

УДК 577.323

УРОВНИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ДНК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ РАЗНОГО ПОЛА И ВОЗРАСТА

© 2021 г. И.Ю. Митрошина*, Н.П. Сирота*, В.Н. Прокофьев**, Е.А. Кузнецова*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Институтская ул., 3

**Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, 344090, Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1

E-mail: kuzglu@rambler.ru

Поступила в редакцию 25.11.2020 г.

После доработки 25.11.2020 г.

Принята к публикации 11.12.2020 г.

Изучали уровни внеклеточных ядерной и митохондриальной ДНК сыворотки крови и повреждений ДНК лейкоцитов у здоровых доноров разного пола и возраста. Показано, что базовый уровень поврежденных ДНК лейкоцитов и уровни ДНК сыворотки сильно варьируют у разных доноров. Базовый уровень повреждений ДНК лейкоцитов не был ассоциирован с наличием хронических заболеваний или проф. вредности у пожилых доноров. Обнаружили, что концентрации внеклеточных ДНК в целом выше у мужчин, чем у женщин. Наблюдается тенденция увеличения определяемого по ΔC_t относительного количества копий митохондриальной ДНК у женщин по сравнению с мужчинами; у пожилых индивидов оно существенно варьирует у обоих полов, возможно, вследствие возрастных физиологических изменений. Необходимо учитывать пол и возраст пациентов при использовании такого показателя, как уровень внеклеточных ДНК сыворотки крови для диагностики и мониторинга.

Ключевые слова: доноры разного пола и возраста, внеклеточная ДНК сыворотки крови, %TDNA, Comet assay, митохондриальная ДНК.

DOI: 10.31857/S0006302921020186

Поиск чувствительных и малоинвазивных биомаркеров, позволяющих выявить патологические состояния организма, в первую очередь — сердечно-сосудистые, инфекционные и онкологические заболевания, в настоящее время остается актуальным. Ранее в качестве одного из таких биомаркеров предлагалось использовать внеклеточную ДНК (вкДНК), которую можно сравнительно легко выделить из биологических жидкостей организма, например крови [1–3]. Считается, что вкДНК — это фрагменты ядерного (ядДНК) и митохондриального (мтДНК) геномов, попадающие в кровоток в результате разрушения клеток (апоптоз, некроз) или активной секреции ДНК во внеклеточное пространство [1, 4–7]. У здоровых людей концентрация циркулирующей вкДНК низкая, так как большинство нежизнеспособных клеток эффективно удаляются из кровообращения

фагоцитами [1, 2, 5]. У онкологических больных регистрировались повышенные уровни вкДНК, что, как правило, связывали с развитием опухоли [6, 8–10], среднее количество вкДНК плазмы варьировало от менее 10 нг/мл до более чем 1500 нг/мл [2]. Повышение уровня вкДНК наблюдали и у перенесших инфаркт миокарда, физическую травму, либо воспаление [1, 5]. Что касается состава выборки, то в большинстве случаев результаты исследований уровня вкДНК были получены на смешанных группах мужчин и женщин [11–15], что не позволяет выявить различия в ее концентрации в зависимости от таких параметров, как возраст и пол. Однако для практических целей необходимо знать, как изменяется концентрация вкДНК в сыворотке/плазме крови у представителей разных по возрасту и различающихся по полу групп доноров.

Известно, что у здоровых доноров источником основного количества вкДНК являются ядродержащие клетки крови [5]. Обнаружено, что уровень повреждений ДНК лейкоцитов периферической крови, определяемый методом «коме-

Сокращения: %TDNA — процент ДНК в хвосте кометы (per cent of DNA in a comet tail), вкДНК — внеклеточная ДНК, яДНК — ядерная ДНК, мтДНК — митохондриальная ДНК, ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

та-тест» (Comet assay), различался у здоровых доноров [16]. В норме уровень повреждений ДНК клеток обусловлен как функционированием ДНК, так и процессами репарации, поскольку ДНК постоянно подвергается спонтанной тепловой и гидролитической деградации, окислению и метилированию [17]. Показано, что по сравнению со здоровыми донорами у пациентов с диабетом обоих типов, ишемической болезнью сердца, ожирением, рядом онкологических заболеваний регистрировалось увеличение уровня повреждений ДНК лейкоцитов [18–23], что, возможно, вносило вклад в уровень вкДНК. В настоящее время метод «комета-тест» используется, как правило, в токсикологических исследованиях для выявления одно- и двухнитевых разрывов и щелочеллабильных (апуриновых/апириимидиновых) сайтов в ДНК индивидуальных клеток. Однако предпринимаются попытки использовать уровень повреждений ДНК клеток для мониторинговых исследований [24]. Как соотносятся показатели уровня повреждений ДНК ядродержащих клеток крови и концентрации вкДНК сыворотки/плазмы крови у человека — не известно. С другой стороны, несмотря на то что такой показатель, как количество вкДНК, не является строго специфичным, он может быть дополнительной характеристикой патологического процесса в комбинации с другими маркерами [1].

В настоящей работе мы исследовали кровь только здоровых доноров из разных возрастных групп; у пожилых доноров, имеющих хронические заболевания, мы оценивали также уровни повреждений ДНК лейкоцитов крови. Из-за специфичности митохондриального генома митохондрии являются чувствительной мишенью к воздействию различных повреждающих факторов [25]. Поскольку вклад в общий уровень вкДНК вносят яДНК и мтДНК, их уровни мы оценивали отдельно.

Целью настоящей работы было: выявить, как соотносится уровень суммарной вкДНК (ядерной и митохондриальной) и мтДНК сыворотки крови с возрастом и полом у здоровых доноров; как соотносится уровни повреждений ДНК с наличием хронических заболеваний у пожилых доноров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы аликвоты венозной крови условно здоровых доноров разного пола и возраста, проходивших плановое обследование при соблюдении процедуры оформления письменного согласия. Условно здоровыми считались доноры, не имеющие на момент забора крови инфекционных или обострения хронических заболеваний. Первую группу (группа 1, $n = 30$) составили мужчины и женщины, средний

возраст которых был 65 лет (48–78 лет). Вторая группа (группа 2, $n = 20$) состояла из доноров, средний возраст которых был 26 лет (20–30 лет). Венозная кровь была собрана в пробирки, обработанные $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$. 500 мкл венозной крови центрифугировали при 400 g в течение 20 мин. Сыворотка была отобрана, перенесена в отдельную пробирку и заморожена при -20°C . Выделение вкДНК проводили после размораживания сыворотки по стандартной методике: обработка протеиназой K, фенольно-хлороформная экстракция с последующим осаждением двойным объемом этанола с ацетатом натрия до конечной концентрации 0.2 M.

Количественную оценку экстрагированной двуцепочечной ДНК выполняли с помощью набора Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit на приборе Qubit™ fluorometer (Invitrogen Corp., США). Оценку достоверности различий по уровню концентрации ДНК сыворотки крови осуществляли на основании U -критерия Уилкоксона (Манна-Уитни) ($p = 0.05$).

ВкДНК крови доноров использовали в качестве матрицы при постановке ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, США) в Центре коллективного пользования ИТЭБ РАН. Праймеры для амплификации фрагментов генов ДНК человека: β -actin — F 5'-GCACCA-CACCTTCTACAATGA-3' R 5'-GTCATCT-TCTCGCGGTTGGC-3'; ND1 — F 5'-CCCTA-AAACCCGCCACATCT-3', R 5'-GAGCGATG-GTGAGAGCTAAGGT-3'. Реакционная смесь: 1× буфер SYBR® Green PCR Master Mix, 250 нМ праймеров, 4 нг матричной ДНК. Условия ПЦР: 50°C , 2 мин — 1 цикл; 95°C , 10 мин — 1 цикл; 95°C , 15 с, 60°C , 1 мин — 40 циклов.

ΔCt рассчитывали по формуле $\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{ref}}$, где Ct_{target} — значения Ct , полученные в ходе ПЦР-РВ для митохондриального гена ND1, Ct_{ref} — значения Ct , полученные в ходе ПЦР-РВ для ядерного гена β -actin. Оценку достоверности различий по значениям Ct осуществляли на основании U -критерия Уилкоксона (Манна-Уитни) ($p = 0.05$).

Расчет эффективности реакции ПЦР-РВ осуществляли по формуле $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$, рекомендованной производителем. При построении графика зависимости логарифма концентрации продукта амплификации и значения Ct наблюдалась линейная зависимость. Коэффициенты наклона (slope) для ND1 составили -3.4 , для β -actin — 3.6 , что соответствует 96 и 90% эффективности соответственно.

Определение относительного количества мтДНК осуществлялось сравнительным методом $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct$ метод) по формуле $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$.

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{test sample}} - \Delta Ct_{\text{calib. sample}}$, где $\Delta Ct_{\text{test sample}}$ — значения ΔCt , полученные при обработке результатов в группах молодых женщин и обеих группах пожилых доноров; *calibrator sample* — значения ΔCt , полученные при обработке результатов в группе молодых мужчин. Данное значение ΔCt было взято в качестве калибратора, поскольку в молодом возрасте наблюдается более высокая по сравнению с пожилыми суммарная ферментативная активность, а мужской пол характеризуется большей стабильностью гормонального фона. Значения относительного количества мтДНК в исследуемых группах выражались в процентах относительно такового в группе молодых доноров-мужчин, взятого за 100%. При расчете групповых ΔCt значения Ct_{target} и Ct_{ref} были взяты как средние арифметические по каждой исследуемой группе.

Для определения уровня повреждений ДНК лейкоцитов крови использовали щелочную версию метода «комета-тест» [26], эксперименты проводили, как описано в работе [16]. Для приготовления слайдов использовали цельную кровь, разведенную в шесть раз фосфатно-солевым буфером, pH 7.2, содержащим 0.001 моль/л ЭДТА. Обработку изображений выполняли с помощью специализированного программного обеспечения, где реализованы алгоритмы расчета стандартных параметров комет [27]. Для оценки уровня повреждений ДНК использовали параметр — долю ДНК в хвосте кометы в процентах (per cent of DNA in a comet tail — %TDNA). Для каждой экспериментальной единицы анализировали по три слайда, не менее чем по 50 клеток на слайд, согласно работе [28]. Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p < 0.05$).

В работе использовали фенол, хлороформ, ацетат натрия, агарозу, акриламид, азотнокислое серебро (ООО «Компания Хеликон», Россия). Флуоресцентный краситель SybrGreen10000X и реакционная смесь 2X SYBR® Green PCR Master Mix были приобретены у ООО «Биотех-Индустрия» (Россия) и Applied Biosystem (Великобритания) соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни повреждений ДНК лейкоцитов и содержание вкДНК сыворотки. Известно, что у здоровых доноров источником основного количества вкДНК являются ядросодержащие клетки крови [5]. Уровни повреждений ДНК лейкоцитов крови различаются у разных доноров [16]. В наших условиях эксперимента средние значения %TDNA у здоровых доноров в основном не превышали 10% [16], что позволяет считать этот уровень базальным (контрольным). Поскольку в пожи-

лом возрасте люди, как правило, испытывают последствия работы во вредных условиях и наличия ряда заболеваний, то в этой связи исследовали уровни повреждений ДНК лейкоцитов крови у 60–70-летних доноров, имеющих хронические заболевания вне фазы обострения или без них (табл. 1). Из табл. 1 видно, что наблюдаются существенные различия в базовых уровнях повреждений ДНК лейкоцитов венозной крови индивидуумов. %TDNA у доноров № 25 и № 30 был несколько выше контрольного. При этом значение %TDNA не было ассоциировано с наличием хронических заболеваний или проф. вредности, по-видимому, вследствие успешно применяемой терапии. Очевидно, что разница в уровнях %TDNA индивидуумов обусловлена их генетическими и эпигенетическими особенностями.

Из сыворотки этих проб крови и проб крови других доноров разного возраста была выделена ДНК. Обнаружили, что количество вкДНК, так же как и %TDNA, сильно варьирует у разных доноров. Поэтому мы предприняли попытку разграничения исследуемой популяции на четыре подгруппы по половому и возрастному признакам (табл. 2). Из табл. 2 видно, что концентрации суммарной ядерной и митохондриальной вкДНК в целом выше у мужчин по сравнению с женщинами, что согласуется с литературными данными [12, 13]. Обнаружено, что у доноров одного и того же пола концентрации вкДНК достоверно различались по *U*-критерию Манна–Уитни ($p \leq 0.05$) в зависимости от возраста: у молодых женщин она ниже, чем у пожилых; у молодых мужчин она выше, чем у пожилых. Обнаружены достоверные гендерные отличия в концентрации вкДНК для групп молодых доноров и отсутствие таковых в группах пожилых доноров. Отсутствие гендерных различий у пожилых доноров, возможно, связано с изменением клеточного метаболизма в пожилом возрасте. Так, показано, что с увеличением возраста доноров наблюдается тенденция к уменьшению величины %TDNA у лейкоцитов капиллярной и венозной крови [16]. Из изложенного видно, что в случае использования уровня вкДНК в качестве дополнительного средства в диагностике различных патологий, необходимо учитывать пол пациентов, особенно у доноров молодого возраста.

Уровни мтДНК сыворотки по результатам ПЦР-РВ. В образцах вкДНК сыворотки определяли уровни яДНК и мтДНК по *Ct*, полученные в ходе ПЦР-РВ для митохондриального гена ND1 и ядерного гена β -actin. В табл. 3 представлены значения *Ct*, условно соответствующие количеству копий ядерной и митохондриальной ДНК в исследуемом образце. По разнице между *Ct* для гена β -actin и *Ct* для гена ND1, иначе — ΔCt , можно судить об уровне мтДНК. Поскольку значения *Ct* находятся в обратной зависимости от

Таблица 1. Уровень повреждений ДНК лейкоцитов венозной крови мужчин и женщин 60–70 лет, имеющих хронические заболевания

№	Пол	Возраст, годы	Наличие хронических заболеваний	Профессиональная вредность	Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	Моноциты, $10^9/\text{л}$	Гранулоциты, $10^9/\text{л}$	%ТДНК
1	ж	65	Распространенный ОХ	—	2.5	0.4	3.8	3.2 ± 0.6
2	ж	68	ГБ	—	1.7	0.2	3.2	2.8 ± 0.6
3	ж	62	Малярия в детстве	—	2.1	0.4	3.7	7.5 ± 1.0
4	м	60	ГБ	Химические реактивы	1.9	0.3	2.2	3.8 ± 1.7
5	ж	61	Ишемическая болезнь сердца, ГБ	Кислоты, щелочи	2.1	0.2	4.9	3.9 ± 0.6
6	м	60	ГБ	Вибрация, шум	1.8	0.3	1.5	8.9 ± 0.7
7	ж	61	Хронический геморрой	Вибрация, шум	2.9	0.3	2.9	5.3 ± 0.7
8	ж	65	Хронический холецистит	—	1.6	0.3	3.3	9.5 ± 0.9
9	ж	62	Хронический холецистит	Химические реактивы	3	0.3	5.8	4.3 ± 0.6
10	ж	67	ГБ	Кислоты, щелочи	3	0.5	4.5	9.4 ± 0.8
11	ж	64	ГБ	—	1.9	0.3	1.9	6.1 ± 1.1
12	м	69	Мочекаменная болезнь	—	2.5	0.4	4.6	6.8 ± 0.7
13	ж	68	Варикоз	—	1.8	0.4	3.9	3.9 ± 0.6
14	ж	67	ГБ	—	1.4	0.2	2.2	3.3 ± 0.7
15	ж	67	Ревматоидный артрит	—	2	0.3	2.6	2.4 ± 0.4
16	ж	66	ГБ, ОХ	—	2	0.2	1.2	4.8 ± 0.8
17	ж	61	ГБ, ОХ	—	2.5	0.4	4.2	4.5 ± 1.0
18	ж	65	Хронический холостопанкреатит	Органические растворители	3.4	0.5	1.6	10.9 ± 1.0
19	ж	67	Ревматизм	—	2	0.2	2.2	6.3 ± 0.8
20	м	68	—	—	1	0.2	3.5	6.5 ± 1.2
21	м	60	—	—	1.9	0.2	2.3	9.7 ± 1.5
22	ж	64	—	—	1.9	0.2	2.7	8.7 ± 1.0
23	ж	67	—	—	2.3	0.4	4.2	11 ± 1.3
24	м	64	—	Тетраэтилсвинец	2.9	0.6	6.5	8.3 ± 1.5
25	м	70	—	Тетраэтилсвинец	2.7	0.3	4.9	16.5 ± 1.8
26	ж	70	—	—	2.4	0.4	2.5	3.0 ± 0.6
27	ж	67	—	—	2.6	0.4	4.1	5.1 ± 1.0
28	м	68	—	Тетраэтилсвинец	2.4	0.6	3.6	5.3 ± 0.7
29	ж	60	—	—	3.4	0.5	3.8	2.6 ± 0.6
30	ж	65	—	—	3.2	0.4	4.0	13.4 ± 2.2

Примечание. ОХ – остеохондроз, ГБ – гипертоническая болезнь. Данные по %ТДНК приведены в виде $M \pm m$.

Таблица 2. Концентрация суммарной вкДНК в сыворотке крови доноров разного пола и возраста

Доноры	Возраст, годы	Количество доноров	Концентрация вкДНК, мкг/мл
Мужчины	20–32	10	1.3 ± 0.3 (0.7 – 1.8)
	60–74	14	0.6 ± 0.4 (0.25 – 1.5)
Женщины	20–30	10	0.1 ± 0.1 (0.05 – 0.4)
	71–78	23	0.4 ± 0.3 (0.1 – 1.0)

Примечание. Данные по концентрации вкДНК приведены в виде $M \pm SD$.

Таблица 3. Уровни яДНК и мтДНК сыворотки крови доноров

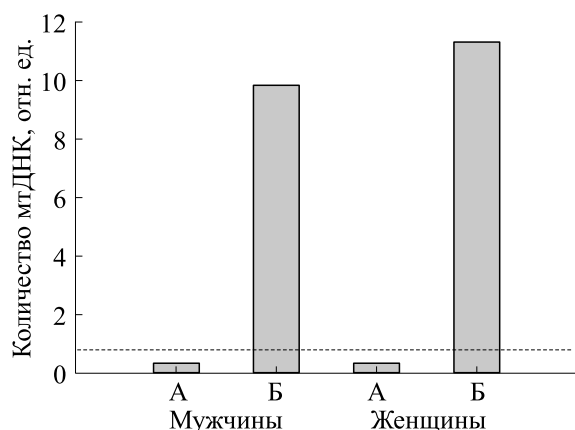
Группы доноров	Подгруппы	Ct ND1	Ct β -actin	ΔCt	Количество доноров
Молодые мужчины (20–30 лет)	–	17.3 ± 1.1	23.8 ± 0.9	6.5 ± 1.6	10
Молодые женщины (20–30 лет)	–	15.3 ± 1.5*	25.4 ± 1.6*	10.1 ± 2.0*	10
Пожилые мужчины (48–74 лет)	А	18.0 ± 1.8	23.0 ± 1.3	5.0 ± 0.7*	8
	Б	17.3 ± 2.1	27.1 ± 2.7*	9.8 ± 1.8*	15
Пожилые женщины (53–78 лет)	А	18.6 ± 1.6	23.4 ± 1.3	4.8 ± 1.0*	7
	Б	15.0 ± 2.0*	25.0 ± 2.3	10.0 ± 2.2*	16

Примечание. Данные приведены в виде $M \pm SD$. * – Достоверные отличия от группы молодых мужчин по U -критерию Манна–Уитни ($p \leq 0.05$).

количества копий изучаемых фрагментов ДНК, то видно, что количество копий мтДНК в группе молодых женщин превышает таковое в мужской группе, и эти различия достоверны. По литературным данным, в экспериментах на цельной крови пожилых доноров было показано, что содержание мтДНК значительно выше у женщин по сравнению с мужчинами, и эти различия были связаны не только с полом, но и с возрастом; содержание мтДНК незначительно увеличилось до пятого десятилетия жизни и уменьшилось у более пожилых индивидов и у женщин в постменопаузе [29, 30]. Следует отметить, что в этих экспериментах значительный вклад в определяемый уровень вкДНК вносили клетки крови. Тем не менее можно предположить, что тенденция более высокого уровня мтДНК крови у женщин по сравнению с мужчинами сохраняется и в уровнях мтДНК из сыворотки крови, что видно из данных, полученных на молодых донорах (табл. 3).

Достоверных гендерных отличий в группах пожилых доноров выявлено не было. Однако было обнаружено очевидное разделение, как мужчин,

так и женщин, на две подгруппы по значению ΔCt со средними значениями примерно 5 и 10 (подгруппы А и Б соответственно). При расчете относительного количества мтДНК по методу $\Delta\Delta Ct$ эти различия сохранялись (рисунок). Видно, что уровень мтДНК в подгруппах Б у мужчин и женщин существенно выше, чем в подгруппах А. Возможно, что это разделение связано с физиологическими изменениями у доноров, ассоциированными с возрастом. Из литературы известно, что содержание мтДНК падало с ростом количества лейкоцитов и возрастало при увеличении уровня тромбоцитов, что было связано и с гендерными различиями. У женщин по сравнению с мужчинами наблюдали большее количество тромбоцитов и лейкоцитов, что, по мнению авторов, отражалось на уровне мтДНК [29]. Возможно, что обнаруженное нами разделение пожилых доноров по уровням мтДНК ассоциировано с изменениями соотношений лейкоцитов и тромбоцитов в крови, а также и с различным уровнем повреждений ДНК лейкоцитов (табл. 1 и 2). Кроме того, как известно из литературных данных, на уровень вне-



Относительное количество мтДНК в сыворотке пожилых доноров подгруппы А ($\Delta Ct = 4.8-5.0$) и подгруппы Б ($\Delta Ct = 9.8-10$). Горизонтальная линия – относительное количество мтДНК в группе молодых мужчин..

клеточных ДНК оказывала влияние и гормональная регуляция: было показано, что содержание мтДНК в крови женщин снижалось при потреблении эстропрогестагена [29]. Поскольку с увеличением возраста доноров в целом наблюдали уменьшение уровня мтДНК [29, 30], то возможно также, что тенденция к понижению уровня вкДНК в крови связана и с уменьшением базового уровня повреждений ДНК лейкоцитов крови с возрастом, что было показано нами ранее [16]. Следует отметить, что в этой работе представлены средние значения уровня мтДНК по группам, мы не соотносили уровни вкДНК с %TDNA для отдельных доноров, что было бы интересно для выявления индивидуальных особенностей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что базовый уровень повреждений ДНК лейкоцитов крови, как и уровни вкДНК сыворотки, сильно варьируют у разных доноров. Концентрации вкДНК в целом выше у мужчин по сравнению с женщинами. Относительное количество копий мтДНК сыворотки, определяемые по ΔCt , в целом больше у женщин, чем у мужчин. Уровни мтДНК у пожилых индивидов могут сильно различаться, и эти различия наблюдаются у обоих полов. Необходимо учитывать пол и возраст пациентов при использовании такого показателя, как уровень внеклеточных ДНК сыворотки крови для диагностики и мониторинга.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены в рамках базовой части государственного задания Министерства образования и науки НИР №1878 «Разработка

фундаментальных аспектов молекулярной диагностики и митохондриальной фармакологии».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Kohler, Z. Barekati, R. Radpour, and X. Y. Zhong, *Anticancer Res.* **31**, 2623 (2011)
2. Y. I. Elshimali, H. Khaddour, M. Sarkissyan, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **14** (9), 18925 (2013). DOI: 10.3390/ijms140918925
3. D. Chandrananda, N. P. Thorne, M. Bahlo, *BMC Med. Genomics.* **8**, 29 (2015). DOI: 10.1186/s12920-015-0107-z
4. R. R. Zachariah, S. Schmid, N. Buerki, et al., *Obstet. Gynecol.* **112** (4), 843 (2008). DOI: 10.1097/AOG.0b013e3181867bc0
5. С. Н. Тамкович, В. В. Власов и П. П. Лактионов *Молекуляр. биология* **42** (1), 12 (2008). DOI: 10.1007/s11008-008-1002-x
6. M. Yu, *Mitochondrial DNA* **23** (5), 329 (2012). DOI: 10.3109/19401736.2012.696625
7. S. Rapisuwon, E. E. Vietsch, and A. Wellstein, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **14**, 211 (2016). DOI: 10.1016/j.csbj.2016.05.004
8. K.-A. Yoon, S. Park, S. H. Lee, et al., *J. Mol. Diagn.* **11** (3), 182 (2009). DOI: 10.2353/jmoldx.2009.080098
9. W. Chen, F. Cai, B. Zhang, and X. Y. Zhong, *Clin. Chem. Lab. Med.* **50** (2), 261 (2011). DOI: 10.1515/cclm.2011.773
10. A. Szepechinski, J. Chorostowska-Wynimko, and R. Struniawski, et al., *Br. J. Cancer* **113** (3), 476 (2015). DOI: 10.1038/bjc.2015.225
11. G. Sozzi, D. Conte, L. Mariani, et al., *Cancer Res.* **61** (12), 4675 (2001).
12. S. N. Tamkovich, O. E. Bryzgunova, E. Yu. Rykova, et al., *Clin. Chem.* **51** (7), 1317 (2005). DOI: 10.1373/clinchem.2004.045062
13. X. Y. Zhong, S. Hahn, V. Kiefer, and W. Holzgreve, *Ann. Hematol.* **86** (2), 139 (2007). DOI: 10.1007/s00277-006-0182-5
14. D. Czeiger, G. Shaked, H. Eini, et al., *Amer. Soc Clin. Pathol.* **135** (2), 264 (2011). DOI: 10.1309/AJCP4RK21HVKTTZV

15. J. Jylhava, T. Kotipelto, A. Raitala, et al., *Mech Ageing Develop.* **132** (1–2), 20 (2011). DOI: 10.1016/j.mad.2010.11.001
16. Н. П. Сирота и Е. А. Кузнецова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **145** (2), 154 (2008).
17. E. I. Azzam, J. P. Jay-Gerin, and D. Pain, *Cancer Lett.* **327**, 48 (2012) DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.012
18. M. P. A. Hannon-Fletcher, M. J. O’Kane, K. W. Moles, et al., *Mutat. Res.* **460** (1), 53 (2000). DOI: 10.1016/s0921-8777(00)00013-6
19. M. Harangi, E. Remenyik, I. Seres, et al., *Mutat. Res.* **513** (1–2), 17 (2002). DOI: 10.1016/s1383-5718(01)00285-6
20. P. Sanchez, R. Penarroja, F. Gallegos, et al., *Arch. Med. Res.* **35** (6), 480 (2004). DOI: 10.1016/j.arcmed.2004.11.008
21. J. Blasiak, M. Arabski, and R. Krupa, *Mutat. Res.* **554** (1–2), 297 (2004). DOI: 10.1016/j.mrfm-mm.2004.05.011
22. R. Demirbag, R. Yilmaz, A. Kocyigit, *Mutat. Res.* **570** (2), 197 (2005). DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.11.003
23. A. J. Sigurdson, M. Hauptmann, B. H. Alexander, et al., *Mutat. Res.* **586** (2), 173 (2005). DOI: 10.1016/j.mrgentox.2005.07.001
24. A. Collins, M. Milic, S. Bonassi, and M. Dusinska, *Mutat. Res.* **843**, 1 (2019). DOI: 10.1016/j.mrgentox.2019.06.002
25. W. Copeland and M. J. Longley, *DNA Repair (Amst.)* **19**, 190 (2014). DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.03.010
26. P. Møller, L. Knudsen, S. Loft, and H. Wallin, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **9** (10), 1005 (2000).
27. N. K. Chemeris, A. B. Gapeyev, N. P. Sirota, et al., *Mutat. Res.* **558**, 27 (2004). DOI: 10.1007/1-4020-4278-7_7
28. D. P. Lovell and T. Otori, *Mutagenesis* **23** (3), 171 (2008). DOI: 10.1093/mutage/gen015
29. J. Knez, E. Winckelmans, and M. Plusquin, *Am. J. Epidemiol.* **183** (2), 138 (2016). DOI: 10.1093/aje/kwv175
30. C.-Y. Xia, Y. Liu, H.-R. Yang, et al., *Chin. Med. J.* **130** (20), 2435 (2017). DOI: 10.4103/0366-6999.216395

Levels of Circulating DNA in Blood Serum and DNA Damage in Leukocytes of Healthy Donors of Different Gender and Age

I.Yu. Mitroshina*, N.P. Sirota*, V.N. Prokofiev**, and E.A. Kuznetsova*

* *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

** *Academy of Biology and Biotechnology named after D.I. Ivanovsky, Southern Federal University, prosp. Stachki 194/1, Rostov-on-Don, 344090 Russia*

We studied the levels of extracellular nuclear and mitochondrial DNA of blood serum and DNA damage in leukocytes of healthy donors of different sex and age groups. The baseline level of DNA damage in leukocytes and serum DNA levels have been shown to vary greatly among different donors. The baseline level of DNA damage in leukocytes was not associated with the presence of chronic diseases or an occupational health risk for elderly donors. It was found that extracellular DNA concentrations are generally higher in men than in women. There is a tendency towards an increase in the relative mitochondrial DNA copy number determined by ΔCt in women but not in men; the relative mtDNA copy number in elderly individuals varies significantly in both sexes, possibly due to age-related physiological changes. It is necessary to take into account the gender and age of patients when using an indicator such as the level of extracellular DNA of blood serum for diagnosis and monitoring.

Keywords: donors of different gender and age, extracellular DNA of blood serum, %TDNA, Comet assay, mitochondrial DNA