

## «ЧАСЫ СТАРЕНИЯ» НА ОСНОВЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК

© 2025 г. А. В. СЕРГЕЕВ<sup>1,2\*</sup>, О. В. КИСИЛЬ<sup>1,3</sup>, А. А. ЕРЁМИН<sup>1</sup>,  
А. С. ПЕТРОВ<sup>1</sup>, М. Э. ЗВЕРЕВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Химический факультет, Москва

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н. Ореховича, Москва

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков  
имени Г.Ф. Гаузе, Москва

I. Введение, II. Обоснование возможности создания «часов старения» на основе эпигенетического ландшафта и фрагмента внеклеточной ДНК, III. Фрагментомика вкДНК как биомаркер патологических состояний IV. Топология вкДНК, V. Метиллом вкДНК, VI. Потенциал секвенирования вкДНК на основе метода длинных прочтений единичных молекул для создания «часов старения», VII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

В 1988 году Baker и Sprott ввели концепцию «биомаркеров старения». Биомаркер старения – это измеримый параметр организма, который либо сам по себе, либо в составе некоторого многопараметрического анализа, при отсутствии заболевания, лучше предскажет функциональные возможности организма в позднем возрасте, чем хронологический возраст [1]. Биологические параметры для оценки возрастных изменений, можно разделить на две группы: (1) наследственно предопределенные генетическими полиморфизмами [2] и (2) приобретённые на клеточном и молекулярном уровнях из-за воздействия различных факторов. Последние, как правило, и определяют разницу между хронологическим и биологическим возрастом [3]. Эта разница возникает из-за индивидуальной для каждого человека скорости старения. Предполагается, что биологический возраст лучше хронологического предсказывает функциональные возможности организма и развитие хронических болезней.

---

*Список сокращений:* ФК – активные формы кислорода; вкДНК – внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; НК – нуклеиновые кислоты; ПЦР – полимеразная цепная реакция; экДНК – экстрахромосомная кольцевая дезоксирибонуклеиновая кислота; MSCs – мезенхимальные стволовые клетки; NGS – методы секвенирования нового поколения; ONT – нанопоровое секвенирование от Oxford Nanopore Technologies; SMRT – одномолекулярное секвенирование в реальном времени; 5mC – 5-метилцитозин; 5hmC – 5-гидроксиметилцитозин; 8-оксо-dG – 8-оксо-2'-дезоксигуанозин; 8-оксо-dA – 8-оксо-2'-дезоксаденозин.

---

Адрес для корреспонденции: avsergeev@belozersky.msu.ru

К клеточным и молекулярным биомаркерам относят: (i) длину теломер геномной ДНК лейкоцитов [4]; (ii) изменения в метаболоме [5]; (iii) протеомные данные (например, обогащение плазмы крови белками, связанными с воспалением, внеклеточным матриксом и клеточным старением [6], и степень гликозилирования иммуноглобулинов G [7]); (iv) эпигенетические модификации, а именно колебания уровней метилирования ДНК [8]; (v) транскриптомные предикторы (дифференциальная, зависящая от возраста экспрессия генов [9]). Все вышеперечисленные биомаркеры могут быть определены с помощью анализа крови.

Попытки понять причины разной скорости старения стимулировали использование омиксных (геномных, протеомных, метаболомных и т.д.) технологий для анализа биологических жидкостей и образцов тканей человека [10]. В свою очередь, генерация и накопление массивов данных молекулярных и физиологическими параметров и развитие искусственного интеллекта сделали возможным создание различных методов количественной оценки, расчета скорости старения [11]. Если биомаркеры старения отражают отдельные изменения в организме на молекулярном или клеточном уровне, то «часы», или калькулятор старения, определяют комплексное состояние организма [12]. Предложено множество «часов старения», описывающих разные аспекты старения, так, в работе [12] их обсуждается около 20. Однако, несмотря на их многообразие, в целом они все они имеют одну и ту же цель — представлять определенные критические аспекты биологического старения.

В представленном обзоре обсуждается возможность создания «часов старения», основанных на основе анализа распределения индивидуальных фрагментов генома внеклеточной ДНК (вкДНК) человека и эпигенетического ландшафта вкДНК.

## **II. ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ «ЧАСОВ СТАРЕНИЯ» НА ОСНОВЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛАНДШАФТА И ФРАГМЕНТОМА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК**

Внеклеточная ДНК (вкДНК) состоит из небольших фрагментов ДНК, свободно циркулирующих в кровотоке и присутствующих в выделениях организма (например, в моче, слезах, слюне и т.д.), куда она попадает непосредственно из клеток. Она может происходить из нормальных, раковых клеток или клеток плода во время беременности, а ее уровень может повышаться из-за болезней или травм [13]. ВкДНК — это продукт расщепления геномной ДНК, представленный короткими (70-200 пар оснований) и длинными (до 21 тыс. пар оснований) фрагментами. Разнообразие вкДНК в организме обеспечивается за счет механизмов активного высвобождения ДНК, а также фрагментации геномов при различных сценариях гибели клеток: апоптоза, некроза, пироптоза, аутофагии, нетоза, энуклеации эритробластов ДНК (Рис. 1) [14]. Активность процессов генерации вкДНК зависит от молекулярных изменений на уровне клетки (например, запрограммированная клеточная гибель), организма (например, воспаление) и внешнего воздействия на организм (например, травма). ВкДНК в крови подвергается дальнейшей деградации нуклеазами: среднее время жизни вкДНК в крови составляет от 15 минут до нескольких часов [15, 16]. Значит, можно предположить, что каждый образец вкДНК является «срезом» самой свежей информации о клеточных процессах во всем организме. Основные процессы выведения вкДНК из кровотока проходят в печени, почках и селезенке (Рис. 1) [18]. В работе Mitra и др. показано, что молекулы вкДНК могут

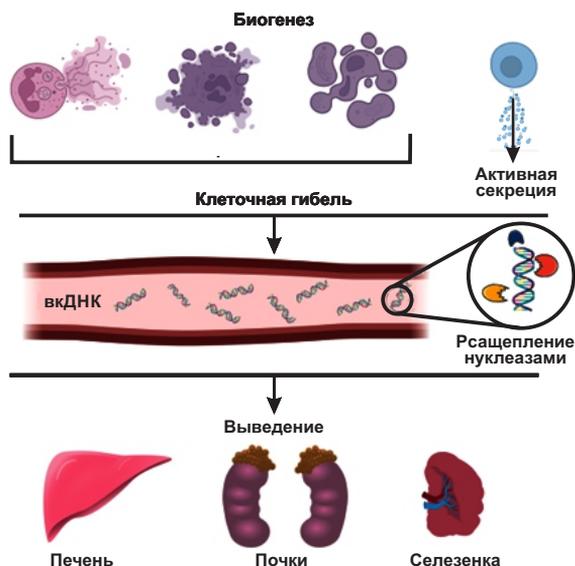


Рис. 1. Биогенез и пути выведения из организма внеклеточной ДНК. Данные взяты из работы [102].

участвовать в передаче информации между клетками [17]. Извлеченные из крови онкологических больных и здоровых добровольцев образцы вкДНК внутривенно вводили мышам. ВкДНК поглощалась клетками и локализовалась в ядрах в течение нескольких минут, а после включения в геном вызывала апоптотические реакции и разрывы ДНК, действуя, таким образом, как мобильный генетический элемент.

У здорового человека большая часть вкДНК в плазме происходит из клеток крови\*. Если же в каком-либо органе или ткани протекают патологические процессы, сопровождающейся гибелью клеток, то в кровоток поступает больше вкДНК из поврежденного органа или ткани. По сути, основная часть вкДНК – это клеточный мусор. Характеристики циркулирующей в крови вкДНК (распределение модифицированных оснований, размер фрагментов и топологическое состояние) варьируют в зависимости от состояния здоровья и факта наличия заболеваний. Известно, что вкДНК сохраняет эпигенетический ландшафт геномной ДНК клеток исходных органов происхождения [19]. Один и тот же участок генома в разных тканях может иметь различный статус метилирования ДНК. В связи с этим, исследования тканеспецифических профилей метилирования (метиломов) вкДНК могут помочь идентифицировать органы происхождения этих фрагментов нуклеиновых кислот и установить количественный вклад каждой ткани в итоговое распределение фрагментов суммарной вкДНК [20]. В нескольких исследованиях показана возможность обнаружения органоспецифичного и ассоциированного с опухолью метилирования ДНК из плазмы при фокусировании на признаках

\* вкДНК выделяется из плазмы, а не из цельной крови, потому что цельная кровь содержит интактные клетки, такие как лейкоциты, имеющие свою собственную ДНК. Выделение вкДНК из цельной крови привело бы к загрязнению образца геномной ДНК этих клеток.

одной ткани или органа [21, 22]. Аберрантное метилирование ДНК является перспективным биомаркером рака, поскольку известно, что оно возникает на ранних стадиях развития заболевания и ассоциировано с патологическими особенностями и течением заболевания у онкологических больных [23]. Существуют коммерческие наборы для выделения вкДНК из плазмы и последующей бисульфитной конверсии для анализа рисунков метилирования ДНК [24]. Определение профиля метилирования с использованием бисульфитной конверсии и последующим анализом методами секвенирования нового поколения (NGS) [25] позволяет определить тканевое происхождение вкДНК вне зависимости от того, что служит источником вкДНК – плазма крови [20] или моча [26]. В свою очередь информация о тканевом происхождении позволяет судить исследователям о скорости гибели определённых типов клеток. Показано, что сигнатуры 5-гидроксиметилцитозина вкДНК также могут использоваться как для определения типов опухолей, так и для отслеживания стадии опухоли при некоторых видах злокачественных образований [27].

Анализ количества и состава вкДНК является основой неинвазивной диагностики различных заболеваний, в том числе ассоциированных с возрастом, как то болезнь Альцгеймера [28] или диабет второго типа [29]. Анализ вкДНК из крови людей разных возрастных групп позволил зафиксировать локальные и глобальные изменения хроматина при старении человека: показана относительная потеря вкДНК с возрастом для сайтов начала и терминации транскрипции, 5' нетранслируемых областей генома, участков и ретротранспозонов L1HS и димерных элементов AluY [30]. Авторы отмечают большее сходство в профилях вкДНК, как глобально (компарменты), так и локально (например, сайты начала и окончания транскрипции), между молодыми и возрастными здоровыми людьми, в отличие от старых людей и нездоровых возрастных людей. Таким образом, исследование [30] демонстрирует возможность использования результат секвенирования циркулирующей вкДНК из плазмы человеческой крови не только как биомаркер возраста, но и как предиктор состояния здоровья. В работе 2024 года была проанализирована вкДНК из крови 35 человек для выявления закономерностей, связанных со старением [31]. Обнаружено около 2000 конкретных областей генома человека, где у пожилых людей были обнаружены значительные изменения метилирования, включая гипер- и гипометилирование. На основании полученных данных авторы создали модель метилирования ДНК, согласно которой статус метилирования некоторых CpG-сайтов коррелировал с хронологическим и биологическим возрастом. Таким образом, анализ циркулирующей вкДНК из плазмы крови человека методами секвенирования длинных прочтений, которые исключают стадии бисульфитной конверсии и ПЦР, а также позволяют исследовать рисунок метилирования на большей области генома одномоментно и на одной молекуле ДНК, позволяет создать эпигенетические «часы старения».

### **III. ФРАГМЕНТОМИКА вкДНК КАК БИОМАРКЕР ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ**

Известно, что плазма и сыворотка крови содержат фрагменты вкДНК, произошедшие из мертвых клеток (в среднем 5000 геномных эквивалентов/мл) [32]. ВкДНК человека получается путем фрагментации геномной ДНК с помощью ряда клеточных и внеклеточных нуклеаз, основные из которых - DNASE1L3, DFFB и DNASE1 [33]. Согласно существующей на сегодняшний день теории, в процессе апоптоза эндонуклеазы DFFB и DNASE1L3 расщепляют ДНК внутри клетки, а затем внеклеточные секретрируемые эндонуклеазы

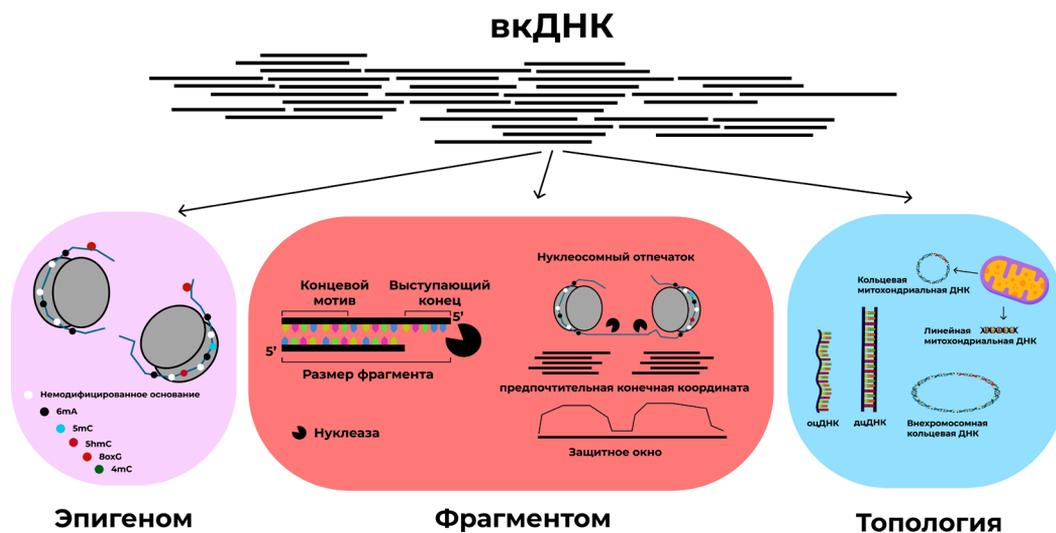


Рис. 2. Характеристики вкДНК, определяемые методом секвенирования единичных молекул на основе длинных прочтений.

Модифицированные основания: 5-метилцитозин (5mC), 5-гидроксиметилцитозин (5hmC), 6-метиладенин (6mA), 4-метилцитозин (4mC), 8-оксогуанин (8oxoG); фрагментом: длины фрагментов, координаты и мотивы концов; топология: одноцепочечные и двуцепочечные, линейные и кольцевые молекулы вкДНК. Данные взяты из работы [103].

DNASE1L3 и DNASE1 дополнительно фрагментируют вкДНК в плазме. При некрозе клетки во фрагментации участвует каспазозависимая ДНКаза CAD [34].

Процессы старения сопровождаются количественными и качественными изменениями фрагментов вкДНК. В работе [35] были охарактеризованы возрастные изменения в вкДНК. Исследуемая популяция состояла из 12 девяностолетних женщин и контрольной группы из 11 здоровых женщин в возрасте 22–37 лет. Концентрация вкДНК была значительно выше у девяностолетних людей по сравнению с контрольной группой. На качественном уровне у большинства девяностолетних зафиксировано появление низкомолекулярной вкДНК, тогда как в контрольной группе вкДНК была неповрежденной и высокомолекулярной. Этот факт подчеркивает важность анализа распределения длин фрагментов всего генома, а не только концевых участков (теломер).

Как правило, распределение длин фрагментов вкДНК имеет максимум в области 166 п.н., что соответствует длине нуклеосомной (защищенной одной нуклеосомой) ДНК в апоптотических клетках [36]. Помимо основного пика, в распределении длин вкДНК детектируется ряд побочных пиков в области более коротких фрагментов с периодичностью в 10 п.н. Это связано с доступностью вкДНК, всё еще связанной с нуклеосомами в крови, для дальнейшего гидролиза нуклеазами. Помимо длины фрагмента, вкДНК имеет такие характеристики, как мотивы концов, «зазубренные концы» и предпочтительные координаты концов (Рис. 2) [37]. Данные NGS о мотивах концов вкДНК из 410 биологических образцов были использованы для детекции опухолей прямой кишки и почек на ранней стадии [38].

Развитие методов секвенирования (переход от NGS к методам длинных прочтений) помогло охарактеризовать популяцию длинных фрагментов вкДНК, в некоторых случаях

достигающих нескольких десятков тысяч п.н. Расщепление вкДНК нуклеазами является неслучайным [37]. Мотивы 5'-концов длинных и коротких фрагментов различны: по мере удлинения фрагмента вероятность наличия 5'-концевых dA и dG возрастает, а dC и dT, наоборот, уменьшается. Эта объясняется различной специфичностью нуклеазы DFFB, производящей длинные фрагменты вкДНК, и нуклеаз DNASE1L3 и DNASE1, осуществляющих дальнейшую фрагментацию вкДНК в плазме крови [39].

Апоптотические клетки являются основным источником вкДНК у здоровых людей. Напротив, вкДНК у онкологических больных могут происходить из других источников, например, из некротических клеток и в результате аутофагии. Как следствие, размер фрагментов вкДНК у больных варьирует в более широких диапазонах [40]. Опухолевая вкДНК отличается от здоровой появлением побочных пиков на кратных значениях длин фрагментов, сдвинутым в короткую область максимумом [41]. Комбинированное определение концентрации и целостности плазменной вкДНК может улучшить диагностическую ценность при выявлении немелкоклеточного рака легкого [40]. Распределение длин фрагментов вкДНК зависит от того, из какой ткани высвобождается вкДНК [37]. Расположение нуклеосом на геномной ДНК различается в зависимости от типа клеток и региона генома. С помощью NGS вкДНК, выделенной из плазмы крови, были созданы карты размещения нуклеосом *in vivo* по всему геному [42]. Показано, что распределение нуклеосом, измеренное с помощью вкДНК, можно использовать для определения типов клеток, способствующих образованию вкДНК у здоровых людей и онкологических больных.

Тео и соавт. обнаружили глобальные изменения нуклеосомного ландшафта в вкДНК, сопутствующие процессам старения [30]. В работе 2024 года с помощью методов глубокого секвенирования было установлено, что у пожилых людей, как правило, более длинные геномные расстояния между нуклеосомами, причем возраст коррелирует с длиной нуклеосомных повторов (среднее расстояние между центрами соседних нуклеосом) [43]. Длина нуклеосомных повторов у долгожителей (100 лет) была примерно на 1,5 п.н. больше, чем у людей 70 и 25 лет. Используя полученные данные, авторы разработали первые «часы старения» на основе фрагментомики, а точнее даже нуклеосомики вкДНК: анализ фрагмента вкДНК методами машинного обучения позволил предсказать биологический возраст человека со средней абсолютной ошибкой 3–3,5 года.

NGS вкДНК из плазмы крови человека может быть использован в качестве неинвазивного метода изучения возрастных изменений фрагмента, а при переходе от NGS к одномолекулярному секвенированию исчезает технологическое ограничение на анализ длинных фрагментов. Длинные линейные фрагменты позволяют проанализировать одновременно большее количество потенциальных групп сайтов метилирования, что облегчает установление ткани происхождения фрагмента, так как позволяет лучше сопоставить данные вкДНК с процессами в тканях организма [44]. Это аналогично облегчению идентификации человека при переходе от отпечатка пальца к по отпечатку пальцев всей ладони.

Помимо старения, другие физиологические процессы организма находят свое отражение в изменениях фрагмента вкДНК. Например, при беременности в материнской крови присутствует фракция вкДНК плода, отличающаяся от материнской по виду распределения длин фрагментов [45]. NGS показало увеличение пика распределения длин фрагментов вкДНК на 143 п.н. и уменьшение пика на 166 п.н. в вкДНК, происходящей из клеток плода, по сравнению с материнской вкДНК [46], что, предположительно, связано с иной нуклеосомной организацией и большей доступностью ДНК плода для расщепле-

ния клеточными нуклеазами. Появление длинных фрагментов на более поздних сроках беременности не только вкДНК плода, но и матери [39] позволяет говорить о необходимости накопления фрагментомных данных для различных физиологических состояний и их учета при создании «часов старения» на основе вкДНК. Кроме того, идентификация длинных фрагментов вкДНК в материнской крови открывает новые возможности для неинвазивной пренатальной диагностики заболеваний плода [46].

#### IV. ТОПОЛОГИЯ вкДНК

Помимо линейных двуцепочечных фрагментов ДНК, пик распределения длины которых соответствует фрагменту, взаимодействующему с нуклеосомой, в плазме также присутствуют и другие топологические формы (Рис. 2). Одной из таких форм является экстрахромосомная кольцевая ДНК (экДНК), изначально обнаруженная в клетках эукариот и представляющая собой замкнутую двуцепочечную ДНК различной длины [47]. У здоровых людей длина >200 оснований показана для ~30% циркулирующих линейных вкДНК и для >70% экДНК, что позволяет предположить устойчивость последних к действию нуклеаз [48]. В 2017 году была охарактеризована фракция свободно циркулирующей экДНК в плазме [49]. Установлено, что внеклеточная экДНК имеет преимущественно митохондриальное происхождение, но может образовываться и путем фрагментации хромосомной ДНК с последующим соединением концов. Соотношение кольцевой и линейной форм митохондриальной экДНК может быть использовано как биомаркер функционирования печени, для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы и для мониторинга состояния печени при трансплантации [50].

Молекулярная основа и генетические процессы биогенеза экДНК до сих пор полностью не изучены. Показано, что образование экДНК коррелирует с увеличением доли некодирующей ДНК в геноме. ЭкДНК может образовываться в результате гомологичной рекомбинации между повторами, негомологичной рекомбинации, функционирования системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR) или синтеза *de novo*. Согласно ряду исследований, биогенез экДНК является следствием механизма поддержания стабильности генома и защиты от повреждений, вызванных внешними факторами и процессами старения. Значительная доля экДНК происходит из мобильных генетических элементов, таких, как короткие и длинные диспергированные повторы, длинные концевые повторы, теломерные области, транспозоны и ретротранспозоны [51]. Геномное картирование экДНК из плазмы материнской крови показало, что эта ДНК формируются преимущественно из 5'-нетранслируемых областей, экзонов и CpG-островков. При этом, молекулы экДНК плодного происхождения обычно были короче, чем материнские [52], что объясняется различным набором тканей происхождения вкДНК в целом у матери и у плода.

В связи с низкой представленностью экДНК в плазме, выделение и очистка данных молекул является нетривиальной задачей. В работе [49] для обогащения экДНК вкДНК обрабатывали АТФ-зависимой ДНКазой, которая селективно расщепляет линейную ДНК. Для амплификации оставшихся кольцевых ДНК использовали метод амплификации множественного смещения – изотермический метод амплификации ДНК, использующий ф29 ДНК-полимеразу и праймеры со случайной последовательностью для получения большого количества ПЦР-продукта с высокой точностью из низких количеств ДНК-матрицы и фрагментированных или поврежденных образцов. В последние годы были разработаны специализированные протоколы обогащения, пробоподготовки

и секвенирования экДНК с использованием технологий длинных прочтений, что позволило установить геномные участки, производящие кольцевые ДНК [53]. ЭкДНК рассматриваются как часть гетерогенности и прогрессирования опухоли и могут являться биомаркерами для диагностики некоторых опухолевых заболеваний [48]. Частота образования экДНК сильно варьирует при различных видах рака. В то время как нейроопухоль, такие как глиобластома, могут демонстрировать высокий уровень экДНК-позитивности, другие, такие как рак толстой кишки, гематологический рак, обычно не производят экДНК [54].

В ряде работ описывается возможная роль экДНК в клеточных процессах, связанных как с ранним развитием, так и со старением клеток. Cohen и соавт. исследуя возникновение экДНК в перибластуре эмбрионов шпорцевых лягушек *Xenopus laevis* [55], показали, что популяция экДНК резко сокращается на поздних стадиях развития и во взрослых тканях. Значительная часть экДНК *X. laevis* содержит множественные теломерные повторы (TTAGGG)<sub>n</sub>, до 10% от общего содержания клеточных теломер эмбриона, что предполагает наличие функциональной роли вкДНК в эмбриональном развитии [56]. Формирование экДНК обнаружено при старении лимфоцитов крысы *in vivo* и культивируемых фибробластов легких человека *in vitro* [57].

ЭкДНК может рассматриваться как потенциальный биомаркер стабильности генома, старения и уровня физической активности. В работе 2023 года Ren и соавт. идентифицировали и всесторонне охарактеризовали тысячи экДНК стволовых клеток (СК) жировой ткани молодых и пожилых доноров [58]. Три экДНК, полученные из двух кодирующих белки генов, экспрессировались только в молодых СК жировой ткани, что делает эти экДНК потенциальными биомаркерами старения стволовых клеток и мишенями для омоложения стволовых клеток. Показано, что некоторые мотивы экДНК в стареющих СК костного мозга представляли собой участки связывания транскрипционных факторов, связанных со старением [59]. Следует отметить, что в приведенных работах [55–59] изучалась внутриклеточная, а не циркулирующая в крови популяция экДНК.

В 2023 году Gerovska и соавт. показали, что профиль экДНК физически активных пожилых людей существенно отличается от такового у людей, ведущих сидячий образ жизни [60]. Взаимосвязь с физической активностью и исследование модельных организмов показывает взаимосвязь накопления экДНК и старения [55, 56, 61].

## V. МЕТИЛОМ вкДНК

Метилирование в CpG-участках геномной ДНК остатков цитозина по 5 атому углерода гетероциклического основания является наиболее хорошо охарактеризованным типом эпигенетического контроля, который играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов во время эмбрионального развития, в поддержании стабильности генома и при онкогенезе [8, 62]. Метилированные и неметилированные CpG-участки формируют профиль метилирования ДНК, уникальный для каждого типа ткани. ВкДНК часто рассматривают как ценный биомаркер для ранней диагностики онкологических заболеваний [63–66], так как онкогенез, как правило, сопровождается изменениями рисунка метилирования ДНК. Специфичные для ткани профили метилирования вкДНК могут с высоким уровнем специфичности и чувствительности использоваться для обнаружения гибели клеток ткани и при таких патологиях человека, как диабет 1 типа, панкреатит и рассеянный склероз [20].

Метиллом вкДНК является моментальным снимком интенсивности паталогических процессов во всех тканях организма в момент сбора плазмы крови, а развитие технологий секвенирования нового поколения и обработки геномных данных открывает возможности новой малоинвазивной диагностики. В исследовании [67] изучалось метилирование ДНК в 476 366 сайтах по всему геному лейкоцитов из популяционной когорты (N = 421) в возрасте от 14 до 94 лет. Возраст влиял на метилирование ДНК почти в одной трети (29%) сайтов, из которых с увеличением возраста 60,5% становятся гипометилированными и 39,5% гиперметилированными. Сайты метилирования ДНК, расположенные в пределах CpG-островков, чаще становятся гиперметилированными по сравнению с сайтами за пределами островков.

В настоящее время золотым стандартом определения степени и профиля метилирования вкДНК является бисульфитное секвенирование. ВкДНК, выделенная из плазмы крови, подвергается бисульфитной конверсии, после чего проводится ПЦР-амплификация и секвенирование полученных фрагментов различными методами [68]. Однако обработка ДНК бисульфитом натрия вызывает значительную потерю исходной ДНК, а также неоднородную, зависящую от последовательности деградацию длинных фрагментов, что ограничивает чувствительность диагностических тестов и анализов. Последние достижения в области пробоподготовки и методов секвенирования с длинными прочтениями частично решают эти проблемы, но требуют специализированных протоколов. Например, технологии одномолекулярного и нанопорового секвенирования позволяют получить данные о метиломе вкДНК человека в отсутствие стадий бисульфитной конверсии и ПЦР, используя от 100 пг исходной вкДНК, выделенной из 0,5 мл плазмы крови [69]. Дальнейшая классификация прочтений по метиломам позволяет установить их тканевое происхождение. Так, в работе [70] на основе анализа 23 NGS-датасетов была разработана методология «деконволюции» данных метилирования ДНК, помогающая определить типы клеток и их доли в образце в отсутствие референсных карт уровня метилирования.

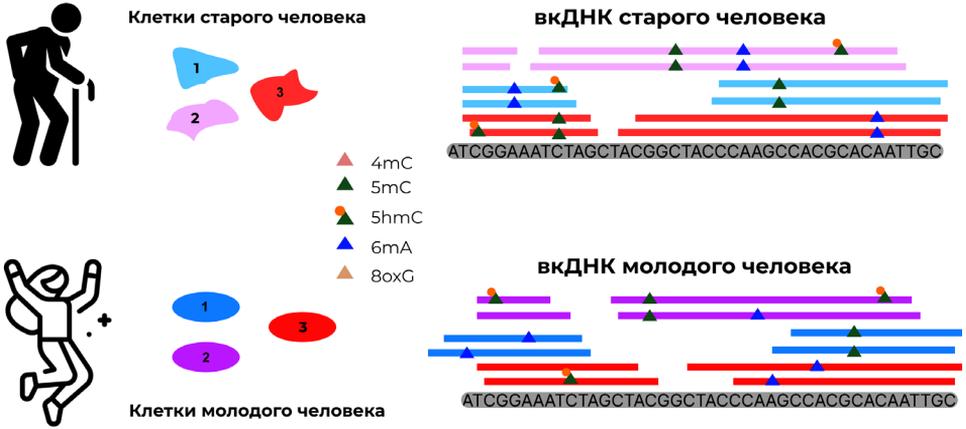
Следует отметить, что локальный статус метилирования вкДНК коррелирует с распределением длин её фрагментов [71]. Были созданы модели машинного обучения, позволяющие предсказывать метилом вкДНК на основе данных о фрагментоме и распределении CpG-участков в прочтениях [72].

Недавно были обнаружены изменения метилома вкДНК митохондриального происхождения, связанные с таким возрастным заболеванием, как болезнь Альцгеймера, но возможность их использования в качестве биомаркера данной болезни требует дальнейшего изучения [73].

Последние достижения технологий секвенирования позволили обнаружить тысячи дифференциально метилированных CpG-сайтов в вкДНК здоровых людей различного возраста, что открывает возможность использования метилирования ДНК в клинической практике как инструмента прогнозирования старения и диагностики воспалительных процессов в организме [31] (Рис. 3Б).

Во многих работах профиль метилирования ДНК рассматривается как перспективный биомаркер старения и стрессовых расстройств [74–76]. Например, в работе Blocklandt и соавт. с помощью полногеномного скрининга уровня метилирования CpG-сайтов 34 близнецов возрастом от 21 до 55 лет идентифицировали 88 CpG-сайтов, ассоциированных с 80 генами, для которых процент метилирования значимо коррелировал с возрастом

А



Б

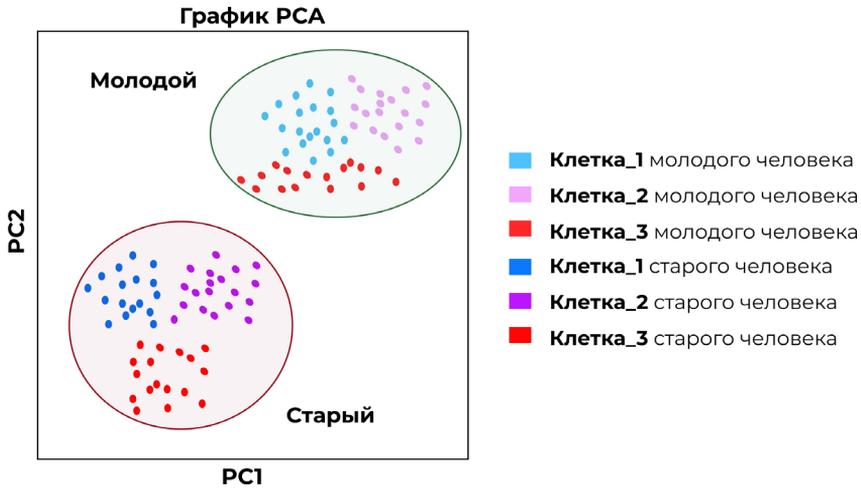


Рис. 3. Возрастные изменения фрагментов и эпигенетического профиля внеклеточной ДНК.

(А) Распределение модифицированных оснований и длин фрагментов вкДНК в молодом и пожилом возрасте.

(Б) Визуализация характеристик вкДНК с помощью биоинформатического метода главных компонент (PCA – principal component analysis [43]) для установления возраста клеток. PC1 и PC2 – главные компоненты. Данные взяты из работы [43].

[77]. Авторами была разработана регрессионная модель – по сути, «часы старения» на основе данных CpG-метилирования, способные предсказать возраст человека со средней точностью 5,2 года. Другая модель старения на основе эпигенетических данных была построена Hannum и соавт. [78]. Проанализировав уровни метилирования 485 577 CpG-сайтов в крови 656 людей в возрасте от 19 до 101 года, авторы выбрали 77 сайтов и создали количественную модель старения, предсказывающую возраст с точностью 3,9 лет. В корейской работе [79] оценили метилирование ДНК по всему геному (485 512 различных участков CpG) в 349 образцах крови. Анализируя массив данных, полученный с помощью технологии Illumina 450 methylation BeadChip, авторы показали, что количественная оценка изменений метилома – эпигенетические «часы» метилирования ДНК – могут помочь в прогнозировании метаболических заболеваний.

## **VI. ПОТЕНЦИАЛ СЕКВЕНИРОВАНИЯ вкДНК МЕТОДОМ ДЛИННЫХ ПРОЧТЕНИЙ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ ДЛЯ СОЗДАНИЯ «ЧАСОВ СТАРЕНИЯ»**

Большинство исследований в области вкДНК сосредоточены на коротких молекулах, а длинные молекулы вкДНК изучены недостаточно. Это связано с ограничениями технологии NGS. Для преодоления этой проблемы в последние годы применяются активно развивающиеся технологии секвенирования на основе длинных прочтений: одномолекулярное секвенирование в реальном времени (SMRT), разрабатываемое компанией PacBio, и нанопоровое секвенирование от Oxford Nanopore Technologies (ONT) [80, 81]. В то время как методы высокопроизводительного секвенирования прошлых поколений ограничены длиной прочтения до 600 п.н., SMRT и ONT позволяют идентифицировать весь спектр длин фрагментов, от 20 п.н. до нескольких десятков тысяч [82]. Присутствие длинных вкДНК было подтверждено в плазме крови беременных женщин и больных онкологическими заболеваниями, что подчеркивает клиническую значимость секвенирования длинных прочтений для диагностики патологий плода и злокачественных опухолей [39, 44]. Обе платформы секвенирования на основе длинных прочтений предоставляют возможность анализа метилирования вкДНК по CpG-участкам в отсутствие бисульфитной и ферментативной конверсии, что помогает избежать деградации и дальнейшей фрагментации ДНК [69, 83]. Полученные профили метилирования могут быть использованы для анализа ткани происхождения вкДНК. Последние достижения в области пробоподготовки для нанопорового секвенирования позволяют получить до 200 млн. прочтений вкДНК из менее чем 1 мл плазмы крови [69]. Кроме того, несомненным преимуществом технологий ONT и SMRT для дальнейших исследований является возможность идентификации и других модифицированных оснований, таких как N6-метиладенин и C5-гидроксиметилцитозин (5hmC), которые в последние годы всё чаще рассматриваются как новые виды эпигенетических модификаций у эукариот [84, 85].

Все эти факторы делают одномолекулярное секвенирование на основе длинных прочтений (ONT и SMRT) многообещающим инструментом для исследования вкДНК, позволяющим одновременно захватить всё многообразие свойств вкДНК. Прямое сравнение двух платформ позволяет сделать предположение о предпочтительности ONT, как требующей меньшего количества ДНК для анализа [86]. Однако, методы на основе длинных прочтений не лишены и недостатков. По сравнению с традиционными методами секвенирования ONT менее точно идентифицирует основания, но с развитием

технологии эта проблема постепенно решается [81, 87]. Анализ истории развития технологии ONT [88] позволяет утверждать, что существующие недостатки «пор» будут преодолены в ближайшее время. Другим недостатком является «молодость» данных платформ, приводящая в некоторых случаях к необходимости самостоятельной оптимизации протоколов пробоподготовки и анализа данных. Тем не менее, потенциал использования технологий на основе длинных прочтений в клинике, несомненно, высок [86].

Развитие технологий секвенирования на основе длинных прочтений открывает возможность использования некоторых характеристик ДНК, ранее недоступных для определения методами NGS, но связанных с процессами старения, в качестве молекулярных биомаркеров. К таким характеристикам можно отнести распределение поврежденных оснований в вкДНК. Повреждение ДНК активными формами кислорода (АФК) признано важным фактором ряда патологических состояний, включая старение [89]. 8-оксогуанин (8-оксо-G) и его нуклеотид 8-оксо-2'-дезоксигуанозин (8-оксо-dG) – продукты окисления гуанина и дезоксигуанозина, соответственно, считаются наиболее значимыми биомаркерами окислительного повреждения ДНК [90]. В среднем, 1 из 40 000 гуанинов в геноме присутствует в форме 8-оксо-dG [91].

Количественное определение 8-оксо-G и 8-оксо-dG в моче, крови, тканях и слюне имеет важное значение, поскольку используется для определения общих эффектов окислительного стресса и для диагностики и оценки лечения воспалительных, нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [92]. В работе [93] было показано повышение уровней 8-оксо-dG при болезни Альцгеймера, а в исследовании [94] в группе из 48 взрослых мужчин выявлена зависимость уровня 8-оксо-dG в ДНК и активности 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы в скелетных мышцах от возраста и уровня физических нагрузок. Учитывая, что остатки 8-оксо-dG обнаружены в плазме крови различными методами, что суммировано в обзоре [95], например, с помощью ВЭЖХ [96] и масс-спектрометрии [97], уровень и профиль распределения окисленных оснований в циркулирующей ДНК может стать еще одним биомаркером для «часов старения», определяемым с помощью секвенирования длинных прочтений.

## VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возраст является значимым индикатором риска возникновения хронических заболеваний и смертности. Точно оценить биологический возраст и получить прогностическую информацию о процессе старения можно при помощи биологических маркеров и созданных на их основе часов старения. В работе 2023 года [98] проанализировав 136 статей, выбранных по поисковому запросу «часы старения», авторы приходят к выводу, что часы старения, обученные на данных о метилировании определённых CpG сайтов – DNAm PhenoAge [99] и DNAm GrimAge [100] являются самыми точными для оценки риска смертности из предложенных к настоящему времени. Вышеупомянутые часы принимают в расчёт не только эпигенетические, но и клинические показатели. Так DNAm GrimAge учитывает хронологический возраст, пол, количество лет курения. Различные биомаркеры возраста охватывают различные аспекты процесса старения. В 2023 году на группе из 3222 человек определили эффективность разных в двух когортах часов старения, сконструированных на основе эпигенетических или метаболомных биомаркерах [5]. Часы старения сравнивали между собой, а также по способности точно отобразить биологический возраст, фенотипически определёнными показателями стар-

ческой слабости (анализ крови и физические осмотры) и смертностью. Показано, что различные молекулярные маркеры биологического возраста дополняют друг друга при оценке слабости и смертности и потенциально дополняют стандартизованную оценку здоровья в клинических условиях. DNAm GrimAge [100] и MetaboHealth (определяет концентрацию 14 метаболических показателей, включая глюкозу, изолейцин, соотношение полиненасыщенных жирных кислот к общему количеству жирных кислот в %, диаметр частиц липопротеинов высокой плотности и т.д.) [101] максимально точно оценивают риск смертности.

Маркеры биологического возраста, и созданные на их основе при помощи машинного обучения калькуляторы/часы старения потенциально могут использоваться в клинических условиях для точной оценки здоровья, а также для мониторинга ответа на проводимую терапию или иное медицинское вмешательство. Однако существуют определённые трудности для внедрения часов старения в клиническую практику [98]. Препятствием являются многоступенчатые лабораторные анализы, трудоёмкость оценки метилирования, дорогостоящее оборудование, сложные методы обработки информации. Проведенный нами анализ литературных данных позволяет сделать вывод о том, что эти трудности могут быть нивелированы в часах старения, в основе механизма которых лежит анализ фрагмента и эпигенетического ландшафта вкДНК. Метод, который позволит не только точно оценить вышеперечисленные параметры, но и сделать это в одном эксперименте/лабораторном анализе — это секвенирование единичных молекул на основе длинных прочтений. При необходимости такие часы старения можно было бы дополнить данными метаболомного анализа и клиническими биомаркерами возраста.

---

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках проекта по соглашению № 075-15-2024-643.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Baker, G.T., Sprott, R.L. (1988) Biomarkers of Aging. *Experimental Gerontology*, **23**, 223–239.
2. В.П. Скулачев (2012) Что такое «феноптоз» и как с ним бороться? *Биохимия*, **77**, 827–846.
3. Ларина, В.Н., Ларин, В.Г., Врублевский, А.Н., Самородская, И.В. (2023) Процесс старения организма с позиции многофакторных изменений. *Лечебное дело*, **4**, 8–16.
4. Martens, D.S., Van Der Stukken, C., Derom, C., Thiery, E., Bijmens, E.M., Nawrot, T.S. (2021) Newborn Telomere Length Predicts Later Life Telomere Length: Tracking Telomere Length from Birth to Child- and Adulthood. *EBioMedicine*, **63**, 103164.
5. Kuiper, L.M., Polinder-Bos, H.A., Bizzarri, D., Vojinovic, D., Vallerga, C.L., Beekman, M., Dollé, M.E.T., Ghanbari, M., Voortman, T., Reinders, M.J.T., et al. (2023) Epigenetic and Metabolomic Biomarkers for Biological Age: A Comparative Analysis of Mortality and Frailty Risk. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, **78**, 1753–1762.

6. Tanaka, T., Basisty, N., Fantoni, G., Candia, J., Moore, A.Z., Biancotto, A., Schilling, B., Bandinelli, S., Ferrucci, L. (2020) Plasma Proteomic Biomarker Signature of Age Predicts Health and Life Span. *eLife*, **9**, 1–24.
7. Rapčan, B., Song, M., Frkatović-Hodžić, A., Pribić, T., Vuk, J., Beletić, A., Hanić, M., Jurić, J., Tominac, P., Milas, J., et al. (2024) Glycan Clock of Ageing—Analytical Precision and Time-Dependent Inter- and i-Individual Variability. *GeroScience*, 1–16.
8. Noroozi, R., Ghafouri-Fard, S., Pisarek, A., Rudnicka, J., Spólnicka, M., Branicki, W., Taheri, M., Pośpiech, E. (2021) DNA Methylation-Based Age Clocks: From Age Prediction to Age Reversion. *Ageing research reviews*, **68**, 101314.
9. Peters, M.J., Joehanes, R., Pilling, L.C., Schurmann, C., Conneely, K.N., Powell, J., Reinmaa, E., Sutphin, G.L., Zhernakova, A., Schramm, K., et al. (2015) The Transcriptional Landscape of Age in Human Peripheral Blood. *Nature communications*, **6**, 8570.
10. Mikheev, R.K., Andreeva, E.N., Grigoryan, O.R., Sheremetyeva, E. V., Absatarova, Yu.S., Odarchenko, A.S., Opletaeva, O.N. (2023) Molecular and Cellular Mechanisms of Ageing: Modern Knowledge (Literature Review). *Problems of Endocrinology*, **69**, 45–54.
11. Xia, X., Wang, Y., Yu, Z., Chen, J., Han, J.D.J. (2021) Assessing the Rate of Aging to Monitor Aging Itself. *Ageing research reviews*, **69**, 101350.
12. Wang, Q., Hou, T., Wang, Q., He, J., Wang, L., Si, J., Chen, S. (2023) An Evaluation of Aging Measures: From Biomarkers to Clocks. *Biogerontology*, **24**, 303–328.
13. Тельшьева, Е.Н. (2017) Свободно-Циркулирующая ДНК Плазмы Крови. Возможности Применения в Онкологии. *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России*, **17**, 2.
14. Aucamp, J., Bronkhorst, A.J., Badenhorst, C.P.S., Pretorius, P.J. (2018) The Diverse Origins of Circulating Cell-Free DNA in the Human Body: A Critical Re-Evaluation of the Literature. *Biological Reviews*, **93**, 1649–1683.
15. Dennis Lo, Y.M., Zhang, J., Leung, T.N., Lau, T.K., Chang, A.M.Z., Magnus Hjelm, N. (1999) Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *American Journal of Human Genetics*, **64**, 218–224.
16. Yu, S.C.Y., Lee, S.W.Y., Jiang, P., Leung, T.Y., Chan, K.C.A., Chiu, R.W.K., Lo, Y.M.D. (2013) High-Resolution Profiling of Fetal DNA Clearance from Maternal Plasma by Massively Parallel Sequencing. *Clinical Chemistry*, **59**, 1228–1237.
17. Mittra, I., Khare, N.K., Raghuram, G.V., Chaubal, R., Khambatti, F., Gupta, D., Gaikwad, A., Prasannan, P., Singh, A., Iyer, A., et al. (2015) Circulating Nucleic Acids Damage DNA of Healthy Cells by Integrating into Their Genomes. *Journal of Biosciences*, **40**, 91–111.
18. Khier, S., Gahan, P.B. (2021) Hepatic Clearance of Cell-Free DNA: Possible Impact on Early Metastasis Diagnosis. *Molecular Diagnosis and Therapy*, **25**, 677–682.
19. Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenky, M., Yen, A., Heravi-Moussavi, A., Kheradpour, P., Zhang, Z., Wang, J., Ziller, M.J., et al. (2015) Integrative Analysis of 111 Reference Human Epigenomes. *Nature*, **518**, 317–330.
20. Lehmann-Werman, R., Neiman, D., Zemmour, H., Moss, J., Magenheimer, J., Vaknin-Dembinsky, A., Rubertsson, S., Nellgård, B., Blennow, K., Zetterberg, H., et al. (2016) Identification of Tissue-Specific Cell Death Using Methylation Patterns of Circulating DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, E1826–E1834.
21. Liu, L., Toung, J.M., Jassowicz, A.F., Vijayaraghavan, R., Kang, H., Zhang, R., Kruglyak, K.M., Huang, H.J., Hinoue, T., Shen, H., et al. (2018) Targeted Methylation Sequencing of Plasma Cell-Free DNA for Cancer Detection and Classification. *Annals of Oncology*, **29**, 1445–1453.

22. Galardi, F., De Luca, F., Romagnoli, D., Biagioni, C., Moretti, E., Biganzoli, L., Di Leo, A., Migliaccio, I., Malorni, L., Benelli, M. (2020) Cell-Free DNA-Methylation-Based Methods and Applications in Oncology. *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 1677, **10**, 1677.
23. Nishiyama, A., Nakanishi, M. (2021) Navigating the DNA Methylation Landscape of Cancer. *Trends in genetics : TIG*, **37**, 1012–1027.
24. Kresse, S.H., Brandt-Winge, S., Pharo, H., Flatin, B.T.B., Jeanmougin, M., Vedeld, H.M., Lind, G.E. (2023) Evaluation of Commercial Kits for Isolation and Bisulfite Conversion of Circulating Cell-Free Tumor DNA from Blood. *Clinical epigenetics*, **15**, 151.
25. Maggi, E.C., Gravina, S., Cheng, H., Piperdi, B., Yuan, Z., Dong, X., Libutti, S.K., Vijg, J., Montagna, C. (2018) Development of a Method to Implement Whole-Genome Bisulfite Sequencing of CfDNA from Cancer Patients and a Mouse Tumor Model. *Frontiers in Genetics*, **9**, doi: 10.3389/fgene.2018.00006.
26. Cheng, T.H.T., Jiang, P., Tam, J.C.W., Sun, X., Lee, W.S., Yu, S.C.Y., Teoh, J.Y.C., Chiu, P.K.F., Ng, C.F., Chow, K.M., et al. (2017) Genomewide Bisulfite Sequencing Reveals the Origin and Time-Dependent Fragmentation of Urinary CfDNA. *Clinical Biochemistry*, **50**, 496–501.
27. Song, C.X., Yin, S., Ma, L., Wheeler, A., Chen, Y., Zhang, Y., Liu, B., Xiong, J., Zhang, W., Hu, J., et al. (2017) 5-Hydroxymethylcytosine Signatures in Cell-Free DNA Provide Information about Tumor Types and Stages. *Cell Research*, **27**, 1231–1242.
28. Khemka, S., Sehar, U., Manna, P.R., Kshirsagar, S., Reddy, P.H. (2024) Cell-Free DNA As Peripheral Biomarker of Alzheimer’s Disease. *Aging and disease*, doi: 10.14336/AD.2024.0329.
29. Yu, C., Lin, Y., Luo, Y., Guo, Y., Ye, Z., Ou, R., Zhang, Y., Wang, X., Qu, R., Zhou, W., et al. (2023) The Fragmentomic Property of Plasma Cell-Free DNA Enables the Non-Invasive Detection of Diabetic Nephropathy in Patients with Diabetes Mellitus. *Frontiers in Endocrinology*, **14**, doi: 10.3389/fendo.2023.1164822.
30. Teo, Y.V., Capri, M., Morsiani, C., Pizza, G., Faria, A.M.C., Franceschi, C., Neretti, N. (2019) Cell-Free DNA as a Biomarker of Aging. *Aging cell*, **18**, e12890.
31. Li, S.-J., Gao, X., Wang, Z.-H., Li, J., Zeng, L.-T., Dang, Y.-M., Ma, Y.-Q., Zhang, L.-Q., Wang, Q.-Y., Zhang, Y.-M., et al. (2024) Cell-Free DNA Methylation Patterns in Aging and Their Association with Inflamm-Aging. *Epigenomics*, **16**, 715–731.
32. Schwarzenbach, H., Hoon, D.S.B., Pantel, K. (2011) Cell-Free Nucleic Acids as Biomarkers in Cancer Patients. *Nature Reviews Cancer* 2011 11:6, **11**, 426–437.
33. Han, D.S.C., Ni, M., Chan, R.W.Y., Chan, V.W.H., Lui, K.O., Chiu, R.W.K., Lo, Y.M.D. (2020) The Biology of Cell-Free DNA Fragmentation and the Roles of DNASE1, DNASE1L3, and DFFB. *American Journal of Human Genetics*, **106**, 202–214.
34. Watanabe, T., Takada, S., Mizuta, R. (2019) Cell-Free DNA in Blood Circulation Is Generated by DNase1L3 and Caspase-Activated DNase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **516**, 790–795.
35. Jylhävä, J., Kotipelto, T., Raitala, A., Jylhä, M., Hervonen, A., Hurme, M. (2011) Aging Is Associated with Quantitative and Qualitative Changes in Circulating Cell-Free DNA: The Vitality 90+ Study. *Mechanisms of Ageing and Development*, **132**, 20–26.
36. Ivanov, M., Baranova, A., Butler, T., Spellman, P., Mileyko, V. (2015) Non-Random Fragmentation Patterns in Circulating Cell-Free DNA Reflect Epigenetic Regulation. *BMC Genomics*, **16**, doi: 10.1186/1471-2164-16-S13-S1.
37. Qi, T., Pan, M., Shi, H., Wang, L., Bai, Y., Ge, Q. (2023) Cell-Free DNA Fragmentomics: The Novel Promising Biomarker. *International journal of molecular sciences*, **24**, 1503.

38. Zhitnyuk, Y. V., Koval, A.P., Alferov, A.A., Shtykova, Y.A., Mamedov, I.Z., Kushlinskii, N.E., Chudakov, D.M., Shcherbo, D.S. (2022) Deep CfDNA Fragment End Profiling Enables Cancer Detection. *Molecular Cancer*, **21**, 1–5.
39. Yu, S.C.Y., Jiang, P., Peng, W., Cheng, S.H., Cheung, Y.T.T., Tse, O.Y.O., Shang, H., Poon, L.C., Leung, T.Y., Chan, K.C.A., et al. (2021) Single-Molecule Sequencing Reveals a Large Population of Long Cell-Free DNA Molecules in Maternal Plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **118**, e2114937118.
40. Ren, S., Yu, C., Huang, Q. (2024) Diagnostic Value of Combined Detection of Plasma CfDNA Concentration and Integrity in NSCLC. *Lung Cancer Management*, **13**, doi: 10.2217/1mt-2023-0009.
41. Thierry, A.R. (2023) Circulating DNA Fragmentomics and Cancer Screening. *Cell Genomics*, **3**, 100242.
42. Snyder, M.W., Kircher, M., Hill, A.J., Daza, R.M., Shendure, J. (2016) Cell-Free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint That Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*, **164**, 57–68.
43. Shtumpf, M., Jeong, S., Bikova, M., Mamayusupova, H., Ruje, L., Teif, V.B. (2024) Aging Clock Based on Nucleosome Reorganisation Derived from Cell-Free DNA. *Ageing cell*, **23**, e14100.
44. Lois Choy, L.Y., Peng, W., Jiang, P., Cheng, S.H., Yu, S.C.Y., Shang, H., Olivia Tse, O.Y., Wong, J., Wong, V.W.S., Wong, G.L.H., et al. (2022) Single-Molecule Sequencing Enables Long Cell-Free DNA Detection and Direct Methylation Analysis for Cancer Patients. *Clinical Chemistry*, **68**, 1151–1163.
45. Chan, K.C.A., Zhang, J., Hui, A.B.Y., Wong, N., Lau, T.K., Leung, T.N., Lo, K.W., Huang, D.W.S., Lo, Y.M.D. (2004) Size Distributions of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry*, **50**, 88–92.
46. Lo, Y.M.D., Chan, K.C.A., Sun, H., Chen, E.Z., Jiang, P., Lun, F.M.F., Zheng, Y.W., Leung, T.Y., Lau, T.K., Cantor, C.R., et al. (2010) Maternal Plasma DNA Sequencing Reveals the Genome-Wide Genetic and Mutational Profile of the Fetus. *Science Translational Medicine*, **2**, 61ra91.
47. Møller, H.D., Parsons, L., Jørgensen, T.S., Botstein, D., Regenberg, B. (2015) Extrachromosomal Circular DNA Is Common in Yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, E3114–E3122.
48. Kumar, P., Dillon, L.W., Shibata, Y., Jazaeri, A.A., Jones, D.R., Dutta, A. (2017) Normal and Cancerous Tissues Release Extrachromosomal Circular DNA (EccDNA) into the Circulation. *Molecular Cancer Research*, **15**, 1197–1205.
49. Zhu, J., Zhang, F., Du, M., Zhang, P., Fu, S., Wang, L. (2017) Molecular Characterization of Cell-Free EccDNAs in Human Plasma. *Scientific Reports*, **7**, 10968.
50. Ma, M.-J.L., Zhang, H., Jiang, P., Sin, S.T.K., Lam, W.K.J., Cheng, S.H., Lee, W.-S., Gai, W., Tse, O.Y.O., Peng, W., et al. (2019) Topologic Analysis of Plasma Mitochondrial DNA Reveals the Coexistence of Both Linear and Circular Molecules. *Clinical Chemistry*, **65**, 1161–1170.
51. Qiu, G.-H., Zheng, X., Fu, M., Huang, C., Yang, X. (2021) The Decreased Exclusion of Nuclear EccDNA: From Molecular and Subcellular Levels to Human Aging and Age-Related Diseases. *Ageing Research Reviews*, **67**, 101306.
52. Sin, S.T.K., Jiang, P., Deng, J., Ji, L., Cheng, S.H., Dutta, A., Leung, T.Y., Chan, K.C.A., Chiu, R.W.K., Lo, Y.M.D. (2020) Identification and Characterization of Extrachromosomal Circular DNA in Maternal Plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **117**, 1658–1665.
53. Wang, Y., Wang, M., Djekidel, M.N., Chen, H., Liu, D., Alt, F.W., Zhang, Y. (2021) EccDNAs Are Apoptotic Products with High Innate Immunostimulatory Activity. *Nature*, **599**, 308–314.

54. Liao, Z., Jiang, W., Ye, L., Li, T., Yu, X., Liu, L. (2020) Classification of Extrachromosomal Circular DNA with a Focus on the Role of Extrachromosomal DNA (EcDNA) in Tumor Heterogeneity and Progression. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, **1874**, 188392.
55. Cohen, S., Menut, S., Méchali, M. (1999) Regulated Formation of Extrachromosomal Circular DNA Molecules during Development in *Xenopus Laevis*. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 6682–6689.
56. Cohen, S., Méchali, M. (2002) Formation of Extrachromosomal Circles from Telomeric DNA in *Xenopus Laevis*. *EMBO reports*, **3**, 1168–1174.
57. Kunisada, T., Yamagishi, H., Ogita, Z., Kirakawa, T., Mitsui, Y. (1985) Appearance of Extrachromosomal Circular DNAs during in Vivo and in Vitro Ageing of Mammalian Cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, **29**, 89–99.
58. Ren, S., Wu, D., Shen, X., Wu, Q., Li, C., Xiong, H., Xiong, Z., Gong, R., Liu, Z., Wang, W., et al. (2023) Deciphering the Role of Extrachromosomal Circular DNA in Adipose Stem Cells from Old and Young Donors. *Stem Cell Research & Therapy*, **14**, 341.
59. Yang, W., Ji, W., Liao, B., Li, Z., Wang, J., Lin, H., Wang, J., He, Q. (2024) Genome-Wide Sequencing Identified Extrachromosomal Circular DNA as a Transcription Factor-Binding Motif of the Senescence Genes That Govern Replicative Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in cellular neuroscience*, **18**, doi: 10.3389/fncel.2024.1421342.
60. Gerovska, D., Araúzo-Bravo, M.J. (2023) Skeletal Muscles of Sedentary and Physically Active Aged People Have Distinctive Genic Extrachromosomal Circular DNA Profiles. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, 2736.
61. Hull, R.M., King, M., Pizza, G., Krueger, F., Vergara, X., Houseley, J. (2019) Transcription-Induced Formation of Extrachromosomal DNA during Yeast Ageing. *PLOS Biology*, **17**, e3000471.
62. Jones, P.A. (2012) Functions of DNA Methylation: Islands, Start Sites, Gene Bodies and Beyond. *Nat Rev Genet*, **13**, 484–492.
63. Wu, X., Zhang, Y., Hu, T., He, X., Zou, Y., Deng, Q., Ke, J., Lian, L., He, X., Zhao, D., et al. (2021) A Novel Cell-free DNA Methylation-based Model Improves the Early Detection of Colorectal Cancer. *Molecular Oncology*, **15**, 2702–2714.
64. Liang, L., Zhang, Y., Li, C., Liao, Y., Wang, G., Xu, J., Li, Y., Yuan, G., Sun, Y., Zhang, R., et al. (2022) Plasma CfDNA Methylation Markers for the Detection and Prognosis of Ovarian Cancer. *eBioMedicine*, **83**, 104222.
65. Sui, J., Wu, X., Wang, C., Wang, G., Li, C., Zhao, J., Zhang, Y., Xiang, J., Xu, Y., Nian, W., et al. (2021) Discovery and Validation of Methylation Signatures in Blood-Based Circulating Tumor Cell-Free DNA in Early Detection of Colorectal Carcinoma: A Case–Control Study. *Clinical Epigenetics*, **13**, 26.
66. Gao, Q., Lin, Y.P., Li, B.S., Wang, G.Q., Dong, L.Q., Shen, B.Y., Lou, W.H., Wu, W.C., Ge, D., Zhu, Q.L., et al. (2023) Unintrusive Multi-Cancer Detection by Circulating Cell-Free DNA Methylation Sequencing (THUNDER): Development and Independent Validation Studies. *Annals of Oncology*, **34**, 486–495.
67. Johansson, Å., Enroth, S., Gyllensten, U. (2013) Continuous Aging of the Human DNA Methylome Throughout the Human Lifespan. *PLoS one*, **8**, e67378.
68. Lun, F.M.F., Chiu, R.W.K., Sun, K., Leung, T.Y., Jiang, P., Chan, K.C.A., Sun, H., Lo, Y.M.D. (2013) Noninvasive Prenatal Methylomic Analysis by Genomewide Bisulfite Sequencing of Maternal Plasma DNA. *Clinical Chemistry*, **59**, 1583–1594.
69. Lau, B.T., Almeda, A., Schauer, M., McNamara, M., Bai, X., Meng, Q., Partha, M., Grimes, S.M., Lee, H., Heestand, G.M., et al. (2023) Single-Molecule Methylation Profiles of Cell-Free DNA in Cancer with Nanopore Sequencing. *Genome Medicine*, **15**, 33.

70. Houseman, E.A., Kile, M.L., Christiani, D.C., Ince, T.A., Kelsey, K.T., Marsit, C.J. (2016) Reference-Free Deconvolution of DNA Methylation Data and Mediation by Cell Composition Effects. *BMC bioinformatics*, **17**, 259.
71. Jensen, T.J., Kim, S.K., Zhu, Z., Chin, C., Gebhard, C., Lu, T., Deciu, C., van den Boom, D., Ehrich, M. (2015) Whole Genome Bisulfite Sequencing of Cell-Free DNA and Its Cellular Contributors Uncovers Placenta Hypomethylated Domains. *Genome Biology*, **16**, 78.
72. Liu, Y., Reed, S.C., Lo, C., Choudhury, A.D., Parsons, H.A., Stover, D.G., Ha, G., Gydush, G., Rhoades, J., Rotem, D., et al. (2024) FinaleMe: Predicting DNA Methylation by the Fragmentation Patterns of Plasma Cell-Free DNA. *Nature Communications*, **15**, 2790.
73. Ding, B., Zhang, X., Wan, Z., Tian, F., Ling, J., Tan, J., Peng, X. (2023) Characterization of Mitochondrial DNA Methylation of Alzheimer's Disease in Plasma Cell-Free DNA. *Diagnostics*, **13**, 2351.
74. McCartney, D.L., Min, J.L., Richmond, R.C., Lu, A.T., Sobczyk, M.K., Davies, G., Broer, L., Guo, X., Jeong, A., Jung, J., et al. (2021) Genome-Wide Association Studies Identify 137 Genetic Loci for DNA Methylation Biomarkers of Aging. *Genome Biology*, **22**, 194.
75. Yang, R., Wu, G.W.Y., Verhoeven, J.E., Gautam, A., Reus, V.I., Kang, J.I., Flory, J.D., Abu-Amara, D., Hood, L., Doyle, F.J., et al. (2021) A DNA Methylation Clock Associated with Age-Related Illnesses and Mortality Is Accelerated in Men with Combat PTSD. *Molecular Psychiatry*, **26**, 4999–5009.
76. Jokai, M., Torma, F., McGreevy, K.M., Koltai, E., Bori, Z., Babszki, G., Bakonyi, P., Gombos, Z., Gyorgy, B., Aczel, D., et al. (2023) DNA Methylation Clock DNAmFitAge Shows Regular Exercise Is Associated with Slower Aging and Systemic Adaptation. *GeroScience*, **45**, 2805–2817.
77. Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M.E., Sánchez, F.J., Sinsheimer, J.S., Horvath, S., Vilain, E. (2011) Epigenetic Predictor of Age. *PLOS ONE*, **6**, e14821.
78. Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S.V., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J.B., Gao, Y., et al. (2013) Genome-Wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Molecular Cell*, **49**, 359–367.
79. Lee, H.S., Park, T. (2020) The Influences of DNA Methylation and Epigenetic Clocks, on Metabolic Disease, in Middle-Aged Koreans. *Clinical Epigenetics*, **12**, 1–10.
80. Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., Dinh, A. (2021) Next-Generation Sequencing Technologies: An Overview. *Human Immunology*, **82**, 801–811.
81. Cook, R., Brown, N., Rihtman, B., Michniewski, S., Redgwell, T., Clokie, M., Stekel, D.J., Chen, Y., Scanlan, D.J., Hobman, J.L., et al. (2024) The Long and Short of It: Benchmarking Viromics Using Illumina, Nanopore and PacBio Sequencing Technologies. *Microbial Genomics*, **10**, doi: 10.1099/mgen.0.001198.
82. Yu, S.C.Y., Choy, L.Y.L., Lo, Y.M.D. (2023) “Longing” for the Next Generation of Liquid Biopsy: The Diagnostic Potential of Long Cell-Free DNA in Oncology and Prenatal Testing. *Molecular diagnosis & therapy*, **27**, 563–571.
83. Yu, S.C.Y., Deng, J., Qiao, R., Cheng, S.H., Peng, W., Lau, S.L., Lois Choy, L.Y., Leung, T.Y., Wong, J., Wong, V.W.S., et al. (2023) Comparison of Single Molecule, Real-Time Sequencing and Nanopore Sequencing for Analysis of the Size, End-Motif, and Tissue-of-Origin of Long Cell-Free DNA in Plasma. *Clinical Chemistry*, **69**, 168–179.
84. Wu, K.-J. (2020) The Epigenetic Roles of DNA N6-Methyladenine (6mA) Modification in Eukaryotes. *Cancer Letters*, **494**, 40–46.
85. Kriukienė, E., Tomkuvienė, M., Klimašauskas, S. (2024) 5-Hydroxymethylcytosine: The Many Faces of the Sixth Base of Mammalian DNA. *Chemical Society Reviews*, **53**, 2264–2283.

86. Oehler, J.B., Wright, H., Stark, Z., Mallett, A.J., Schmitz, U. (2023) The Application of Long-Read Sequencing in Clinical Settings. *Human genomics*, **17**, 73.
87. Ni, Y., Liu, X., Simeneh, Z.M., Yang, M., Li, R. (2023) Benchmarking of Nanopore R10.4 and R9.4.1 Flow Cells in Single-Cell Whole-Genome Amplification and Whole-Genome Shotgun Sequencing. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **21**, 2352–2364.
88. Berkovich, A.K., Pyshkina, O.A., Zorina, A.A., Rodin, V.A., Panova, T. V., Sergeev, V.G., Zvereva, M.E. (2024) Direct Determination of the Structure of Single Biopolymer Molecules Using Nanopore Sequencing. *Biochemistry (Moscow)*, **89**, S234–S248.
89. Hamilton, M.L., Van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A., Richardson, A. (2001) Does Oxidative Damage to DNA Increase with Age? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 10469–10474.
90. Cooke, M.S., Herbert, K.E., Butler, P.C., Lunec, J. (1998) Further Evidence for a Possible Role of Conformation in the Immunogenicity and Antigenicity of the Oxidative DNA Lesion, 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine. *Free Radical Research*, **28**, 459–469.
91. Cadet, J., Davies, K.J.A., Medeiros, M.H., Di Mascio, P., Wagner, J.R. (2017) Formation and Repair of Oxidatively Generated Damage in Cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, **107**, 13–34.
92. Chiorcea-Paquim, A.M. (2022) 8-Oxoguanine and 8-Oxodeoxyguanosine Biomarkers of Oxidative DNA Damage: A Review on HPLC–ECD Determination. *Molecules*, **27**, doi: 10.1099/mgen.0.001198.
93. Hartmann, S., Kist, T.B.L. (2018) A Review of Biomarkers of Alzheimer's Disease in Noninvasive Samples. *Biomarkers in medicine*, **12**, 677–690.
94. Radak, Z., Bori, Z., Koltai, E., Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Douroudos, I.I., Terzis, G., Nikolaidis, M.G., Chatzinikolaou, A., Sovatzidis, A., et al. (2011) Age-Dependent Changes in 8-Oxoguanine-DNA Glycosylase Activity Are Modulated by Adaptive Responses to Physical Exercise in Human Skeletal Muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, **51**, 417–423.
95. Stoddard, S., Riggleman, A., Carpenter, A., Baranova, A. (2020) The Detection of 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine in Circulating Cell-Free DNA: A Step Towards Longitudinal Monitoring of Health. *Advances in experimental medicine and biology*, **1241**, 125–138.
96. Koide, S., Kinoshita, Y., Ito, N., Kimura, J., Yokoyama, K., Karube, I. (2010) Determination of Human Serum 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) by HPLC-ECD Combined with Solid Phase Extraction (SPE). *Journal of Chromatography B*, **878**, 2163–2167.
97. Zou, Y., Ma, X., Chen, Q., Xu, E., Yu, J., Tang, Y., Wang, D., Yu, S., Qiu, L. (2023) Nightshift Work Can Induce Oxidative DNA Damage: A Pilot Study. *BMC Public Health*, **23**, 1–9.
98. А.А. Мельницкая, Л.В. Мачехина (2023) Калькуляторы биологического возраста: сложности трансляции в клиническую практику. *Проблемы геонауки*, 234–236.
99. Levine, M.E., Lu, A.T., Quach, A., Chen, B.H., Assimes, T.L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A.A., Stewart, J.D., Li, Y., et al. (2018) An Epigenetic Biomarker of Aging for Lifespan and Healthspan. *Aging*, **10**, 573–591.
100. Lu, A.T., Binder, A.M., Zhang, J., Yan, Q., Reiner, A.P., Cox, S.R., Corley, J., Harris, S.E., Kuo, P.-L., Moore, A.Z., et al. (2022) DNA Methylation GrimAge Version 2. *Aging*, **14**, 9484–9549.
101. Deelen, J., Kettunen, J., Fischer, K., van der Spek, A., Trompet, S., Kastenmüller, G., Boyd, A., Zierer, J., van den Akker, E.B., Ala-Korpela, M., et al. (2019) A Metabolic Profile of All-Cause Mortality Risk Identified in an Observational Study of 44,168 Individuals. *Nature Communications*, **10**, #3346.

102. Han, D.S.C., Lo, Y.M.D. (2021) The Nexus of CfDNA and Nuclease Biology. *Trends in Genetics*, **37**, 758–770.
103. Lo, Y.M.D., Han, D.S.C., Jiang, P., Chiu, R.W.K. (2021) Epigenetics, Fragmentomics, and Topology of Cell-Free DNA in Liquid Biopsies. *Science*, **372**, doi: 10.1126/science.aaw3616.