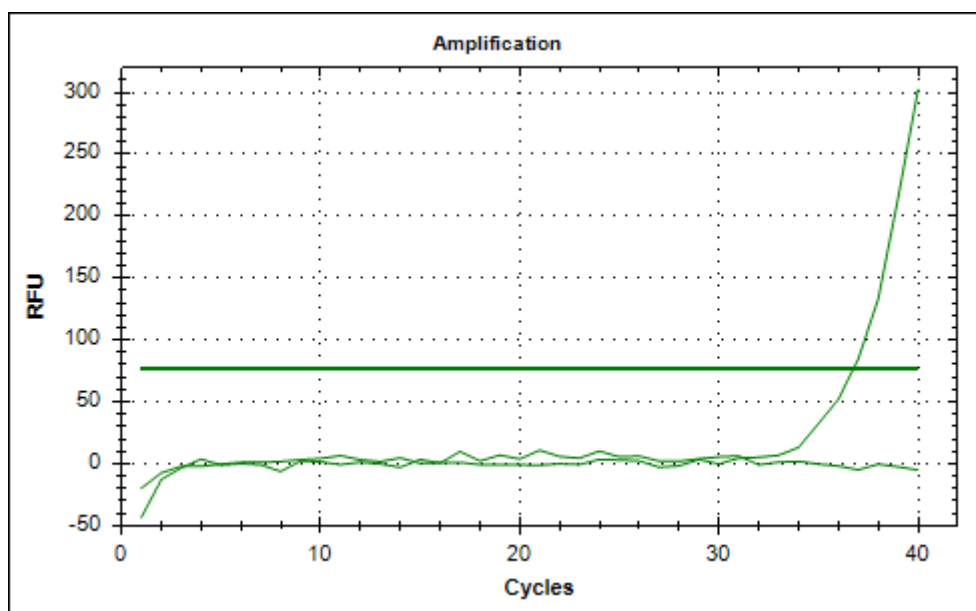
Б

Рис. 2. Графики накопления флуоресцентного сигнала амплификации фрагментов ДНК, выделенной из эритроцитарной взвеси пациентки с РШМ. А – амплификация фрагмента ДНК, кодирующего белок L1 ДНК ВПЧ, и Б – кодирующего β -глобин генома человека

– для ДНК, извлеченной из эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином: фрагмент ДНК L1 ВПЧ не обнаружен, а для фрагмента ДНК, кодирующего β -глобин генома человека, был получен сомнительный результат амплификации (рис. 3).



А



Б

Рис. 3. Графики накопления флуоресцентного сигнала амплификации фрагментов ДНК, выделенной из эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином, у пациентки с РШМ. А – амплификация фрагмента ДНК, кодирующего белок L1 ДНК ВПЧ, и Б – кодирующего β -глобин генома человека

Проведенный электрофорез подтвердил наличие продуктов амплификации в образцах, где в результате ПЦР-РВ произошла амплификация изучаемых фрагментов исходной ДНК, а также подтвердил отсутствие продуктов амплификации фрагментов ДНК, с которыми при проведении ПЦР-РВ не произошло накопления флуоресцентного сигнала. В образцах с сомнительным результатом амплификации проведенной ПЦР-РВ было выявлено следующее: электрофорез показал наличие продуктов амплификации для извлеченного из эритроцитарной

взвеси фрагмента ДНК, который кодирует L1 ДНК ВПЧ, и показал отсутствие продуктов амплификации для извлеченного из эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином, фрагмента ДНК, который кодирует участок β -глобина генома.

Электрофорез выявил, что продукты ПЦР-РВ имеют размеры от 50 пн до 200 пн. Этот размер соответствует рекомендуемым размерам ампликонов для получения последовательных и надежных результатов ПЦР-РВ [29].

Таким образом, у пациентки с впервые выявленным РШМ в эритроцитарной взвеси не наблюдалось безусловного отсутствия продуктов амплификации с праймерами для ДНК L1 ВПЧ и подтвердилось наличие генов β -глобина генома человека. Так как в эритроцитарной взвеси, обработанной трипсином, присутствие продуктов амплификации изучаемых генов исходной ДНК не было подтверждено, можно предположить, что циркулирующая ДНК, которая может быть маркером РШМ, прикреплена к поверхности эритроцитов с помощью рецепторов.

Возможность прикрепления ДНК, в том числе опухолевой ДНК, к поверхности эритроцитов была обсуждена выше. Однако в этом эксперименте ДНК, пусть даже в которой не произошла детекция изучаемых генов, была обнаружена в эритроцитарной взвеси после обработки ее трипсином. Мы упомянули в самом начале раздела, что ДНК была выявлена в этом образце в достаточной концентрации, и это будет являться предметом обсуждения для продолжения исследования. Вероятно, обнаружение ДНК в эритроцитарной взвеси после обработки ее трипсином связано с неспецифическим связыванием ДНК с поверхностью эритроцитов. Во всяком случае, на примере ядерных клеток в исследовании Д.Н. Беляева показана адсорбция фаговой и плазмидной ДНК к мышинным фибробластам и клеткам миеломы, при этом дополнительная предобработка клеток трипсином не влияла на эффективность адсорбции ДНК [30].

Заключение. Конечно, наше исследование имеет ограничения – мы не исключаем технических ошибок. Поэтому исследование должно быть расширено – требуется большее количество пациенток как с РШМ, так и с неоплазиями шейки матки и здоровых пациенток. Важным сейчас для продолжения исследования представляется использование других праймеров для ДНК ВПЧ и ДНК человека наряду с использованными в этой работе. Также необходимо собрать более широкую личную, в том числе медицинскую, информацию о пациентках.

Тем не менее, наша стартовая экспериментальная работа показала, что исследование по обнаружению в безъядерных фракциях крови фрагментов циркулирующей ДНК с помощью ПЦР-РВ с использованием доступных праймеров для ДНК ВПЧ и ДНК человека должно быть продолжено. Такое исследование может лечь в основу создания доступного по стоимости и

легко воспроизводимого малоинвазивного молекулярно-генетического теста для раннего выявления РШМ.

Список литературы

1. Всемирная организация здравоохранения. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/feature-stories/detail/73rd-world-health-assembly-decisions> (дата обращения: 11.02.2022).
2. The World Bank. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.worldbank.org/> (дата обращения: 11.02.2022).
3. Кононова И.В., Кириллина М.П., Софронова С.И., Захарова Ф.А. Анализ заболеваемости раком шейки матки в Арктической зоне Российской Федерации для выявления регионов, остро нуждающихся в его профилактике // Якутский медицинский журнал. 2021. № 4. С. 103-107. DOI: 10.25789/УМЖ.2021.76.24.
4. Приказ Минздрава РФ от 13.03.2019 №124н «Об утверждении порядка проведения профилактического медосмотра и диспансеризации определённых групп взрослого населения» // Российская газета. 29 апреля 2019 г. [Электронный ресурс]. URL: rg.ru/2019/04/29/minzdrav-prikaz124-site-dok.html (дата обращения: 11.02.2022).
5. Кононова И.В., Кириллина М.П., Софронова С.И., Илларионова Н.А., Мамаева С.Н., Аржакова Л.И., Захарова Ф.А. Различия между республиками, расположенными в Сибири, и Россией в целом в заболеваемости раком шейки матки и смертности от него в период с 2007 по 2019 г // Якутский медицинский журнал. 2021. № 1. С. 50-54. DOI: 10.25789/УМЖ.2021.73.14.
6. Burd E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003. Vol. 16 (1). P. 1-17. DOI: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003.
7. Всемирная организация здравоохранения. Европейское региональное бюро. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer/news/news/2021/9/who-recommends-dna-testing-as-a-first-choice-screening-method-for-cervical-cancer-prevention> (дата обращения: 11.02.2022).
8. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер». [Электронный ресурс]. URL: <https://onko-karelia.ru/about/sobytiya/aktualnye-voprosy-skrininga-raka-sheyki-matki> (дата обращения: 11.02.2022).

9. Yilmaz F.T., Demirel G. The relationship between body privacy and anxiety in women having gynecological examination. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2021. Vol. 41 (7). P. 1112-1115. DOI: 10.1080/01443615.2020.1835845.
10. Deacon B., Abramowitz J. Fear of needles and vasovagal reactions among phlebotomy patients. *Anxiety Disorders*. 2006. Vol. 20 (7). P. 946-960. DOI: 10.1016/j.janxdis.2006.01.004.
11. Gu Y., Wan C., Qiu J., Cui Y., Jiang T., Zhuang Z. Circulating HPV cDNA in the blood as a reliable biomarker for cervical cancer: A meta-analysis. *PLoS One*. 2020. Vol. 15 (2). e0224001. DOI: 10.1371/journal.pone.0224001.
12. Campitelli M., Jeannot E., Peter M., Lappartient E., Saada S., de la Rochefordière A., Fourchette V., Alran S., Petrow P., Cottu P., Pierga J.-I., Lantz O., Couturier J., Sastre-Garau X. Human papillomavirus mutational insertion: specific marker of circulating tumor DNA in cervical cancer patients. *PLoS One*. 2012. Vol. 7 (8). e43393. DOI:10.1371/journal.pone.0043393.
13. Yim E.K., Park J.S. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Research and Treatment*. 2005. Vol. 37 (6). P. 319-324. DOI: 10.4143/crt.2005.37.6.319.
14. Jeannot E., Becette V., Campitelli M., Calmégane M.A., Lappartient E., Ruff E., Saada S., Holmes A., Bellet D., Sastre-Garau X. Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma. 2016. *The Journal of Pathology: Clinical Research*. 2016. Vol. 28 (2(4)). P. 201-209. DOI: 10.1002/cjp2.47.
15. Rungkamoltip P., Temisak S., Piboonprai K., Japrunng D., Thangsunan P., Chanpanitkitchot S., Chaowawanit W., Chandeying N., Tangjitgamol S., Iempridee T. Rapid and ultrasensitive detection of circulating human papillomavirus E7 cell-free DNA as a cervical cancer biomarker. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 2021. Vol. 246 (6). P. 654-666. DOI: 10.1177/1535370220978899.
16. Graham S.V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical science (London)*. 2017. Vol. 131 (17). P. 2201–2221. DOI: 10.1042/CS20160786.
17. Middleton K., Peh W., Southern S., Griffin H., Sotlar K., Nakahara T., El-Sherif A., Morris L., Seth R., Hibma M., Jenkins D., Lambert P., Coleman N., Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *Journal of Virology*. 2003. Vol. 77 (19). P. 10186-10201. DOI: 10.1128/jvi.77.19.10186-10201.2003.

18. Roden R.B., Hubbert N.L., Kirnbauer R., Breitburd F., Lowy D.R., Schiller J.T. Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor. *Journal of Virology*. 1995. Vol. 69 (8). P. 5147-5151. DOI: 10.1128/JVI.69.8.5147-5151.1995.
19. Buck C.B., Day P.M., Trus B.L. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*. 2013. Vol. 445 (1-2). P. 169-174. Doi: 10.1016/j.virol.2013.05.038.
20. Vogt A.M., Winter G., Wahlgren M., Spillmann D. Heparan sulphate identified on human erythrocytes: a Plasmodium falciparum receptor. *Biochemical Journal*. 2004. P. 381 (Pt 3). P.593-597. DOI: 10.1042/BJ20040762.
21. Cocuzza C.E., Martinelli M., Sina F., Piana A., Sotgiu G., Dell'Anna T., Musumeci R. Human papillomavirus DNA detection in plasma and cervical samples of women with a recent history of low grade or precancerous cervical dysplasia. *PLoS One*. 2017. Vol. 12 (11). e0188592. DOI: 10.1371/journal.pone.0188592.
22. Li X., Wu Z., Wang Y., Mei Q., Fu X., Han W. Characterization of adult α - and β -globin elevated by hydrogen peroxide in cervical cancer cells that play a cytoprotective role against oxidative insults. *PLoS One*. 2013. Vol. 8 (1). e54342. DOI: 10.1371/journal.pone.0054342.
23. Mamaeva S.N., Kononova I.V., Alekseev V.A., Nikolaeva N.A., Pavlov A.N., Semenova M.N., Maksimov G.V. Determination of blood parameters using scanning electron microscopy as a prototype model for evaluating the effectiveness of radiation therapy for cervical cancer. *International Journal of Biomedicine*. 2021. Vol. 11 (1). P. 32-38. DOI: 10.21103/Article11(1)_OA6.
24. Doyle L.M., Wang M.Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*. 2019. Vol. 8 (7). e727. DOI: 10.3390/cells8070727.
25. Thakur B.K., Zhang H., Becker A., Matei I., Huang Y., Costa-Silva B., Zheng Y., Hoshino A., Brazier H., Xiang J., Williams C., Rodriguez-Barrueco R., Silva J.M., Zhang W., Hearn S., Elemento O., Paknejad N., Manova-Todorova K., Welte K., Bromberg J., Peinado H., Lyden D. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res*. 2014. Vol. 24 (6). P. 766-9. DOI: 10.1038/cr.2014.44.
26. Tamkovich S., Laktionov P. Cell-surface-bound circulating DNA in the blood: Biology and clinical application. *IUBMB Life*. 2019. Vol. 71 (9). P. 1201-1210. DOI: 10.1002/iub.2070.
27. NanoPhotometer® P-Class User Manual P 300 / P 330 / P 360. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.implen.de/wp-content/uploads/2015/04/NanoPhotometer-P-Class-User-Manual-2.1.pdf> (дата обращения: 11.02.2022).
28. Evrogen. [Электронный ресурс]. URL: https://evrogen.ru/kit-user-manuals/qPCRmix-HS-SYBR-LowROX_PK156.pdf (дата обращения: 11.02.2022).

29. Quellhorst G., Rulli S. A systematic guideline for developing the best real-time PCR primers Lessons learned from designing assays for more than 14,000 genes. Qiagen. 2012. P. 1–9. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/resources/> (дата обращения: 11.02.2022).
30. Беляев Н.Д., Будкер В.Г., Горохова О.Е., Соколов А.В. Mg²⁺-зависимое взаимодействие с эукариотическими клетками // Молекулярная биология. 1988. № 22 (6). С. 1667-1672.