

Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-006

Вопросы онкологии, 2018. Том 64, № 3

И.Н. Васильева¹, В.Г. Беспалов^{1,2}

Доклиническое и клиническое изучение внеклеточной ДНК при онкологических и других заболеваниях, связанных с нарушением апоптоза

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,
²Университет ИТМО,
Санкт-Петербург

Онкологические заболевания на всех стадиях канцерогенеза сопровождаются нарушением процессов апоптоза. Лекарственная и лучевая терапия активируют апоптоз опухолевых клеток. Представлены результаты экспериментальных исследований внеклеточной ДНК (вкДНК) после воздействия ионизирующей радиации и низкочастотного шума, введения витаминов; у животных с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, раком яичника; в клинических исследованиях у больных хронической обструктивной болезнью легких, а также при острых нарушениях мозгового кровообращения. Рассматриваются возможности определения вкДНК для оценки действия канцерогенов, в комплексной диагностике предраковых заболеваний, прогрессирования предраковых заболеваний и злокачественных опухолей.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, нуклеосомы, апоптоз, предраковые заболевания, патологии

Нарушения в системе апоптоза, как наиболее изученной формы клеточной гибели, вовлечены в патогенез многих заболеваний. Так, с ингибированием апоптоза ассоциируют, прежде всего, злокачественные опухоли, аутоиммунные и вирусные инфекции, а с усилением апоптоза — СПИД, ишемические повреждения. Индукция апоптоза в опухолевых клетках является механизмом как лекарственной, так и лучевой терапии. Апоптоз также считают ключевым антиканцерогенным механизмом при профилактике рака практически на всех стадиях канцерогенеза. Последствием апоптоза ядродержащих клеток является фрагментация ДНК, циркулирующей в плазме крови и других биологических жидкостях в виде фрагментов нуклеосом, которая и предложена в качестве интегрального маркера протекания процессов апоптоза [6].

В настоящее время активно ведутся исследования внеклеточной ДНК (вкДНК) в рамках

разработки методов минимально инвазивной диагностики, в качестве замены или дополнения тканевой биопсии. Полагают, что вкДНК онкологических больных может происходить из здоровых клеток, опухолевых клеток и клеток микроокружения опухоли [13]. Показано, что количество вкДНК возрастает с увеличением числа клеток опухоли и заметно повышается при прогрессировании заболевания и метастазировании. Получены данные об источнике происхождения, функции и структуре вкДНК [2, 6, 13]. Полагают, что вкДНК является постоянным как физиологическим, так и повреждающим агентом, в норме индуцирующим апоптоз, но и участвующим в развитии множества патологий, включающих старение и индукцию рака [12].

Длина молекул высокомолекулярной фракции находится в интервале 3,5-6 т.п.н., а пятна низкомолекулярной — около 160-180 п.н. Так, длина молекул низкомолекулярной фракции соответствует ДНК нуклеосомы, эта ДНК находится в комплексе с РНК и белками, и ее уровень в асцитной жидкости больных с опухолями яичников снижается после проведения химиотерапии [2]. Применение современной методологии, с использованием ксенографных моделей мультиформной глиобластомы и секвенирования случайной массивированной выборки фрагментов вкДНК (shotgun libraries) пациентов с меланомой или раком легкого, показало, что в среднем длина низкомолекулярных фрагментов вкДНК из опухоли составляет 134-144 п.н., а из нормальных тканей — 167 п.н. [15].

Цель работы — оценить возможность использования вкДНК для диагностики рака, предопухолевых заболеваний, оценки повреждающего действия канцерогенов и других вредных факторов в эксперименте и клинике.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на крысах-самцах Вистар (Рапполово, Ленинградская обл.). Содержание и все манипу-

лляции с крысами проводили в соответствии с требованиями действующих стандартов по содержанию и использованию лабораторных животных. Однократное γ -облучение животных (137 Cs) проводили аппарате ИГУР в дозах в дозах 2 Гр, 4 Гр, 8 Гр, 20 Гр, 50 Гр и 100 Гр. Кровь собирали через 1 ч, 2 ч, 5 ч, 1 сут, 2 сут, 3 сут и 7 сут после облучения, для определения каждого значения использовали от 6 до 60 крыс [8]. Комбинацию витаминов Е (10 мг/кг массы тела) и С (20 мг/кг) исследовали при однократном пероральном введении до и после γ -облучения в дозе 8 Гр [17]. Воздействие низкочастотного шума (НЧШ) выполнено на лабораторной установке с излучателем JBL 2225 (США). Крыс подвергали однократному (17 мин) или многократному (13 нед, по 5 дней в нед., 1 раз в день по 17 мин) воздействию НЧШ с уровнями звукового давления (УЗД) 120 дБ и 150 дБ и максимумом спектра в области низких частот [18]. Индукцию доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) у молодых, возрастом 3 месяца, с массой тела $217,6 \pm 5,2$ г (35 крыс) и старых животных, возрастом 2 года, с массой тела $441,6 \pm 16,5$ г (35 крыс) индуцировали введением пролонгированного препарата тестостерона предварительно орхидэктомированным крысам [1]. В интактном контроле 22 крысы (12 молодых и 10 старых) не подвергали никаким воздействиям. Трансплантацию штамма рака яичника (РЯ) проводили крысам-самкам Вистар возрастом 2 нед. и массой 210 ± 35 г. Использованный штамм РЯ получен из РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, тип опухоли и условия перевивки описаны ранее [8]. Крыс рандомизировали на 7 групп: интактный контроль — 6 крыс; далее по 6 крыс: 1 сут. (24 ч) после перевивки, 2 сут. (48 ч), 3 сут., 4 сут., 7 сут. и 9 сут. после перевивки.

Клинические исследования выполнены у больных с патологией легких, всего 110 участников в возрасте 42–80 лет: 31 пациент с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и 20 пациентов с хроническим необструктивным бронхитом (ХНБ), 19 здоровых родственников первой линии пациентов с ХОБЛ, 23 — с ХНБ и 17 здоровых доноров [3]. Были также обследованы стационарные больные с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК). Образцы крови у них собирали через 3, 6, 12, 24, 48 и 72 ч после начала инсульта, ишемического или геморрагического, по 8 больных, а спинномозговую жидкость (СМЖ) получали от 38 больных с ишемическим инсультом через 24 ч, несколько суток или более 3-х недель после начала заболевания [5].

ЭДТА-плазму получали центрифугированием 30 мин при 810 g. Содержание вкДНК в плазме крови определяли сэндвич-иммуноферментным анализом (Cell Death Detection ELISA PLUS Kit, Roche) [11]. Выделение вкДНК из плазмы крови и других биологических жидкостей проводили фенольным методом [5], а выделенную вкДНК определяли спектрофлуориметрическим методом [7]. Низкомолекулярную фракцию вкДНК (нмвкДНК) анализировали с применением вертикального электрофореза в 2-16 % градиенте полиакриламида [4]. Проведено клонирование в *E.coli* в плазмиде Bluescript M13+ и секвенирование по Сэнгеру очищенной нмвкДНК [5].

Результаты и обсуждение

Исследование внеклеточной ДНК в плазме крови облученных животных

Было обнаружено, что после облучения крыс в дозах от 2 до 100 Гр концентрация вкДНК в плазме крови возрастала с увеличением дозы. Концентрации вкДНК были наибольшими через 2 ч после облучения в дозах 2 Гр — 4 Гр и че-

рез 5 ч после облучения в дозах от 8 до 100 Гр. При электрофоретическом разделении вкДНК плазмы крови были четко различимы ее высокомолекулярная и низкомолекулярная фракции. Содержание нмвкДНК через 5 ч после облучения значительно возрастало с увеличением дозы: до 20 Гр зависимость была прямо пропорциональная, от 20 до 100 Гр — логарифмическая. Получены уравнения линейной и логарифмической регрессии, позволяющие достоверно рассчитать дозу облучения по содержанию нмвкДНК [7].

Секвенирование низкомолекулярной ДНК плазмы крови облученных крыс (нмвкДНК)

Секвенирование нмвкДНК крови крыс после воздействия ионизирующего облучения в дозах 8 и 100 Гр, приводящего к возникновению различных форм лучевой болезни — костно-мозговой и церебральной, позволило выявить некоторые дозозависимые различия. Длина вставки нмвкДНК после облучения 100 Гр значительно варьировала, увеличение разброса свидетельствует о более значительном повреждении ДНК (одно- и двунитевые разрывы) после воздействия в дозе 100 Гр. Значимые различия обнаружены в распределении динуклеотидов. Исследование по программе RECON подтвердило вероятность формирования нуклеосом для нмвкДНК облученных крыс. Наше предположение о выделении вкДНК после облучения в дозах 8 или 100 Гр из различных типов тканей было вполне закономерно, так, применение метода глубокого секвенирования и определения позиционирования нуклеосом позволяет определять тканевую принадлежность ДНК [14].

Лучевая патология во многом определяется процессами клеточной гибели: в ответ на повреждение ДНК белок P53 блокирует клеточный цикл в фазе G1, стимулирует репарационные процессы, а если активность репарационных систем недостаточна, то модулирует апоптоз, защищая организм от появления мутантных клеток [7]. Повышение содержания вкДНК через 5 ч после облучения с последующим снижением через 1 сутки, впервые выявленное нами, может использоваться в качестве показателя эффективности лучевой терапии онкологических больных [10]. Этот подход применим для новых методов терапии, таких как селективная внутренняя радиотерапия с адресной доставкой меченых микросфер [2]. Работы по исследованию вкДНК при радиационных воздействиях нашли продолжение. Обнаружено, что выделяемая гибнущими клетками вкДНК содержит значительную часть окисленных нуклеотидов и опосредует эффект свидетеля и адаптивный эффект [2]. Показано, что хроматин, выделяемый

из умирающих клеток, способен встраиваться в хромосомы, приводя к увеличению репарационных процессов [12].

Исследование низкомолекулярной внеклеточной ДНК для оценки механизма действия лекарственных средств

Апоптотическое действие комбинации α -токоферола ацетата (витамин Е) и аскорбиновой кислоты (витамин С) оценивали по уровню нмвкДНК в плазме крови через 5 ч после облучения животных. Эта комбинация при введении за 10 мин до облучения в дозе 8 Гр значительно увеличивала содержание нмвкДНК в крови. Так, радиопротекторный эффект смеси витаминов Е и С объясняется ее апоптотическим действием [16].

Низкомолекулярная внеклеточная ДНК для оценки вредного воздействия низкочастотного шума (НЧШ)

Исследования показали, что содержание нмвкДНК значительно увеличивалось в результате действия НЧШ. Через 1 сутки после однократного действия НЧШ, вне зависимости от УЗД, было обнаружено 7,6-кратное повышение содержания нмвкДНК в плазме крови крыс по сравнению с животными, не подвергавшимися воздействию НЧШ. Повышенное содержание нмвкДНК сохранялось не менее 7 дней. Многократное воздействие НЧШ вызывало дальнейшее повышение содержания нмвкДНК в плазме крови. Результаты позволяют предположить, что воздействие НЧШ вызывает развитие патологического процесса с участием массивной клеточной гибели. Возможно, акустические воздействия представляют собой значительно более вредный фактор, чем представлялось ранее, в том числе обладают канцерогенным действием [17].

Исследование содержания внеклеточной ДНК в крови молодых и старых крыс при индукции доброкачественной гиперплазии предстательной железы

У интактных старых самцов крыс по сравнению с молодыми обнаружено значимое увеличение уровня вкДНК. У пожилых людей также отмечается повышенный уровень вкДНК в крови по сравнению с молодыми, который связывают с хроническими воспалительными процессами [11]. Выраженность ДГПЖ, которая развивалась через 1 месяц после начала введения тестостерона, у старых крыс была значительно выше, чем у молодых. Так, мы наблюдали различные реакции на введение экзогенного тестостерона

молодым и старым животным. У молодых крыс с увеличением уровня тестостерона в крови содержание вкДНК не изменялось значимо, а у старых крыс при тех же условиях содержание вкДНК было существенно выше, чем у молодых животных. Полагают, что в основе развития ДГПЖ лежит снижение апоптоза в тканях простаты [9]. На этом фоне к появлению в кровотоке вкДНК приводят воспалительные процессы из-за присутствия в тканях дефектных клеток, а также ишемический некроз и сопутствующие процессы апоптоза. Нами впервые выявлено усиление гибели клеток в тканях старых крыс при развитии ДГПЖ, проявляемое увеличением содержания вкДНК. Полученные нами результаты обосновывают возможность применения вкДНК в качестве диагностического критерия при исследовании состояния здоровья пожилых мужчин с ДГПЖ. ДГПЖ и рак простаты [1] являются проблемой для стареющего мужского населения во всем мире. Возможно, присутствие хронического воспаления представляет собой фактор риска предраковых заболеваний и рака не только в простате, но и в других органах.

Исследование внеклеточной ДНК в крови и асците крыс с перевитым раком яичника

При развитии перевиваемого асцитного РЯ у крыс было обнаружено, что уровень вкДНК в плазме крови в течение 9 дней после его трансплантации не изменяется значимо, однако обнаружена тенденция к его снижению на 3–7 день после перевивки, с последующей тенденцией к повышению на 9-й день. На 7– день после перевивки РЯ в брюшной полости крыс развивается асцит. Уровень вкДНК в асците был статистически достоверно выше, чем в плазме крови как контрольных крыс, так и крыс с перевитым РЯ в течение 1–9 дней после трансплантации. Так, определение вкДНК на модели перевиваемого РЯ у самок крыс представляется перспективным и требующим дальнейших исследований методом. Отработанную модель предполагается применить для оценки действия эффективности цитостатических препаратов. Полученные данные в целом подтверждают предположение о снижении уровня вкДНК в процессе канцерогенеза, которое, в данном случае, происходит в процессе развития трансплантированной опухоли.

Внеклеточная ДНК у больных с хроническими заболеваниями бронхолегочной системы

В клиническом исследовании у пациентов с ХОБЛ в состоянии ремиссии отмечено пониженное содержание нмвкДНК в плазме крови по

Таблица 1. Количество внеклеточной ДНК в плазме крови в норме и при различных вариантах патологии

Вид	Норма/Патология	Способ определения	Количество вкДНК в плазме крови
Крыса	Норма	Выделение фенолом, спектрофлуорометрическое определение	26,3±1,8 нг/мл
Крыса	Облучение 2–100 Гр, 5 ч	Тот же	34,8–396,0 нг/мл
Крыса	Норма	Выделение фенолом, электрофорез в градиенте полиакриламида	5,5–11,0 нг/мл
Крыса	Облучение 8–100 Гр, 5 ч	Тот же	53,2–338,5 нг/мл
Крыса	Однократное воздействие НЧШ	Тот же	84–85 нг/мл
Крыса	Множественное воздействие НЧШ	Тот же	396–644 нг/мл
Крыса	Норма у молодых	ИФА, Cell Death Detection ELISA PLUS	102±30 нг/мкл
Крыса	Норма у старых	Тот же	200±14 нг/мкл
Крыса	ДГПЖ у молодых	Тот же	80±14 нг/мкл
Крыса	ДГПЖ у старых	Тот же	314±76 нг/мкл
Крыса-самка	Норма	Тот же	40±7 нг/мкл
Крыса-самка	РЯ	Тот же	7±1 нг/мкл
Человек	Норма	Выделение фенолом, электрофорез в градиенте полиакриламида	30–32 нг/мл
Человек	ХОБЛ в ремиссии	Тот же	7,8±2,0 нг/мл
Человек	Ишемический инсульт, 24 ч	Тот же	77,8 нг/мл
Человек	Геморрагический инсульт, 3 ч	Тот же	81,5 нг/мл

НЧШ – низкочастотный шум, ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия предстательной железы, РЯ – рак яичника, ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

сравнению пациентами с ХНБ и здоровыми донорами, причем содержание нмвкДНК у больных ХНБ и здоровых доноров не различалось достоверно. Были обследованы также родственники первой линии пациентов ХОБЛ и ХНБ; содержание нмвкДНК у них не различалось значимо и не отличалось от содержания у здоровых доноров. У больных ХОБЛ в возрасте 60–80 лет по сравнению с больными ХОБЛ 45–59 лет наблюдалась тенденция к увеличению содержания нмвкДНК. Возрастные увеличения уровня вкДНК отмечены другими авторами [11]. Если обострение ХОБЛ характеризуется усилением апоптоза в легочной ткани, то при ремиссии могут происходить восстановительные процессы в легочной ткани, когда процессы регенерации преобладают над процессами апоптоза [3]. Снижение уровня вкДНК у больных ХОБЛ в ремиссии сопровождается снижением уровня нейтрофилов и соответствует современным представлениям о происхождении значительной ее части из нейтрофилов в результате нектоза в ответ на провоспалительные агенты [13]. ХОБЛ сегодня рассматривается как предраковое заболевание [3], определение вкДНК можно использовать при наблюдении за больными ХОБЛ с целью ранней диагностики рака легкого.

Исследование внеклеточной ДНК у больных с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК)

ОНМК характеризовались повышением содержания нмвкДНК в течение 3 суток после остро-

го периода. В случае геморрагического инсульта максимальное увеличение содержания нмвкДНК в плазме крови отмечено через 3 ч после начала болезни, а в случае ишемического — через 24 ч. НмвкДНК в том же количестве была обнаружена в СМЖ больных с ишемией. Полученные результаты обосновывают возможность использования определения нмвкДНК для дифференциальной диагностики ОНМК по ишемическому или геморрагическому типу на ранних стадиях заболевания, а также подтверждают роль апоптоза в развитии инсультов и могут служить показателем тяжести повреждения головного мозга, в том числе при развитии опухолей головного мозга [4].

Результаты проведенных доклинических и клинических исследований суммированы в табл. 1.

Заключение

Уровень вкДНК отражает процессы апоптоза в организме. В проведенных экспериментальных и клинических исследованиях выявлены изменения содержания вкДНК в плазме крови при различных формах патологии. Канцерогенные воздействия, ионизирующее излучение и НЧШ, вызывают увеличение содержания вкДНК в результате повреждения клеток. Введение крысам перед облучением комбинации антиканцерогенных веществ, витаминов С и Е повышает уровень вкДНК; данный проапоптотический эффект витаминов объясняет их радиопротекторное действие в результате гибели поврежденных клеток. У крыс с трансплантированным РЯ уровень вкДНК снижается, что гово-

рит о торможении апоптоза при прогрессировании опухоли. При индукции ДГПЖ тестостероном у молодых крыс уровень вкДНК не меняется, тогда как у старых значительно увеличивается, что говорит об усилении процессов апоптоза с возрастом и при развитии ДГПЖ. У пациентов с ХОБЛ в период ремиссии содержание вкДНК снижается, что говорит об уменьшении гибели клеток в легких и ослаблении воспалительного процесса. У больных с ОНМК содержание вкДНК увеличено в течение 3 сут. после острого периода, причем динамика уровней вкДНК у больных с ишемическим и геморрагическим инсультом разная, что может использоваться для оценки тяжести повреждения головного мозга. Определение вкДНК в плазме крови может быть использовано для количественной оценки действия канцерогенов, в комплексной диагностике предраковых заболеваний, их прогрессирования и развития злокачественных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беспалов В.Г., Кужанов А.А., Майдин М.А. и др. Лекарственная терапия доброкачественной гиперплазии и химиопрофилактика рака предстательной железы // Вопросы онкологии. — 2015. — Т. 60. — № 5. — С. 804-811.
2. Васильева И.Н., Беспалов В.Г. Роль внеклеточной ДНК в возникновении и развитии злокачественных опухолей и возможности ее использования в диагностике и лечении онкологических заболеваний // Вопросы онкологии. — 2013. — Т. 59. — № 6. — С. 673-681.
3. Васильева И.Н., Беспалов В.Г. Низкомолекулярная ДНК плазмы крови у больных хронической обструктивной болезнью легких // Терапевтический архив. — 2017. — Т. 86. — № 3. — С. 24-28.
4. Васильева И.Н., Вознюк И.А., Беспалов В.Г. Содержание низкомолекулярной ДНК в плазме крови и спинномозговой жидкости больных с острым нарушением мозгового кровообращения // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2015. — Т. 9. — № 2. — С. 50-53.
5. Васильева И.Н., Зинкин В.Н. Значение низкомолекулярной ДНК плазмы крови в диагностике патологических процессов различного генеза // Биомедицинская химия. — 2013. — Т. 59. — вып. 3. — С. 358-373.
6. Васильева И.Н., Подгорная О.И., Беспалов В.Г. Нуклеосомная фракция внеклеточной ДНК как показатель апоптоза // Цитология. — 2015. — Т. 57. — № 2. — С. 87-94.
7. Зинкин В.Н., Васильева И.Н., Вознюк И.А. Определение внеклеточной низкомолекулярной ДНК в крови как диагностический метод для клинических и экспериментальных исследований // Авиакосмическая и экологическая медицина. — 2011. — Т. 45. — № 5. — С. 47-51.
8. Bespalov V.G., Kireeva G.S., Belyaeva O.A. et al. Experimental study of antitumor activity and effects on leukocyte count of intraperitoneal administration and hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion (HIPEC) with diiodoacetic acid in a rat model of ovarian cancer // J. Chemotherapy. — 2016. — Vol. 28. — P. 203-209.
9. Gonzaga A.C.R., Campolina-Silva G.H., Werneck-Gomes H. et al. Profile of cell proliferation and apoptosis activated by the intrinsic and extrinsic pathways in the prostate of aging rats // Prostate. — 2017. — Vol. 77. — P. 937-948.
10. Holdenrieder S., Stiber P. Clinical use of circulating nucleosomes // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. — 2009. — Vol. 46. — P. 1-24.
11. Jylhävä J., Nevalainen T., Marttila S. et al. Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty // Aging Cell. — 2013. — Vol. 12. — P. 388-397.
12. Mittra I., Khare N.K., Raghuram G.V. et al. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes // J. Biosci. — 2015. — Vol. 40. — № 1. — P. 91-111.
13. Thierry A.R., Messaoudi S.El., Gahan P.B. et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology // Cancer Metastasis Rev. — 2016. — Vol. 35. — P. 347-376.
14. Snyder M.W., Kircher M., Hill A.J. et al. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin // Cell. — 2016. — Vol. 164, N.1-2. — P. 57-68.
15. Underhill H.R., Kitzman J.O., Hellwig S. et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA // PLoS Genet. — 2016. — Vol. 12, N.7. — e1006162.
16. Vasilyeva I., Bespalov V., Baranova A. Radioprotective combination of α -tocopherol and ascorbic acid promotes apoptosis that is evident by release of low-molecular weight DNA fragments into circulation // Intern. J. Radiat. Biol. — 2015. — Vol. 91. — P. 872-877.
17. Vasilyeva I.N., Bespalov V.G., Semenov A.L. et al. The effects of low-frequency noise on rats: evidence of chromosomal aberrations in the bone marrow cells and release of low-molecular-weight DNA in the blood plasma // Noise Health. — 2017. — Vol. 19. — P. 79-83.

Поступила в редакцию 15.02.2018 г.

I.N. Vasilyeva¹, V.G. Bespalov^{1,2}

Preclinical and clinical study of extracellular DNA in cancer and other diseases associated with apoptosis disorder

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology
²ITMO University
 St. Petersburg

Oncological diseases at all stages of carcinogenesis are accompanied by violation of apoptosis processes. Drug and radiotherapy activates the apoptosis of tumor cells. This study presents the results of extracellular DNA changes after exposure to ionizing radiation and low-frequency noise are presented, administration of vitamins; in animals with benign prostatic hyperplasia, with ovarian cancer; in clinical studies in patients with chronic obstructive pulmonary disease, and in acute disorders of cerebral circulation. The possibilities of determination of extracellular DNA for the evaluation of the action of carcinogens, the complex diagnosis of precancerous diseases, the progression of precancerous diseases and malignant tumors are considered.

Key words: extracellular DNA, nucleosomes, apoptosis, precancerous diseases, pathology