

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**  
Інститут високих технологій

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Олексій Юрійович Нипорко

Протокол №\_\_\_\_\_засідання кафедри

від “\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_2021 р.

**ЗВ’ЯЗОК МІЖ ВІКОМ ТА РІВНЕМ МЕТИЛЮВАННЯ CpG ДІЛЯНОК  
У ГЕНАХ ASPA, EDARADD, ELOVL2 ТА PDE4C**

Кваліфікаційна робота бакалавра  
денної форми навчання  
за спеціальністю 091 «Біологія»  
**Смялковської Валерії Вікторівни**

Науковий керівник від кафедри  
доцент **Самофалова Д. О.**

Робота виконана на базі лабораторії “Діаген”  
під керівництвом к.б.н. **Тарасової І. І.**

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2021 р.**

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота бакалавра містить 56 сторінок, 8 рисунків, 7 таблиць, 1 додаток, 125 джерел.

Старіння представляє собою комплексний процес, що має різні прояви навіть серед особин одного виду. У зв'язку з цим, існує необхідність створення нових та дослідження вже існуючих біомаркерів для прогнозування темпу старіння, та пов'язаних з ним наслідків.

В основі епігенетичних годинників лежить аналіз рівнів метилювання ДНК, що змінюються з плином часу та корелюють з віком. Епігенетичні годинники є нині найбільш точними предикторними моделями для оцінки віку.

У ході роботи була досліджена модель епігенетичного годинника Бекарта, яка включає в себе гени *ASPA*, *EDARADD*, *ELOVL2* та *PDE4C*. У представлений роботі продемонстровані результати аналізу моделі Бекарта на представниках населення України віком від 0 до 80 років.

Ключові слова: епігенетичний годинник, старіння, метилювання ДНК, біомаркери.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК - активні форми кисню

SASP - секреторний фенотип, асоційований зі старінням (senescence-associated secretory phenotype)

dNTP - дезоксинуклеозидтрифосфат (deoxyribonucleotide triphosphate)

ASPA - ген аспартоацилази (aspartoacylase)

EDARADD - EDAR-асоційований домен смерті (EDAR associated death domain)

ELOVL2 - елонгаза дуже довгих ланцюгів жирних кислот 2 (ELOVL fatty acid elongase 2)

PDE4C - фосфодіестераза 4C (phosphodiesterase 4C)

ASPA1 - позиція цитозину на 17 хромосомі: 3476273 нуклеотид

ASPA2 - позиція цитозину на 17 хромосомі: 3476237 нуклеотид

EDARADD1 - позиція цитозину на 1 хромосомі: 236557683 нуклеотид

EDARADD2 - позиція цитозину на 1 хромосомі: 236557695 нуклеотид

ELOVL21 - позиція цитозину на 6 хромосомі: 11044661 нуклеотид

ELOVL22 - позиція цитозину на 6 хромосомі: 11044655 нуклеотид

ELOVL23 - позиція цитозину на 6 хромосомі: 11044647 нуклеотид

ELOVL24 - позиція цитозину на 6 хромосомі: 11044644 нуклеотид

ELOVL25 - позиція цитозину на 6 хромосомі: 11044642 нуклеотид

ELOVL26 - позиція цитозину на 6 хромосомі: 11044640 нуклеотид

ELOVL27 - позиція цитозину на 6 хромосомі: 11044634 нуклеотид

PDE4C1 - позиція цитозину на 19 хромосомі: 18233106 нуклеотид

PDE4C2 - позиція цитозину на 19 хромосомі: 18233092 нуклеотид

PDE4C3 - позиція цитозину на 19 хромосомі: 18233083 нуклеотид

PDE4C4 - позиція цитозину на 19 хромосомі: 18233080 нуклеотид

PDE4C5 - позиція цитозину на 19 хромосомі: 18233071 нуклеотид

PDE4C6 - позиція цитозину на 19 хромосомі: 18233059 нуклеотид

PDE4C7 - позиція цитозину на 19 хромосомі: 18233049 нуклеотид

PDE4C8 - позиція цитозину на 19 хромосомі: 18233043 нуклеотид

MAD - середнє абсолютне відхилення (mean absolute deviation)

SEE - стандартна похибка вимірювань (standard error of the estimate)

PCP - відсоток коректних предикцій (percent of correct predictions)

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	6
<b>РОЗДІЛ I. Огляд літератури</b> .....	8
1.1. Старіння та його механізми .....	8
1.1.1. Геномна нестабільність .....	10
1.1.2. Виснаження теломер .....	11
1.1.3. порушення протеостазу .....	11
1.1.4. порушення розпізнавання поживних речовин.....	12
1.1.5. Мітохондріальна дисфункція.....	13
1.1.6. Клітинне старіння.....	14
1.1.7. Виснаження пулу стовбурових клітин.....	15
1.1.8. порушення міжклітинних комунікацій .....	15
1.1.9. Епігенетичні зміни .....	16
1.2. Епігенетичні годинники .....	17
1.2.1. Створення епігенетичних годинників.....	18
1.2.2. Різноманітність та використання епігенетичних годинників.....	20
<b>РОЗДІЛ II. Матеріали та методи досліджень</b> .....	23
2.1. Забір біоматеріалу та його збереження.....	23
2.2. Виділення ДНК.....	24
2.3. Бісульфітна конверсія .....	25
2.4. Полімеразна ланцюгова реакція .....	26
2.5. Піросеквенування.....	28
2.6. Аналіз та візуалізація даних.....	30
<b>РОЗДІЛ III. Результати та обговорення</b> .....	33
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	39
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	40

## ВСТУП

Старіння характеризується поступовим зниженням фізіологічних функцій та підвищенням вразливості до хвороб, що в підсумку призводить до смерті. Старіння є гетерогенним процесом, який має різні прояви та швидкість навіть у організмів одного віку, статі та виду [1].

У зв'язку з цим виділяють поняття хронологічного та біологічного віку. Хронологічний вік визначається від моменту народження особини, вимірюється в роках та є чітко детермінованим. Біологічний вік характеризує фізіологічний стан організму. Його значні відхилення від хронологічного можуть вказувати на ризик виникнення захворювань, передчасного старіння та смерті. [2]

Окрім медицини, визначення біологічного віку знаходить своє застосування також у галузях криміналістики та наукових досліджень. Зокрема, у наукових експериментах визначення біологічного віку може спростити дослідження впливу нових та вже існуючих препаратів, доведення їх ефективності тощо.

Проте, на сьогоднішній день не існує доступних діагностичних інструментів, що здатні чітко визначати біологічний вік. Тож наразі відбувається пошук потенційних біомаркерів. Серед вже існуючих їх можна розділити на такі основні групи: фізіологічні, клінічні, антропометричні, цифрові, біохімічні, клітинні та молекулярні, омічні біомаркери [3].

Нині епігенетичні годинники є найбільш перспективними у дослідженні біомаркерів. Це моделі, в основі яких лежить дослідження змін рівнів метилювання ДНК. Дослідження рівнів метилювання певної кількості генів у комбінації зі статистичною моделлю створює можливість передбачення віку організму з високою точністю. Найбільш відомими серед таких моделей є годинник Хорвата, у якому задіяно 353 CpG ділянок та годинник Ханнума, у якому для аналізу використовуюється 71 цитозиновий нуклеотид. Дані годинники демонструють високу точність (MAD складає 3,6 та 3,9 років

відповідно). Проте, у зв'язку з об'ємом необхідних досліджень, дані годинники недоступні для широкого використання. Постає потреба в дослідженні відносно недорогих та точних годинників для прикладного використання, тому **ця робота є актуальною**.

Одним з найкращих варіантів у співвідношенні доступності та точності є епігенетичний годинник описаний в публікації Beckaert et al (далі модель Бекарта) [4]. У модель залучено 4 цитозини 4 генів: *ASPA*, *EDARADD*, *ELOVL2* та *PDE4C*. У оригінальному дослідженні MAD складає 3,95 років, а коефіцієнт детермінованості  $R^2$  досягає значення 0,95 [4].

**Метою** роботи є аналіз рівнів метилювання CpG ділянок у генах *ASPA*, *EDARADD*, *ELOVL2* та *PDE4C* з подальшим розрахунком передбаченого біологічного віку за моделлю Бекарта у представників населення України.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні **задачі**:

1. Сформувані вибірку з рівномірним віковим розподілом для обох статей.
2. Дослідити модель Бекарта на жителях України, встановити показники її точності (коефіцієнт Пірсона  $r$ , коефіцієнт детермінації  $R^2$ , MAD, SEE та PCP).
3. Порівняти отримані в ході дослідження дані з даними, описаними в публікаціях Beckaert et al та Daunay et al.
4. Дослідити вплив статі на показники моделі.

**Новизна** роботи полягає у дослідженні моделі Бекарта на жителях України у віковому діапазоні 0 - 80 років.

# РОЗДІЛ І

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Старіння та його механізми

Старіння можна охарактеризувати як комплексний динамічний процес, що відбувається практично в усіх живих організмах протягом індивідуального розвитку з плином часу. Його результатом є необоротні молекулярні та клітинні зміни, що порушують функціонування тканин та органів, роблячи організм слабким, більш сприйнятливим до хвороб та смерті. Швидкість та прояви цього процесу є індивідуальними та визначаються генетичними показниками, умовами зовнішнього середовища та способом життя [1, 2, 5].

Даний процес є гетерогенним та гетерохронним. Як гетерогенний процес, старіння відбувається з різною швидкістю поміж видів, і навіть особини одного виду можуть старіти з різною швидкістю. Асинхронність з якою різні клітини та тканини одного організму старіють, підкреслює гетерохронну природу старіння [6].

У зв'язку з цим можна виділити хронологічний та біологічний вік. Хронологічний вік визначається від моменту народження, є чітко детермінованим. Біологічний вік краще відображає фізіологічний стан організму, може визначатися за наявністю хвороб та, якістю фізичних та когнітивних функцій [7].

Через індивідуальний характер людського старіння, важко детермінувати, у якому віці людина вважається старою. Всесвітня організація з охорони здоров'я (ВООЗ) визнала хронологічний вік у 60 років перехідною межею до похилого віку. Даний віковий поріг прийнятий у всіх країнах Європи. Тоді як Організація об'єднаних націй (ООН) за такий визнає вік у 65 років. Даний віковий ліміт визнається Сполученими штатами Америки та Великобританією.

Леонард Хейфлік вважав, що старіння може спричинятися двома типами факторів: реалізацією певної програми, закладеної у геномі живих організмів, або ж порушеннями у злагодженій системі молекулярної машинерії, які є результатом стохастичних подій у ході життєдіяльності [6].

З плином часу, дана теорія була розвинута декількома групами вчених, результати роботи яких були систематизовані та доповнені в статті [7-10], які описали 9 основних ознак старіння (рис. 1.1). Варто відмітити, що для віднесення певного процесу до такого, що відбувається за старіння, він повинен відповідати таким критеріям: 1) проявляється під час нормального старіння; 2) його експериментальне загострення прискорює старіння; 3) його експериментальне полегшення має зменшувати швидкість старіння і, відповідно, збільшувати тривалість життя [7].

На даний момент, цим критеріям відповідає 9 основних ознак старіння: геномна нестабільність, виснаження теломер, епігенетичні зміни, порушення проетостазу, розпізнавання поживних речовин та міжклітинної комунікації, мітохондріальна дисфункція, клітинне старіння та вичерпання пулу стовбурових клітин.



**Рисунок 1.1.** Ознаки старіння [7]

### **1.1.1. Геномна нестабільність**

ДНК людини постійно піддається впливам різноманітних мутагенних факторів екзогенної (радіація та хімікати) та ендогенної (наприклад, побічні продукти синтезу енергії електронтранспортним ланцюгом) природи [11-18]. Помилки репараційних систем ДНК, що виникають та акумулюються з часом, ведуть до значної частоти мутацій, хромосомних аберацій та анеуплоїдії. Така геномна нестабільність може призводити до розвитку ракових та певних дегенеративних захворювань, як хвороба Альцгеймера [19-21].

Наприклад, подвійні розриви ДНК, одні з найбільш критичних пошкоджень для життєдіяльності клітин [22, 23], можуть бути виявлені

імунолокалізацією індукованого пошкодженнями ДНК гістону  $\gamma$ -H2AX (фосфорильована форма гістону H2AX) або інших білків репараційної машинерії [24].

Більш точна детекція пошкоджень ДНК може виконуватися секвенуванням ДНК. Однак, кожна клітина акумулює різні мутації, що значно ускладнює задачу. Для оцінки кількості та швидкості утворення мутацій проводять одноклітинне секвенування ДНК [25].

### **1.1.2. Виснаження теломер**

Теломери - це послідовності нуклеотидних повторів, які захищають кінці хромосом та підвищують геномну стабільність [26]. Дисфункція теломер та теломерази у комплексі з геномною нестабільністю є грає важливу роль у старінні на клітинному рівні [27, 28]. ДНК-полімераза нездатна до повної реплікації теломерних кінців ДНК, у зв'язку з чим кожний поділ клітини веде до вкорочення даних ділянок [29]. Також втрата теломерних повторів може відбуватися під впливом оксидативного стресу [30]. Щоб вкорочення торкнулося кодуючих ділянок ДНК, клітина входить у стан реплікативного старіння (replicative senescence) після певної кількості поділів [31].

Вкорочення теломер пов'язане з багатьма хворобами, асоційованими з віком, серед яких остеоартрит, атеросклероз, коронарна хвороба серця та фібриляція передсердь [32-34]. Було продемонстровано, що довгожителі мають більш довгі теломери у порівнянні з контрольною групою [35, 36].

На сьогодні відомі різноманітні методи детекції довжини теломер у клітинах. Проте жодна з методик не є придатною для оцінки віку у зв'язку з гетерогенністю між клітинами та особинами, а також через значну похибку вимірів [37-39].

### **1.1.3. Порушення протеостазу**

Протеостаз - це набір клітинних механізмів, залучених у підтримку гомеостазу протеому, синтезу та перетворення протеїнів. Функції протеостазу включають запобігання неправильного згортання та агрегації пошкоджених та нефункціональних поліпептидів, що спричиняють багато хвороб, асоційованих з віком (наприклад, хвороби Альцгеймера та Паркінсона, катаракта) [40-42].

Протеостаз підтримується шаперон-індукованим фолдингом, протеасомною деградацією та аутофагією. Порушення в будь-якого з цих процесів може призвести до білкової агрегації та протеотоксичних ефектів [7]. Активація протеасом уповільнює старіння *in vivo* та *in vitro* у різних модельних тварин і є еволюційно консервативним механізмом [43]. Висока протеасомна активність спостерігається у довгожителів, і даний механізм був встановлений одним з основних за здорового старіння [44]. Аутофагія - це опосередкована лізосомами деградація компонентів цитозолу, клітинний механізм очищення від неправильно згорнутих протеїнів, пошкоджених органел та внутрішньоклітинних патогенів [45]. Аутофагія є більш функціональною у довгожителів [46, 47].

Порушення протеостазу можуть бути виявлені безпосередньо за формування агрегатів, як впорядкованих (бета-амілоїдів та гіперфосфорильованого білка tau у хворобі Альцгеймера), так і аморфних ( $\alpha$ -кристалін за катаракти). До непрямих способів детекції відносяться моніторинг підвищеної експресії білків протеостатичної машинерії (шаперон Hsp70 як маркер оксидативного стресу) [48].

#### **1.1.4. Порушення розпізнавання поживних речовин**

Здатність використовувати поживні речовини у метаболічних процесах є важливою на клітинному рівні і збої у їх залученні порушують клітинний гомеостаз [49]. На клітинному рівні це відбувається переважно через порушення в шляхах сприйняття поживних речовин, які беруть активну участь

у старінні, таких як mTOR, АМФ-активована протеїнкіназа (AMP sensor), білкові деацетилази сіртуїни (регулюються NAD+) та інсулін/інсуліноподібний фактор росту 1(IGF-1) сигнальні шляхи [50].

Рівень глюкози у крові первинно контролюється інсуліном, на рівень якого впливає стан  $\beta$ -клітин Лангерганса. Метаболізм глюкози часто погіршується з віком через периферичну резистентність до інсуліну, особливо у скелетних м'язах та жировій тканині [51]. Популяційні дослідження показали, що довгожителі мають вищу чутливість до інсуліну та краще функціонуючі  $\beta$ -клітини, ніж молодші контролі [52], що свідчить про важливість нормального енергетичного обміну для здорового старіння. Біомаркери порушення метаболізму глюкози, особливо глікованого гемоглобіну HbA1C, які використовують для діагностики цукрового діабету, можуть також застосовуватися як прогностичні біомаркери старіння [53]. Однак, враховуючи складність регулювання рівня глюкози та інсуліну, отримані дані може бути важко інтерпретувати [54].

### **1.1.5. Мітохондріальна дисфункція**

Вільнорадикальна теорія старіння стверджує, що через постійну експозицію активними формами кисню (АФК), мітохондріальна ДНК чутлива до оксидативного стресу та старіння [56]. АФК здатні окиснювати та пошкоджувати білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти. Накопичення соматичних мутацій у генах (нуклеарних та мітохондріальних), що кодують компоненти електронтранспортного ланцюга, призводить до порушення окисного фосфорилування. Внаслідок цього знижується синтез АТФ та збільшується утворення АФК [57]. Спостережуване зниження синтезу АТФ з віком (приблизно 8% на десятиліття) спричиняє дефіцит енергії та, ймовірно, є однією з причин зниження фізичної працездатності з віком [57].

Оксидативний стрес може бути вимірний безпосередньо шляхом детекції АФК або продуктів окиснення біологічних макромолекул. Вони є

більш стабільними за АФК і перебувають у біологічних рідинах та тканинах у достатніх для детекції концентраціях [58, 59]. Переважними продуктами окисного пошкодження нуклеїнових кислот є 8-оксо-2'-дезоксигуанізин (8-oxodG), 8-гідрокси-2'-дезоксигуанізин (8-OHdG) та 8-гідроксигуанізин (8-OHG) [60]. Надійним маркером ліпідної пероксидації є 8-ізопростагландин F2 $\alpha$  (F2-isoprostane), що є продуктом пероксидації арахідонової кислоти та інших ненасичених жирних кислот, представлених у фосфоліпідних мембранах [61]. Концентрація маркерів окиснення ДНК та ліпідів зростає з віком та грає важливу роль у ряді захворювань, які часто зустрічаються у літніх пацієнтів [60].

### **1.1.6. Клітинне старіння**

Клітинне старіння - це незворотній процес, у якому клітина зупиняє поділ та піддається специфічним фенотиповим змінам, включаючи зміни хроматинової організації ДНК та секретому [62]. Клітина переходить у стан сенесценції у відповідь на пошкодження ДНК, що можуть бути викликані стресом чи АФК, виснаженням теломер, активацією онкогенів чи деактивацією пухлинних супресорів [63]. Сенесцентні клітини секретують різноманітні прозапальні цитокіни, матриксні металопротеїнази, інтерлейкіни та фактори росту, формуючи риси секреторного фенотипу, пов'язаного зі старінням (SASP) [64].

Вважається, що тривале накопичення старіючих клітин з віком впливає на здатність тканин відновлюватися і сприяє таким віковим процесам, як виснаження стовбурових клітин, імуносенесценція, запалення та різні хронічні захворювання [65]. Фактори SASP можуть також спричинити зляквісну трансформацію оточуючих клітин, а отже, сприяти утворенню пухлини [66].

Унікальні властивості сенесцентних клітин формують основу для їхньої ідентифікації за допомогою специфічних біомаркерів. Морфологічні зміни,

що можуть бути детектовані, включають великі розміри, сплюснуту форму та неорганізовану ядерну мембрану (через зниження експресії ламіну B1) [67]. Активність лізосомальної  $\beta$ -галактозидази ( $\beta$ -gal) є найбільш застосовуваним маркером старіння клітин [68], що демонструє накопичення небажаних макромолекул та агрегатів у клітинах що не діляться, але є метаболічно активними. Також активність  $\beta$ -gal було запропоновано використовувати в якості біомаркера старіння [69]. Але, оскільки скринінг сенесцентних клітин потребує втручання у організм людини, що у свою чергу значно ускладнює задачу.

### **1.1.7. Виснаження пулу стовбурових клітин**

Тканини людини різною мірою потребують відновлення, що забезпечується стовбуровими клітинами. Виснаження пулу стовбурових клітин впливає на здатність до відновлення пошкоджень та розвиток хвороб [70]. Наприклад, недостача мезенхімальних стовбурових клітин призводить до остеопорозу та переломів [71], виснаження стовбурових клітин кишечника є причиною погіршення його функціонування [72, 73].

Нині не існує достовірних маркерів чисельності стовбурових клітин. Проте, було продемонстровано, що чисельність циркулюючих гематопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників (підрахунок CD34+ клітин) у похилому віці є кращим предиктором тривалості життя та смертності від серцево-судинних захворювань, ніж класичні серцево-судинні фактори ризику [74].

### **1.1.8. Порушення міжклітинних комунікацій**

Під час старіння відбувається порушення міжклітинних комунікацій. З віком кількість запальних реакцій збільшується, тоді як інші сигнальні шляхи зазнають дисфункції (ендокринна, нервова та імунна системи) [75-77]. Це може бути помітно за нейрогормональними змінами, такими як дерегуляція системи ренін-ангіотензин, або відповіді інсулінового ростового фактору на інсулін [7]. Кількість запальних реакцій збільшується з віком, тоді як стійкість імунітету проти патогенів та передракових клітин падає. Хронічне системне запалення та імуносенесценція пов'язані у патогенезі передчасного старіння [78]. Вони дають початок іншим хворобам, асоційованим з віком, таким як діабет, артрит, метаболічний синдром та захворювання серцево-судинної системи [79].

### **1.1.9. Епігенетичні зміни**

Епігенетичні механізми оборотно впливають рівень експресії генів без зміни послідовності ДНК, які виникають у відповідь на фактори зовнішнього середовища. Епігенетичні механізми включають метилювання ДНК, ремоделінг хроматину та некодуючі РНК [80].

Гістонові модифікації включають в себе різноманітні ковалентні, оборотні хімічні реакції (основними є ацетилювання, метилювання та фосфорилування), які приєднують або від'єднують певні фрагменти до амінокислотних залишків гістонових октамерів. Втрата або накопичення специфічних гістон-модифікуючих протеїнів, таких як гістонові деацетилази або метилтрансферази, дестабілізує хроматин та експресію генів, що за характером схоже на патерни генетичної нестабільності за раку [81].

Некодуючі РНК також грають важливу роль у сайленсі генів та їх регуляції шляхом РНК-інтерференції. МікроРНК є найбільш вивченим класом коротких (приблизно 22 нуклеотиди) одноланцюгових РНК, які регулюють експресію 30-60% генів людини [82]. Серед них є гени сигнальних шляхів інсуліноподібного фактору 1 (ІФР-1, IGF-1) та TOR (target of

гаратусін), роль яких у старінні була описана вище. Окрім клітин, міРНК можуть циркулювати у крові, сечі та слині у складі екзосом або у комплексі з білками чи ліпопротеїновими факторами [83]. У людей велика кількість міРНК піддаються даун- чи апрегуляції з віком у цільній крові, сироватці та мононуклеарних клітинах периферичної крові [84-86]. Також, була створена перша предикторна модель на основі міРНК [87].

Метилування ДНК у ссавців опосередковується приєднанням метильної групи до цитозину, переважно у складі CpG острівців. Таким чином відбувається негативна регуляція експресії генів шляхом механічного перешкоджання доступу до гену та рекрутингу необхідних ферментів [88]. Було продемонстровано, що загальний рівень метилування ДНК повільно знижується з віком, тоді як певні CpG динуклеотиди можуть ставати як гіпер-, так і гіпозаметильованими [89, 90]. Значний прорив у вимірах біологічного віку було зроблено з розвитком “епігенетичних годинників”, у основі яких лежить кореляція між хронологічним віком та рівнем метилування відібраних CpG ділянок. Сьогодні годинники метилування є найбільш точними предикторами віку [91].

## **1.2. Епігенетичні годинники**

Епігенетичні годинники описують патерни змін у метилуванні ДНК з часом, у певних цитозин-гуанінових динуклеотидах (CpG сайтах), у геномі. Було неодноразово продемонстровано асоційовані з віком зміни у метиломі ДНК [92]. Наприклад, рівні метилування ДНК підвищуються з віком у певних CpG ділянках або навпаки, знижуються [93-103]. На основі таких змін, які виникають відносно послідовно між особинами, були створені так звані годинники метилування ДНК, які вимірюють хронологічний вік донора [89, 104, 105].

Відхилення епігенетичного віку від хронологічного передбачає можливі хвороби та ризик смерті краще, ніж хронологічний вік сам по собі. Наприклад,

підвищення епігенетичного віку крові здатно передбачити вірогідність раку легень [106], інші види раку та смертність від них [107, 108]. Епігенетичний вік хрящів, аналізованих годинником Хорвата, був вище від хронологічного за остеоартриту [109]. Тому, епігенетичні годинники можуть вказувати на фундаментальні молекулярні процеси, пов'язані з біологічним віком, та слугувати потужним інструментом для дослідження стану здоров'я, розвитку та старіння впродовж життя.

### **1.2.1. Створення епігенетичних годинників**

Епігенетичні годинники поєднують у собі два аспекти. Перший включає в себе закономірні епігенетичні зміни та їх характер. Для цього переважно використовують рівні метилювання ДНК [110]. Другим аспектом є створена на основі епігенетичних змін статистична модель, яка надає годиннику функцію предиктора [89].

Для створення епігенетичного годинника використовують контрольоване машинне навчання та епігеномний пошук асоціацій. Найбільш відомі епігенетичні годинники були створені з використанням контрольованого машинного навчання [89]. Даний метод потребує стадій тренування та тестування. Годинник “тренується” створенням великого масиву даних, що містить у собі значення метилювання ДНК багатьох зразків та інших чинників (хронологічний вік особи від якої отримали зразок тощо). Різноманітність та розмір зразків є важливим для тренування моделі, яка пізніше може бути узагальнена для подальшого використання [111]. Тренування починається з “перенасиченої” моделі, у якій число предикторів (наприклад, масштабовані рівні метилювання ДНК для усіх доступних сайтів) значно перевищує число зразків. Методи пеналізованої регресії (ridge, lasso, або elastic net) потім або зменшують (тобто регулюють) коефіцієнти, або “soft-threshold” коефіцієнти нижче абсолютного значення до нуля. Регулюючі коефіцієнти зменшують похибку фінальної моделі, роблячи її більш надійною

при застосуванні у інших випадках. Soft-thresholding до нуля також є формою вибору функції, такий, що в остаточній моделі зберігаються лише найбільш інформативні предиктори (тобто сайти CpG), які й відбираються для фінальної моделі. “Shrinkage penalty”, яке визначає ефективність регуляризації та трешхолдингу, може бути “налаштоване” моделями наближення через “penalty values” та обчислення помилки за допомогою методів передискретизації, таких як “bootstrapping” або k-кратна перехресна валідація [111]. Результатом є рівняння - як набір CpG, так і пов’язані з ними коефіцієнти - які можуть бути використані для передбачення вікових результатів (наприклад, хронологічного віку) у нових зразках тканин чи особин.

Валідація нової моделі з використанням нових зразків з відомими результатами називається тестуванням [111]. Тестування епігенетичних годинників дозволяє дослідникам визначити його точність. Наприклад, один з найкраще вивчених годинників був створений Стівом Хорватом [89], який тренував свій годинник з використанням 21369 проб з 3921 зразків, отриманих з 39 наборів даних, що включають 27 різних тканин. Його модель аналізує рівні метилювання ДНК у 353 CpG сайтах. Потім цей годинник був протестований на 3211 нових зразках, отриманих з 42 різних дослідів та 22 тканин [89]. Оскільки він був тренований на даних, отриманих з різних тканин, годинник Хорвата демонструє видатну точність аналізу різних тканин, що характеризується досить низьким MAD (3,6 років у діапазоні від 0 до 100 років) [89]. Після тренування та тестування, годинник може бути використаний у різноманітних дослідженнях.

Також для створення годинників використовують пошук найсильніших кореляцій між метилюванням ДНК та хронологічним віком, що базується на дослідженнях епігеномного пошуку асоціацій [109, 112, 113, 114]. Геноми ссавців містять десятки тисяч CpG сайтів, що корелюють з хронологічним віком [115, 116].

Створення таких годинників не потребує біоінформатичних навичок та дозволяє використовувати меншу кількість CpG сайтів у моделі, що зменшує її вартість. Однак невідомо, чи демонструють годинники, побудовані таким чином, однакову точність і надійність за різного генетичного бекграунду, вікових діапазонів, типів тканин тощо так само, як годинники з більшою кількістю CpG сайтів.

### **1.2.2. Різноманітність та використання епігенетичних годинників**

У 2011 Bocklandt et al. створили перший предиктор епігенетичного віку, оснований на 88 цитозин-гуанінових нуклеотидах, які знаходяться в межах 80 асоційованих з віком genaх, або поруч з ними шляхом скринінгу повногеномних даних масиву зразків слини однакових пар близнюків. MAD даної одноканинної моделі складає 5,2 роки [117]. Щоб розширити діапазон тканин для аналізу, в тому же році, Koch et al. запровадили модель, що складалася з 5 CpG сайтів. Даний сет був здатний демонструвати вікові зміни метилювання ДНК у всіх аналізованих тканинах, включаючи фібробласти, кератиноцити, епітеліальні клітини, моноцити, лейкоцити, гемопоетичні клітини-попередники, клітини букального епітелію, цільну кров тощо [118]. Середнє абсолютне відхилення складало приблизно 11 років.

У 2013 році модель Hannum et al. була продемонстрована як оцінювач хронологічного віку у зразках крові, основана на 71 CpG сайті. Модель характеризується високою точністю, показуючи під час стадії тренування 96% кореляцію між актуальним та передбаченим віком та  $MAD = 3,9$  років [115]. Модель була валідована на різних незалежних датасетах та тканинах грудей, нирок, легенів та шкіри. Модель Hannum et al. демонструє значну вікову предикторну здатність і включає дві CpG ділянки гену ELOVL2, що пов'язаний з відповіддю на фотостаріння у шкірі людини і найбільше серед усіх кандидатів корелює з віком [115, 119, 120, 121].

Найбільш універсальною моделлю епігенетичного годинника є створена Хорватом у 2013 році. Вона може бути використана на 51 типі тканин та клітин з кореляцією 96% та MAD = 3,6 років. У модель залучені 353 CpG ділянки, що включають 193 гіперметильованих та 160 гіпометильованих сайтів, що були відібрані шляхом методу пеналізованої регресії (elastic net). Додатково, для оптимізації годинника з метою використання у наукових дослідженнях та роботі з культурами клітин, Хорват розробив специфічний годинник для передбачення віку фібробластів, кератиноцитів, букальних та ендотеліальних клітин, зразків шкіри та крові [122].

Більш того, для створення специфічного епігенетичного калькулятора для педіатрії, McEwen et al. використав дані метилювання ДНК з неінвазивних зразків букального епітелію та створив Pediatric-BuccalEpigenetic (PedBE) годинник. Даний одноканінний годинник залучає для аналізу 94 цитозинових ділянки і нині є найбільш точним для визначення епігенетичного віку у дітей. Цей метод був запропонований як референсний для епігенетичних досліджень та вікової оцінки як відображення прогресу чи затримки в розвитку [123].

Для спрощення процесу оцінки віку, з використанням сайт-специфічного аналізу метилому ДНК, модель, основана на статусі метилювання лише 3 вікових CpG ділянок була створена. Важливим моментом цієї моделі є використання бісульфитного піросеквенування для аналізу рівнів метилювання замість технології “bead-chip” [113]. Такий тип вікових предикторів є особливо важливим для криміналістики, яка потребує швидкого та чіткого аналізу за умов малої кількості матеріалу.

У напрямку більш простого та дешевого, але в той час високоточного методу, були створені епігенетичні моделі Збієць-Пекарської та Бекарта. Епігенетичний годинник Збієць-Пекарської, заснований лише на двох CpG ділянках гену ELOVL2, демонструє високий коефіцієнт кореляції  $R^2 = 0,859$  та середнє абсолютне відхилення у 5,75 років. Модель дозволяє досліджувати зразки та плями крові з високою точністю навіть за тривалого збереження при

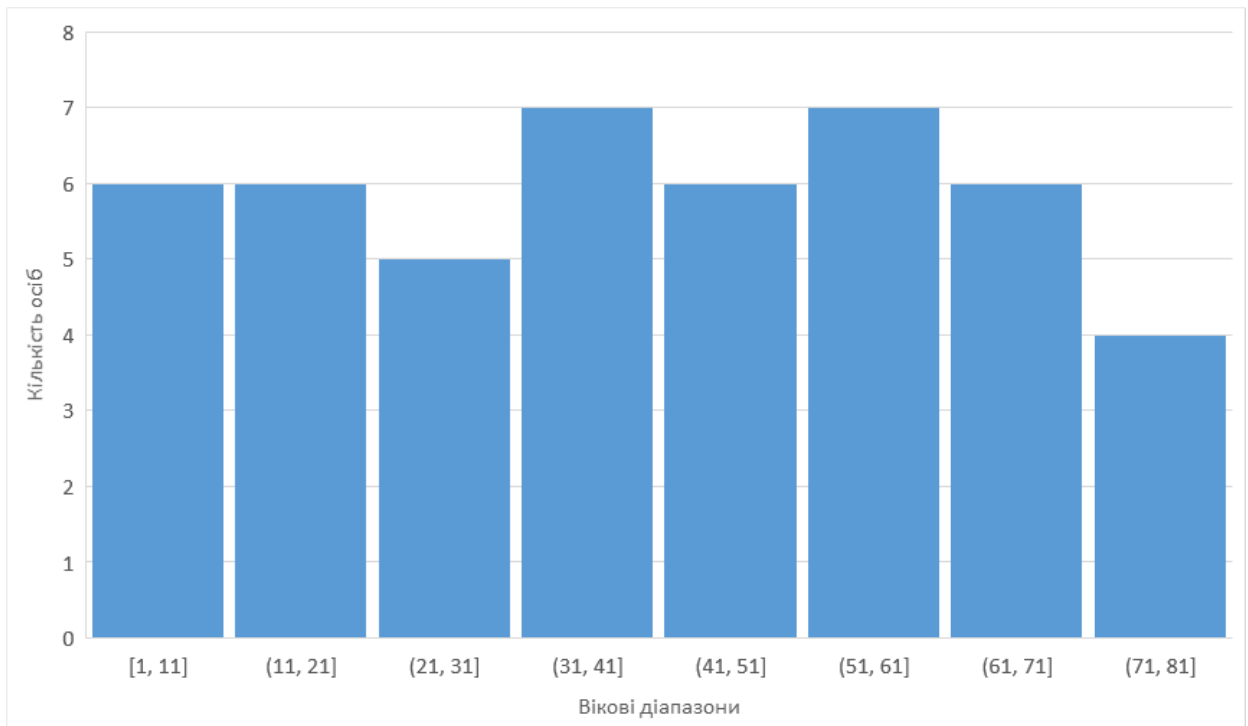
кімнатній температурі [121]. Модель Бекарта базується на 4 асоційованих з віком генах, а саме *ASPA*, *EDARADD*, *ELOVL2* та *PDE4C*. За аналізування зразків крові коефіцієнт кореляції  $R^2$  досягає 0,95, а MAD складає 3,75 роки. Додатково був проведений аналіз 29 зразків зубів, який показав коефіцієнт достовірності  $R^2 = 0,74$  та  $MAD = 4,86$  роки [4].

## РОЗДІЛ II

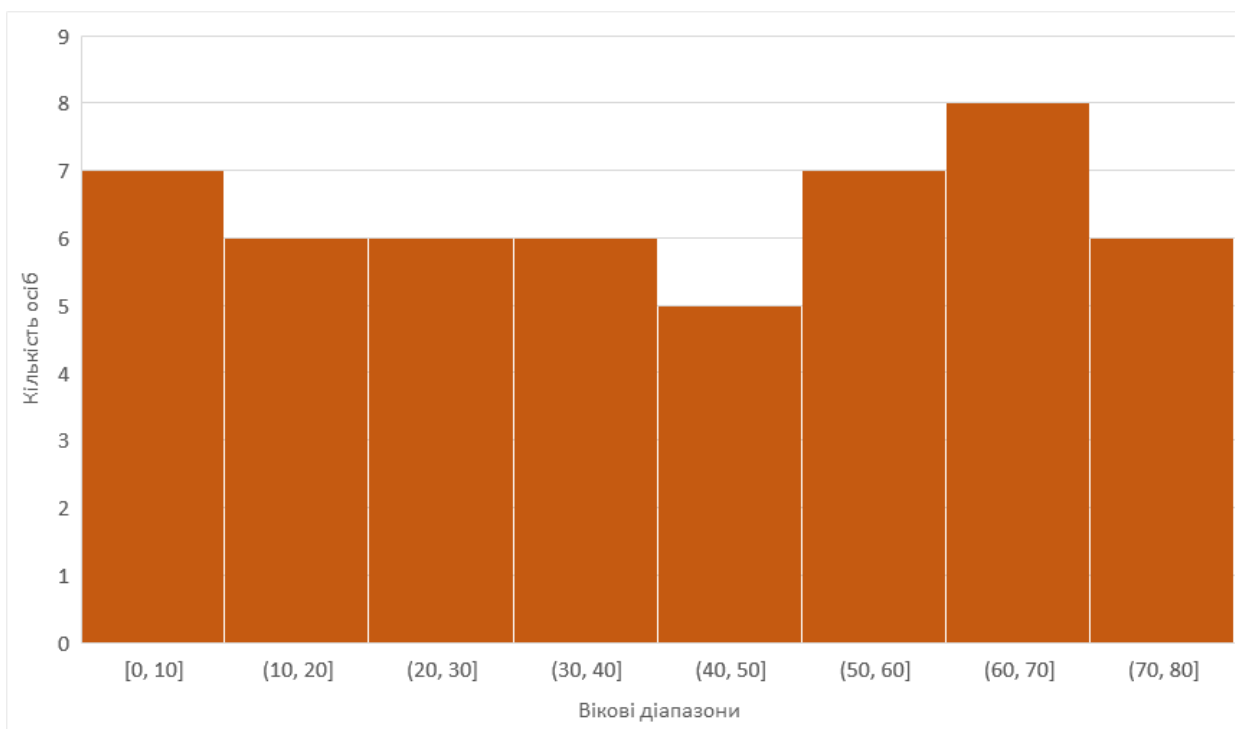
### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Забір біоматеріалу та його збереження

У дослідженні взяло участь 98 осіб, серед яких 47 чоловіків та 51 жінка. Віковий діапазон становив 0-80 років, середній вік вибірки становить 40,8 років, медіана - 41 рік. Розподіл вибірки за віком для обох статей продемонстровано на рис. 2.1 та 2.2.



**Рис. 2.1.** Розподіл вибірки за віком (чоловіча стать,  $n = 47$ , крок складає 10 років).



**Рис. 2.2.** Розподіл вибірки за віком (жіноча стать,  $n = 51$ , крок становить 10 років).

Після отримання письмової згоди був проведений забір цільної крові у пробірки об'ємом 2 мл з ЕДТА/КЗ. Отриманий біоматеріал зберігався на температурі  $+4^{\circ}\text{C}$  не більше місяця перед подальшою обробкою.

## 2.2. Виділення ДНК

Виділення ДНК з біоматеріалу проводилось з використанням набору для екстракції ДНК “АмпліПрайм ДНК-сорб-В” (Amplisens, Росія). Шляхом додавання лізуючого розчину та дії високих температур відбувається руйнування клітинних структур та вивільнення ДНК у розчин. Після лізису клітин у розчин додається сорбент (силіка), з яким зв'язується ДНК. Інші компоненти лізованого матеріалу видаляються центрифугуванням та послідовними відмивками сорбенту. При додаванні елюючого розчину відбувається перехід ДНК з поверхні сорбенту у розчин, що підсилюється

впливом високої температури та центрифугування. Надосадова рідина містить виділену ДНК та готова для подальшого аналізу.

Визначення концентрації ДНК у отриманому зразку проводилося спектрофотометричним методом на приладі DeNovix DS-11 (DeNovix, США). Середній вихід виділення ДНК складає 35 нг/мкл.

### 2.3. Бісульфітна конверсія

Під час бісульфітної конверсії відбувається взаємодія бісульфіту з цитозиновими нуклеотидами у складі одноланцюгової ДНК. Якщо цитозин містить метильну мітку, реакція не відбудеться, тоді як незаметильований цитозин прореагує та перетвориться на урацил (див. рис. 2.1).

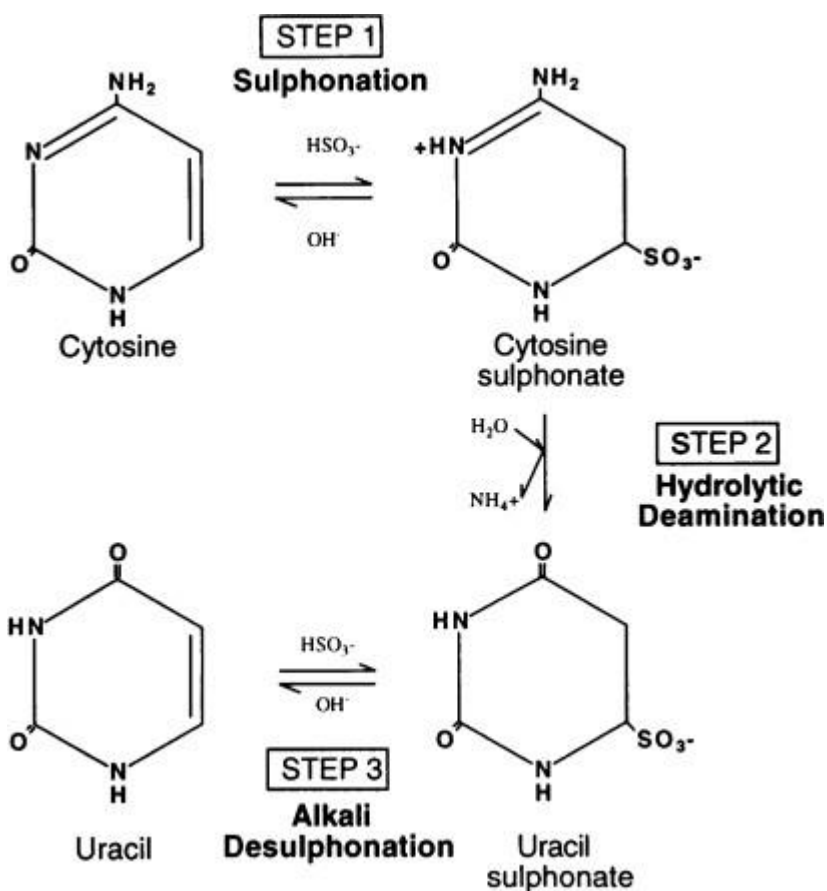


Рис. 2.1. Схема реакції бісульфітної конверсії [124].

Для проведення бісульфитної конверсії був застосований набір “EZ DNA Methylation Kit” (Zymo Research, США). Першим етапом є інкубація ДНК (приблизно 500 нг на реакцію) з M-Dilution Buffer за температури 37°C. Під час інкубації відбувається взаємодія компонентів буферу зі зразком та роз’єднання ланцюгів ДНК. Далі до зразку додається CT Conversion Reagent і реакційна суміш інкубується 12-16 годин при 50°C у темряві.

Наступним кроком є очистка зразка, яка проводиться з використанням спін-колонок. Вона включає в себе декілька стадій відмивки, десульфонування та елюції з центрифугуванням після кожного етапу. Кінцевий продукт об’ємом 20 мкл готовий для подальших маніпуляцій.

#### 2.4. Полімеразна ланцюгова реакція

Для покращення якості аналізу виконується ампліфікація необхідних ділянок генів методом ПЛР. Реакційна суміш містить у собі 10 мкл ПЛР-міксу (СИНТОЛ, Росія), 12,5 мкл деіонізованої води, 0,5 мкл праймерів (Metabion, Німеччина) та 2 мкл ДНК після бісульфитної конверсії. З метою запобігання випаровування суміші додається крапля мінерального масла. Послідовності праймерів вказані у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Послідовності праймерів та їх температури відпалу

Ген	Опис праймеру	Послідовність	Температура плавлення, °C
ASPA	Прямий	5'-Biotin- ATTATTTGGTGAA ATGATT-3'	52
	Зворотний	5'- CAACCSTATTTCTC TAAATCTC-3'	

<i>EDARADD</i>	Прямий	5'-Biotin- CCACCTACAAAT TCCCCAAA-3'	56
	Зворотний	5'- TTGGTGATTAGG AGTTTTAGTGTTT T-3'	
<i>ELOVL2</i>	Прямий	5'-Biotin- AGGGGAGTAGGG TAAGTGAGG-3'	60
	Зворотний	5'- AACAAAACCATT TCCCCСТААТАТ- 3'	
<i>PDE4C</i>	Прямий	5'-Biotin- AACTCAAATCCC TCTC-3'	54
	Зворотний	5'- AGGTTTGTAGTA GGTTGAG-3'	

Умови ПЛР вказані у табл. 2.2.

**Таблиця 2.2**

**Умови ПЛР**

Температура, °C	Час, хв	Кількість циклів
95	10	1
95	0,3	50
Температура плавлення (описана у табл. 2.1)	0,3	
72	0,3	
72	5	1

ПЛР проводилась на ампліфікаторі CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США).

## 2.5. Піросеквенування

Піросеквенування - метод секвенування ДНК, що відбувається шляхом синтезу другого ланцюга. До аналітичної суміші один за одним додаються нуклеозидтрифосфати (dNTPs) та субстрат з ензимом. Якщо доданий dNTP підходить за принципом комплементарності до аналізованого ланцюга, під час його приєднання вивільняється пірофосфат, який запускає каскад ферментативних реакцій, результатом якого є світіння, що і детектується приладом. Якщо dNTP не вбудовується у ланцюг, відповідно, світіння не спостерігається. Цей dNTP видаляється з суміші для подання наступного.

Піросеквенування проводилося на приладі PyroMark Q24 (Qiagen, Німеччина). Перед стартом піросеквенування необхідно провести іммобілізацію ДНК на частинках сефарози (GE Healthcare, США). Приготований розчин сефарози, що містить у собі дистильовану воду, Annealing buffer та сефарозу, розноситься у лунки по 75 мкл. До нього додається отриманий раніше ПЦР-продукт у об'ємі 10 мкл. На початку ланцюга він містить біотинові мітки, якими відбувається приєднання до частинок сефарози. Щоб пришвидшити та покращити даний процес, суміш сефарози та продукту 15 хв перемішується на шейкері.

З метою очистки комплексу сефарози з ДНК від сторонніх компонентів у комплекті PyroMark Q24 є робоча станція. До її складу входять ванночки для буферів та вакуумна установка з 24 стрижнями, що на кінцях мають мембрани для запобігання пропусканню частинок сефарози всередину. Вакуумною установкою виконується збирання сефарози на кінцях стрижнів та видалення

розчину, у якому вона знаходилася. За рахунок створеного тиску частинки добре тримаються на стрижнях, що дозволяє виконувати з ними подальші маніпуляції. Таким чином сефароза промивається у воді, 70% спирті, денатуруючому та відмивочному буферах.

Наступним кроком є занурення сефарози у плашку з праймерами для піросеквенування. Праймери (Metabion, Германія) розчинені у Annealing buffer до концентрації 4 мкмоль, додаються у лунки по 25 мкл. Послідовності праймерів та послідовностей для аналізу наведені у табл. 2.3. Суміш сефарози та праймерів інкубується при 80°C 2 хвилини для відпалу праймерів.

**Табл. 2.3**

**Перелік послідовностей для аналізу та відповідних секвенуючих праймерів**

Назва гену	Кількість аналізованих цитозинів	Послідовність для аналізу	Послідовність праймеру
<i>ASPA</i>	2	ACR <sup>1</sup> CCATTCTCTAA ССААТАСТТААССА ААААТАСТССРАТТ ААСТ	5'- СССТАТТСТСТА ААТСТСА-3'
<i>EDARADD</i>	2	Y <sup>2</sup> GAGAAGATGTTY GTTGG	5'- АСААССААТАА АТАТТССТААА АСТ-3'
<i>ELOVL2</i>	7	ССРТАААСРТТААА ССРСРСРСРАААС СРАС	5'- АСААССААТАА АТАТТССТААА АСТ-3'
<i>PDE4C</i>	8	YGAAGTATTTGTGG YGGTAATTTYGGYG TTTTATTYGTATTTA АТАGYGTTTTTATT YGGATTYGGATAAG	5'- GTTATAGTATG АТТАGAGТТТ-3'

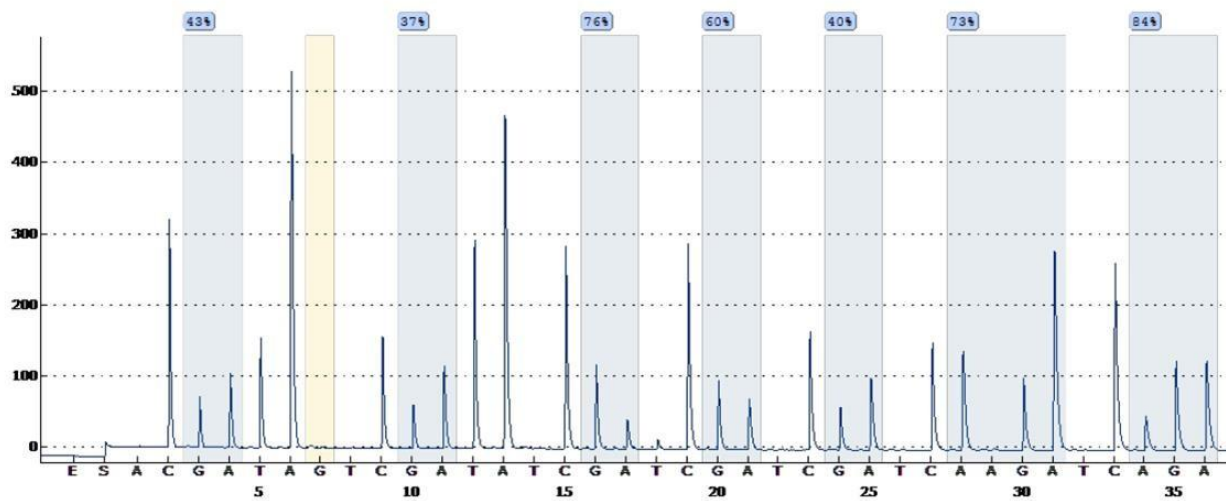
<sup>1, 2</sup>За номенклатурою IUPAC: R - пуринові основи (A або G), Y - піримідинові основи (C або T).

Для проведення піросеквенування необхідно завантажити у прилад картридж, у який вносяться dNTPs, E-mix (суміш полімерази, люциферази, сульфурилази та ін.) та S-mix (аденозин-5-фосфосульфат та люциферин, необхідні для ферментативних реакцій). Дані реагенти представлені у складі набору PyroMark Gold Q24 Reagents (Qiagen, Німеччина).

## **2.6. Аналіз та візуалізація даних**

Аналіз даних піросеквенування проводився програмою Pyromark Q24 v2.0.6. На рис. 2.2 показано вигляд проаналізованої пірограми з вказаними рівнями метилювання досліджуваних цитозинових нуклеотидів.

Well: B4  
 Assay: ELOVL2  
 Sample ID: 17977  
 Note:  
 Analysis version: 2.0.6



Sequence to analyze:  
 CCR TAAACR T TAAACR CCR C RCRAAACCRAC

Position	1	2	3	4	5	6	7
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	43	37	76	60	40	73	84

No warnings.

**Рис. 2.2.** Приклад пірограми.

Статистична обробка та візуалізація даних проводилася у програмі MS Excel.

Для розрахунку передбаченого віку була використана модель Бекарта [122], за якою розрахункова формула має такий вигляд:

$$26,444119 - 0,201902 \times \text{ASPA1} - 0,239205 \times \text{EDARADD1} + 0.0063745 \times (\text{ELOV L26})^2 + 0.6352654 \times \text{PDE4C1}$$

Формули, що були використані для розрахунку:

$$\text{MAD} = \frac{\sum |X_{pr} - X_{chrn}|}{n}, \text{ де } X_{pr} - \text{передбачений вік, } X_{chrn} - \text{хронологічний}$$

вік, n - кількість досліджень.

$$\text{SEE} = \sqrt{\frac{\sum (X_{pr} - X_{chrn})^2}{n}}$$

$$PCP = 100 * \frac{\sum_k |X_{pr} - X_{chrn}|}{n}, \text{ де } k - \text{кількість досліджень, що входять у}$$

певний діапазон похибки,  $n$  - загальна кількість досліджень.

### РОЗДІЛ ІІІ

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У ході дослідження було проаналізовано рівні метилювання 19-ти цитозинових нуклеотидів у 4-ьох генах: *ASPA*, *EDARADD*, *ELOVL2* та *PDE4C*. У додатку 1 представлені отримані в ході роботи дані. У табл. 3.1 наведені значення коефіцієнтів Пірсона та достовірності апроксимації для усіх проаналізованих цитозинів.

**Таблиця 3.1**

**Коефіцієнти Пірсона та достовірності апроксимації для  
проаналізованих цитозинів усіх генів**

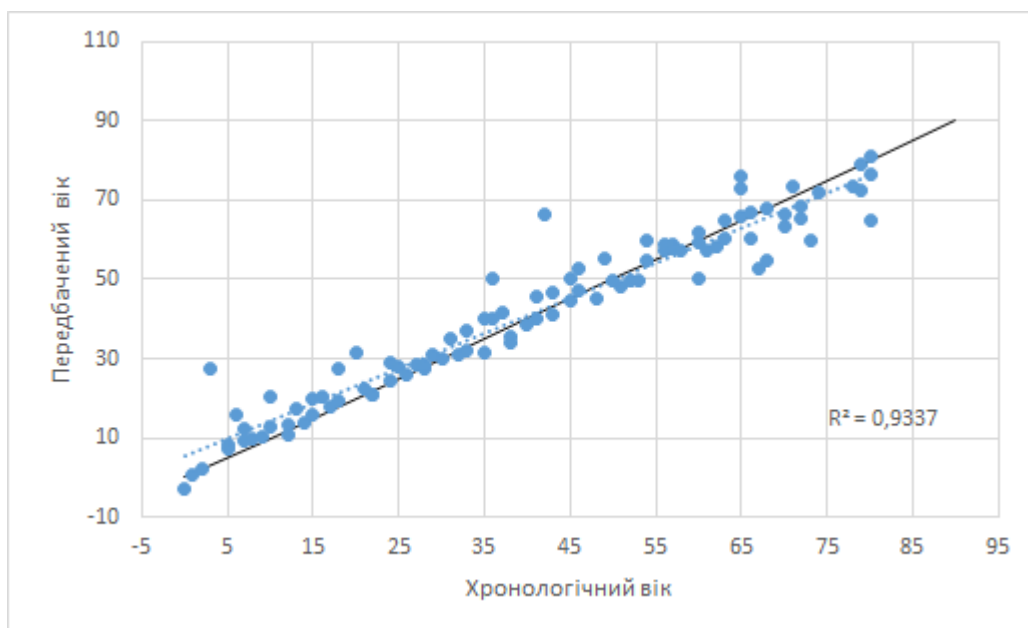
Назва цитозину	г загальний	R <sup>2</sup> загальний	г для чоловіків	R <sup>2</sup> для чоловіків	г для жінок	R <sup>2</sup> для жінок
<u>ASPA1</u>	-0.80	0.65	-0.82	0.67	-0.82	0.66
ASPA2	-0,8	0,64	-0,83	0,68	-0,8	0,64
<u>EDARADD1</u>	-0,85	0,72	-0,85	0,72	-0,85	0,72
EDARADD2	-0,75	0,57	-0,8	0,64	-0,72	0,52
ELOVL21	0,92	0,85	0,95	0,9	0,9	0,82
ELOVL22	0,95	0,9	0,96	0,91	0,94	0,88
ELOVL23	0,91	0,84	0,93	0,87	0,9	0,82
ELOVL24	0,91	0,83	0,95	0,9	0,89	0,79
ELOVL25	0,92	0,86	0,93	0,87	0,92	0,85

<u>ELOVL26</u>	0,95	0,91	0,97	0,93	0,94	0,89
ELOVL27	0,92	0,85	0,94	0,88	0,91	0,84
<u>PDE4C1</u>	0,89	0,79	0,93	0,87	0,85	0,72
PDE4C2	0,63	0,4	0,63	0,4	0,65	0,42
PDE4C3	0,76	0,58	0,84	0,71	0,71	0,5
PDE4C4	0,71	0,5	0,8	0,64	0,63	0,39
PDE4C5	0,69	0,48	0,76	0,58	0,64	0,41
PDE4C6	0,56	0,32	0,6	0,35	0,54	0,3
PDE4C7	0,51	0,26	0,5	0,25	0,57	0,32
PDE4C8	0,73	0,53	0,82	0,67	0,67	0,45

Варто звернути увагу на те, що коефіцієнти Пірсона мають від’ємні значення для цитозинів у генах *ASPA* та *EDARADD*, що вказує на зворотну кореляцію. На відміну від інших представлених CpG сайтів, досліджувані ділянки у даних генах зазнають гіпометилювання з віком. Практично в усіх випадках рівні метилювання корелюють з віком в однаковій мірі у чоловіків та жінок. Виняток становлять незначні відмінності у ELOVL21, ELOVL24 та більшості цитозинів гену *PDE4C*. Окрім PDE4C7, метилювання перерахованих CpG ділянок більше корелює з віком у чоловіків, ніж у жінок.

У табл. 3.1 підкреслені назви цитозинових нуклеотидів, що лежать в основі моделі Бекарта. Як можна побачити, включені у даний епігенетичний годинник цитозини демонструють у нашому дослідженні найбільші та

незалежні від статі коефіцієнти кореляції з хронологічним віком серед представлених.



**Рис. 3.1.** Графік кореляції хронологічного віку та передбаченого моделлю Бекарта віку. Чорна лінія представляє випадок, у якому передбачений вік дорівнює хронологічному.

З рис. 3.1 можна побачити, що кореляція між передбаченим та хронологічним віком є сильною ( $R^2 = 0,93$ ). У табл. 3.2 наведені коефіцієнти кореляції моделі.

**Таблиця 3.2**

**Коефіцієнти кореляції для моделі Бекарта**

г загальний	$R^2$ загальний	г для чоловіків	$R^2$ для чоловіків	г для жінок	$R^2$ для жінок
0,97	0,93	0,98	0,95	0,96	0,92

Як видно з табл. 3.2, модель демонструє високу кореляцію з хронологічним віком. Більш того, коефіцієнт детермінації моделі більше, ніж кожного цитозину окремо. Так, найбільший коефіцієнт детермінації має

ELOVL26, який становить 0,91, у той час як модель демонструє показник  $R^2 = 0,93$ .

Стать не впливає на показники кореляції (коефіцієнти достовірності апроксимації  $R^2 = 0,95$  та  $R^2 = 0,92$  для чоловіків та жінок відповідно). У порівнянні з експериментом Daunay et al [125], наш аналіз демонструє більш високі коефіцієнти кореляції ( $R^2 = 0,78$  проти 0,93 у нас).

**Таблиця 3.3**

**MAD та SEE моделі Бекарта (у роках)**

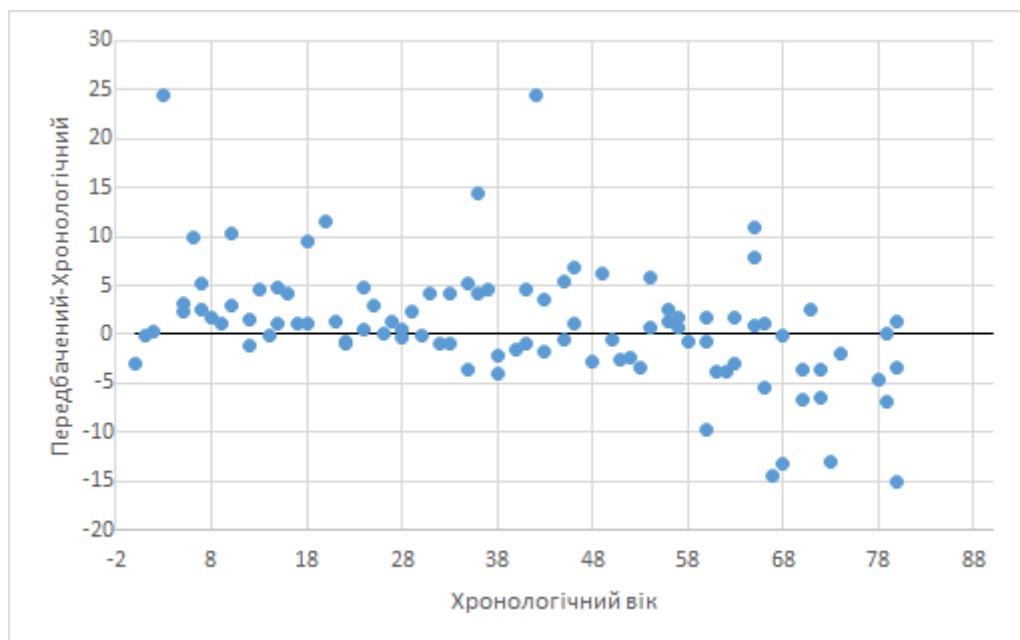
MAD загальний	MAD жінки	MAD чоловіки	SEE загальний	SEE жінки	SEE чоловіки
4,1	4,8	3,3	6,2	6,9	5,2

Точність моделі була оцінена обчисленням MAD та SEE (див. табл. 3.3), а також РСР з урахуванням різниці між хронологічним та передбаченим віком у 5, 7,5 та 10 років (див. табл. 3.4), як для усієї вибірки, так і для жінок та чоловіків окремо. Розраховані показники  $MAD = 4,1$  та  $SEE = 6,2$  років вказують на високу точність моделі. Оскільки MAD та SEE вищі у жінок ( $MAD = 4,8$  та  $SEE = 6,9$  у жінок проти  $MAD = 3,3$  та  $SEE = 5,2$  для чоловіків), дана модель є більш точною для представників чоловічої статі. Для порівняння, у оригінальному дослідженні Beckaert et al [4] точність моделі була однаковою для представників обох статей ( $MAD = 3,5$  та  $3,95$  років для чоловіків та жінок відповідно). У дослідженні Daunay et al [125] показники MAD для чоловіків і жінок також практично співпадали, проте були помітні різниці у значеннях SEE, що вказували на більшу похибку аналізу осіб чоловічої статі (7,6 та 5,6 років для чоловіків та жінок відповідно).

## Відсотки коректних передбачень для діапазонів у 5, 7,5 та 10 років

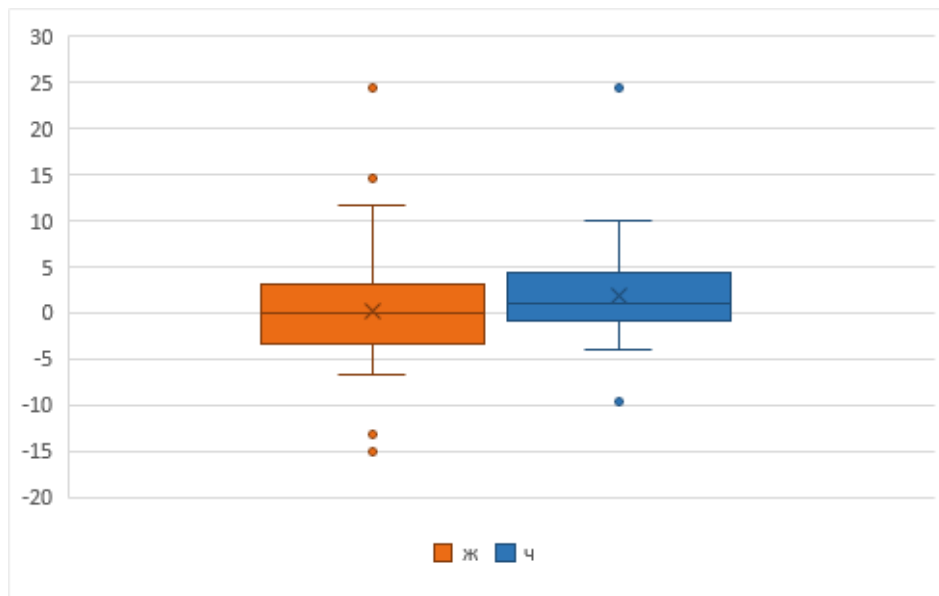
PCP 5 років	PCP 5 років (ж)	PCP 5 років (ч)	PCP 7,5 років	PCP 7,5 років (ж)	PCP 7,5 років (ч)	PCP 10 років	PCP 10 років (ж)	PCP 10 років (ч)
75,5	70,6	80,9	85,7	82,4	89,4	89,8	82,4	97,9

Модель демонструє хороші значення відсотків коректних передбачень, зі збільшенням діапазону помилки збільшується і відсоток. Так, 97,9% чоловіків вибірки мають похибку визначення 10 років і менше. Показники PCP у нашому дослідженні вищі, ніж у дослідженні Daunaу et al [125] (загальне значення PCP у діапазоні 5 років складає 69% проти 75,5% у нашому дослідженні). У публікації Daunaу et al [125] значення PCP не залежить від статі, тоді як у нашому експерименті спостерігається дана залежність. В нашому випадку, PCP у діапазоні 5 років складає 70,6 та 80,9 років для жінок та чоловіків відповідно (проти 69% для представників обох статей у [125]).



**Рис. 3.2.** Відхилення передбаченого віку від хронологічного в залежності від хронологічного віку.

На рис 3.2 зображений розподіл похибки за хронологічним віком. Можна помітити, що з роками різниця між передбаченим та хронологічним віком значно зростає. Причина цього явища нині невідома та потребує подальшого дослідження.



**Рис. 3.3.** Залежність похибки моделі від статі.

На рис. 3.3 зображено залежність похибки від статі. З цього можна зробити висновок, що немає достовірної різниці у похибці між статями. Це підтверджується значенням t-критерія Стьюдента, що становить  $p = 0,08$ .

Таким чином, модель Бекарта демонструє хороші показники кореляції та точності на вибірці описаній в даному дослідженні. Незважаючи на цей факт, не доведено, що дана модель вказує на спад біологічних функцій та старіння. Також залишається невідомим, на які процеси у організмі вказує представлена модель, адже вплив на старіння більшості генів, що корелюють з віком, є нині невідомим.

## ВИСНОВКИ

1. Було зібрано зразки крові представників населення України ( $n = 98$ ) віком від 0 до 80.
2. Проведено аналіз рівнів метилювання CpG ділянок генів *ASPA*, *EDARADD*, *ELOVL2* та *PDE4C* та розраховано біологічний вік за моделлю Бекарта.
3. Отримані показники коефіцієнту Пірсона  $r = 0,97$ , коефіцієнту достовірності апроксимації  $R^2 = 0,93$ ,  $MAD = 4,1$  та  $SEE = 6,9$  років вказують на високу точність моделі.
4. Отримані дані співставні з даними експерименту Daunay et al. Коефіцієнт детермінації у нашому дослідженні є вищим і складає 0,93 порівняно з  $R^2 = 0,78$  у Daunay et al [125].
5. Стать досліджуваної особи не впливає на точність результатів ( $p=0,08$ ).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kirkwood TB, Austad SN. Why do we age? *Nature*. 2000 Nov 9;408(6809):233-8.
2. Balcombe NR, Sinclair A. Ageing: definitions, mechanisms and the magnitude of the problem. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2001 Dec;15(6):835-49.
3. Kudryashova KS, Burka K, Kulaga AY, Vorobyeva NS, Kennedy BK. Aging Biomarkers: From Functional Tests to Multi-Omics Approaches. *Proteomics*. 2020 Mar;20(5-6):e1900408.
4. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Van de Voorde W, Decorte R. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics*. 2015;10(10):922-30
5. Hayflick L. How and why we age. *Exp Gerontol*. 1998 Nov-Dec;33(7-8):639-53.
6. Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Apr;1100:1-13.
7. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1194-217.
8. Aunan JR, Watson MM, Hagland HR, Søreide K. Molecular and biological hallmarks of ageing. *Br J Surg*. 2016 Jan;103(2):e29-46.
9. Dodig S, Čepelak I, Pavić I. Hallmarks of senescence and aging. *Biochem Med (Zagreb)*. 2019 Oct 15;29(3):030501.
10. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, Franceschi C, Lithgow GJ, Morimoto RI, Pessin JE, Rando TA, Richardson A, Schadt EE, Wyss-Coray T, Sierra F. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell*. 2014 Nov 6;159(4):709-13.

11. Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev.* 2013 Mar;12(2):661-84.
12. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2017 Jun;58(5):235-263.
13. Basu AK. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 23;19(4):970.
14. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res.* 2012 Apr;46(4):382-419.
15. Hunniford CA, McCullough RW, Davies RJ, Timson DJ. DNA damage by low-energy ions. *Biochem Soc Trans.* 2009 Aug;37(Pt 4):893-6.
16. Sinha RP, Häder DP. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci.* 2002 Apr;1(4):225-36.
17. Voulgaridou GP, Anestopoulos I, Franco R, Panayiotidis MI, Pappa A. DNA damage induced by endogenous aldehydes: current state of knowledge. *Mutat Res.* 2011 Jun 3;711(1-2):13-27. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.006.
18. Yatagai F. Mutations induced by heavy charged particles. *Biol Sci Space.* 2004 Dec;18(4):224-34.
19. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2019 Oct;15(10):565-581.
20. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011 Jun 3;711(1-2):193-201.
21. Reeves SG, Meldrum C, Groombridge C, Spigelman A, Suchy J, Kurzawski G, Lubinski J, Scott RJ. DNA repair gene polymorphisms and risk of early onset colorectal cancer in Lynch syndrome. *Cancer Epidemiol.* 2012 Apr;36(2):183-9.
22. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001 Mar;27(3):247-54.

23. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Sep;4(9):712-20.
24. Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. GammaH2AX as a molecular marker of aging and disease. *Epigenetics.* 2010 Feb 16;5(2):129-36.
25. Zhang L, Dong X, Lee M, Maslov AY, Wang T, Vijg J. Single-cell whole-genome sequencing reveals the functional landscape of somatic mutations in B lymphocytes across the human lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019 Apr 30;116(18):9014-9019.
26. Giardini MA, Segatto M, da Silva MS, Nunes VS, Cano MI. Telomere and telomerase biology. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;125:1-40.
27. Xie Z, Jay KA, Smith DL, Zhang Y, Liu Z, Zheng J, Tian R, Li H, Blackburn EH. Early telomerase inactivation accelerates aging independently of telomere length. *Cell.* 2015 Feb 26;160(5):928-939.
28. Pusceddu I, Farrell CJ, Di Pierro AM, Jani E, Herrmann W, Herrmann M. The role of telomeres and vitamin D in cellular aging and age-related diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2015 Oct;53(11):1661-78.
29. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nat Rev Genet.* 2019 May;20(5):299-309.
30. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci.* 2002 Jul;27(7):339-44.
31. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):72-6.
32. Kuszel L, Trzeciak T, Richter M, Czarny-Ratajczak M. Osteoarthritis and telomere shortening. *J Appl Genet.* 2015 May;56(2):169-76.
33. Carlquist JF, Knight S, Cawthon RM, Le VT, Jared Bunch T, Horne BD, Rollo JS, Huntinghouse JA, Brent Muhlestein J, Anderson JL. Shortened telomere length is associated with paroxysmal atrial fibrillation among cardiovascular patients enrolled in the Intermountain Heart Collaborative Study. *Heart Rhythm.* 2016 Jan;13(1):21-7.

34. Hunt SC, Kimura M, Hopkins PN, Carr JJ, Heiss G, Province MA, Aviv A. Leukocyte telomere length and coronary artery calcium. *Am J Cardiol*. 2015 Jul 15;116(2):214-8.
35. Atzmon G, Cho M, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X, Siegel G, Bergman A, Huffman DM, Schechter CB, Wright WE, Shay JW, Barzilai N, Govindaraju DR, Suh Y. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 26;107 Suppl 1(Suppl 1):1710-7.
36. Rehkopf DH, Dow WH, Rosero-Bixby L, Lin J, Epel ES, Blackburn EH. Longer leukocyte telomere length in Costa Rica's Nicoya Peninsula: a population-based study. *Exp Gerontol*. 2013 Nov;48(11):1266-73.
37. Bischoff C, Petersen HC, Graakjaer J, Andersen-Ranberg K, Vaupel JW, Bohr VA, Kølvrå S, Christensen K. No association between telomere length and survival among the elderly and oldest old. *Epidemiology*. 2006 Mar;17(2):190-4.
38. Lin J, Cheon J, Brown R, Coccia M, Puterman E, Aschbacher K, Sinclair E, Epel E, Blackburn EH. Systematic and Cell Type-Specific Telomere Length Changes in Subsets of Lymphocytes. *J Immunol Res*. 2016;2016:5371050.
39. Müezziner A, Zaineddin AK, Brenner H. A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res Rev*. 2013 Mar;12(2):509-19.
40. Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol*. 2018 Jan 2;217(1):51-63.
41. Moreno-Gonzalez I, Soto C. Misfolded protein aggregates: mechanisms, structures and potential for disease transmission. *Semin Cell Dev Biol*. 2011 Jul;22(5):482-7.
42. Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:959-91.

43. Chondrogianni N, Sakellari M, Lefaki M, Papaevgeniou N, Gonos ES. Proteasome activation delays aging in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2014 Jun;71:303-320.
44. Chondrogianni N, Petropoulos I, Franceschi C, Friguet B, Gonos ES. Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. *Exp Gerontol*. 2000 Sep;35(6-7):721-8. doi: 10.1016/s0531-5565(00)00137-6. PMID: 11053662.
45. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010 May;221(1):3-12.
46. Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G. Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest*. 2015 Jan;125(1):85-93.
47. Raz Y, Guerrero-Ros I, Maier A, Slagboom PE, Atzmon G, Barzilai N, Macian F. Activation-Induced Autophagy Is Preserved in CD4+ T-Cells in Familial Longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017 Sep 1;72(9):1201-1206.
48. Martínez de Toda I, De la Fuente M. The role of Hsp70 in oxi-inflamm-aging and its use as a potential biomarker of lifespan. *Biogerontology*. 2015 Dec;16(6):709-21.
49. Roura E, Foster SR. Nutrient-Sensing Biology in Mammals and Birds. *Annu Rev Anim Biosci*. 2018 Feb 15;6:197-225.
50. Houtkooper RH, Williams RW, Auwerx J. Metabolic networks of longevity. *Cell*. 2010 Jul 9;142(1):9-14.
51. Chaudhuri J, Bains Y, Guha S, Kahn A, Hall D, Bose N, Gugliucci A, Kapahi P. The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality. *Cell Metab*. 2018 Sep 4;28(3):337-352.
52. Paolisso G, Barbieri M, Bonafè M, Franceschi C. Metabolic age modelling: the lesson from centenarians. *Eur J Clin Invest*. 2000 Oct;30(10):888-94.
53. Khaw KT, Wareham N, Bingham S, Luben R, Welch A, Day N. Association of hemoglobin A1c with cardiovascular disease and mortality in adults:

the European prospective investigation into cancer in Norfolk. *Ann Intern Med.* 2004 Sep 21;141(6):413-20.

54. Engelfriet PM, Jansen EH, Picavet HS, Dollé ME. Biochemical markers of aging for longitudinal studies in humans. *Epidemiol Rev.* 2013;35(1):132-51.

55. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 2018 Apr 26;13:757-772.

56. Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med.* 2013 Jul;60:1-4.

57. Payne BA, Chinnery PF. Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Nov;1847(11):1347-53.

58. Lü R. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for dynamic detection of ROS and transient redox changes in living cells and small animals. *J Mol Cell Cardiol.* 2017 Sep;110:96-108.

59. Odyniec ML , Sedgwick AC , Swan AH , Weber M , Tang TMS , Gardiner JE , Zhang M , Jiang YB , Kociok-Kohn G , Elmes RBP , Bull SD , He XP , James TD . 'AND'-based fluorescence scaffold for the detection of ROS/RNS and a second analyte. *Chem Commun (Camb).* 2018 Jul 26;54(61):8466-8469.

60. Syslová K, Böhmová A, Mikoška M, Kuzma M, Pelclová D, Kačer P. Multimarker screening of oxidative stress in aging. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:562860.

61. Milne GL. Classifying oxidative stress by F2-Isoprostane levels in human disease: The re-imagining of a biomarker. *Redox Biol.* 2017 Aug;12:897-898.

62. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Dananberg J, van Deursen JM. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 Oct;16(10):718-735.

63. Ogrodnik M, Salmonowicz H, Gladyshev VN. Integrating cellular senescence with the concept of damage accumulation in aging: Relevance for clearance of senescent cells. *Aging Cell*. 2019 Feb;18(1):e12841.
64. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99-118.
65. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol*. 2018 Jan 2;217(1):65-77.
66. de Magalhães JP. How ageing processes influence cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013 May;13(5):357-65.
67. Matjusaitis M, Chin G, Sarnoski EA, Stolzing A. Biomarkers to identify and isolate senescent cells. *Ageing Res Rev*. 2016 Aug;29:1-12.
68. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 26;92(20):9363-7.
69. Spazzafumo L, Mensà E, Matakchione G, Galeazzi T, Zampini L, Recchioni R, Marcheselli F, Prattichizzo F, Testa R, Antonicelli R, Garagnani P, Boemi M, Bonafè M, Bonfigli AR, Procopio AD, Olivieri F. Age-related modulation of plasmatic beta-Galactosidase activity in healthy subjects and in patients affected by T2DM. *Oncotarget*. 2017 Oct 16;8(55):93338-93348.
70. Ren R, Ocampo A, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics. *Cell Metab*. 2017 Sep 5;26(3):460-474.
71. Gruber R, Koch H, Doll BA, Tegtmeier F, Einhorn TA, Hollinger JO. Fracture healing in the elderly patient. *Exp Gerontol*. 2006 Nov;41(11):1080-93.
72. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol*. 2010 Aug;22(4):507-13.
73. Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, Sharpless NE, Morrison SJ. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain

progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*. 2006 Sep 28;443(7110):448-52.

74. Mandraffino G, Aragona CO, Basile G, Cairo V, Mamone F, Morace C, D'Ascola A, Alibrandi A, Lo Gullo A, Loddo S, Saitta A, Imbalzano E. CD34+ cell count predicts long lasting life in the oldest old. *Mech Ageing Dev*. 2017 Jun;164:139-145.

75. Russell SJ, Kahn CR. Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):681-91.

76. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012 Apr 13;149(2):274-93.

77. Rando TA, Chang HY. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell*. 2012 Jan 20;148(1-2):46-57.

78. Giunta S. Exploring the complex relations between inflammation and aging (inflamm-aging): anti-inflamm-aging remodelling of inflamm-aging, from robustness to frailty. *Inflamm Res*. 2008 Dec;57(12):558-63.

79. Szarc vel Szic K, Declerck K, Vidaković M, Vanden Berghe W. From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition? *Clin Epigenetics*. 2015 Mar 25;7(1):33.

80. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet*. 2012 Jan 4;13(2):97-109.

81. Wang Y, Yuan Q, Xie L. Histone Modifications in Aging: The Underlying Mechanisms and Implications. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(2):125-135.

82. Ludwig N, Leidinger P, Becker K, Backes C, Fehlmann T, Pallasch C, Rheinheimer S, Meder B, Stähler C, Meese E, Keller A. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res*. 2016 May 5;44(8):3865-77.

83. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson

PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29;105(30):10513-8.

84. ElSharawy A, Keller A, Flachsbarth F, Wendschlag A, Jacobs G, Kefer N, Brefort T, Leidinger P, Backes C, Meese E, Schreiber S, Rosenstiel P, Franke A, Nebel A. Genome-wide miRNA signatures of human longevity. *Aging Cell*. 2012 Aug;11(4):607-16.

85. Noren Hooten N, Abdelmohsen K, Gorospe M, Ejiogu N, Zonderman AB, Evans MK. microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS One*. 2010 May 20;5(5):e10724.

86. Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Wood WH 3rd, De S, Ejiogu N, Zhang Y, Mattison JA, Becker KG, Zonderman AB, Evans MK. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging (Albany NY)*. 2013 Oct;5(10):725-40.

87. Huan T, Chen G, Liu C, Bhattacharya A, Rong J, Chen BH, Seshadri S, Tanriverdi K, Freedman JE, Larson MG, Murabito JM, Levy D. Age-associated microRNA expression in human peripheral blood is associated with all-cause mortality and age-related traits. *Aging Cell*. 2018 Feb;17(1):e12687.

88. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jan;38(1):23-38.

89. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet*. 2018 Jun;19(6):371-384.

90. Unnikrishnan A, Freeman WM, Jackson J, Wren JD, Porter H, Richardson A. The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacol Ther*. 2019 Mar;195:172-185.

91. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013;14(10):R115.

92. Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet*. 2007 Aug;23(8):413-8.

93. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res*. 1998 Dec 1;58(23):5489-94.

94. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet.* 1994 Aug;7(4):536-40.
95. Issa JP, Vertino PM, Boehm CD, Newsham IF, Baylin SB. Switch from monoallelic to biallelic human IGF2 promoter methylation during aging and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15;93(21):11757-62.
96. Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res.* 2001 May 1;61(9):3573-7.
97. Kim JY, Siegmund KD, Tavaré S, Shibata D. Age-related human small intestine methylation: evidence for stem cell niches. *BMC Med.* 2005 Jun 23;3:10.
98. Kim JY, Tavaré S, Shibata D. Counting human somatic cell replications: methylation mirrors endometrial stem cell divisions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 6;102(49):17739-44.
99. Rakyan VK, Down TA, Maslau S, Andrew T, Yang TP, Beyan H, Whittaker P, McCann OT, Finer S, Valdes AM, Leslie RD, Deloukas P, Spector TD. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res.* 2010 Apr;20(4):434-9.
100. So K, Tamura G, Honda T, Homma N, Waki T, Togawa N, Nishizuka S, Motoyama T. Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci.* 2006 Nov;97(11):1155-8.
101. Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Weisenberger DJ, Shen H, Campan M, Noushmehr H, Bell CG, Maxwell AP, Savage DA, Mueller-Holzner E, Marth C, Kocjan G, Gayther SA, Jones A, Beck S, Wagner W, Laird PW, Jacobs IJ, Widschwendter M. Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res.* 2010 Apr;20(4):440-6.
102. Waki T, Tamura G, Sato M, Motoyama T. Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. *Oncogene.* 2003 Jun 26;22(26):4128-33.

103. Yatabe Y, Tavaré S, Shibata D. Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10839-44.
104. Nwanaji-Enwerem JC, Weisskopf MG, Baccarelli AA. Multi-tissue DNA methylation age: Molecular relationships and perspectives for advancing biomarker utility. *Ageing Res Rev*. 2018 Aug;45:15-23.
105. Wagner W. Epigenetic aging clocks in mice and men. *Genome Biol*. 2017 Jun 14;18(1):107.
106. Levine ME, Hosgood HD, Chen B, Absher D, Assimes T, Horvath S. DNA methylation age of blood predicts future onset of lung cancer in the women's health initiative. *Aging (Albany NY)*. 2015 Sep;7(9):690-700.
107. Zheng Y, Joyce BT, Colicino E, Liu L, Zhang W, Dai Q, Shrubsole MJ, Kibbe WA, Gao T, Zhang Z, Jafari N, Vokonas P, Schwartz J, Baccarelli AA, Hou L. Blood Epigenetic Age may Predict Cancer Incidence and Mortality. *EBioMedicine*. 2016 Feb 8;5:68-73.
108. Perna L, Zhang Y, Mons U, Holleczeck B, Saum KU, Brenner H. Epigenetic age acceleration predicts cancer, cardiovascular, and all-cause mortality in a German case cohort. *Clin Epigenetics*. 2016 Jun 3;8:64.
109. Vidal-Bralo L, Lopez-Golan Y, Mera-Varela A, Rego-Perez I, Horvath S, Zhang Y, Del Real Á, Zhai G, Blanco FJ, Riancho JA, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Specific premature epigenetic aging of cartilage in osteoarthritis. *Aging (Albany NY)*. 2016 Sep 28;8(9):2222-2231.
110. Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell*. 2015 Dec;14(6):924-32.
111. James, G., Witten, D., Hastie, T., & Tibshirani, R. (Eds.). (2013). *An introduction to statistical learning: With applications in R*. New York, NY: Springer.
112. Lin Q, Weidner CI, Costa IG, Marioni RE, Ferreira MR, Deary IJ, Wagner W. DNA methylation levels at individual age-associated CpG sites can be indicative for life expectancy. *Aging (Albany NY)*. 2016 Feb;8(2):394-401.

113. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, Bauerschlag DO, Jöckel KH, Erbel R, Mühleisen TW, Zenke M, Brümmendorf TH, Wagner W. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.* 2014 Feb 3;15(2):R24.
114. Zhang Y, Wilson R, Heiss J, Breitling LP, Saum KU, Schöttker B, Holleczeck B, Waldenberger M, Peters A, Brenner H. DNA methylation signatures in peripheral blood strongly predict all-cause mortality. *Nat Commun.* 2017 Mar 17;8:14617.
115. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell.* 2013 Jan 24;49(2):359-367.
116. Wang T, Tsui B, Kreisberg JF, Robertson NA, Gross AM, Yu MK, Carter H, Brown-Borg HM, Adams PD, Ideker T. Epigenetic aging signatures in mice livers are slowed by dwarfism, calorie restriction and rapamycin treatment. *Genome Biol.* 2017 Mar 28;18(1):57.
117. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E. Epigenetic predictor of age. *PLoS One.* 2011;6(6):e14821.
118. Koch CM, Wagner W. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging (Albany NY).* 2011 Oct;3(10):1018-27.
119. Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Gori D, Giuliani C, Mari D, Di Blasio AM, Gentilini D, Vitale G, Collino S, Rezzi S, Castellani G, Capri M, Salvioli S, Franceschi C. Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell.* 2012 Dec;11(6):1132-4.
120. Slieker RC, Relton CL, Gaunt TR, Slagboom PE, Heijmans BT. Age-related DNA methylation changes are tissue-specific with ELOVL2 promoter methylation as exception. *Epigenetics Chromatin.* 2018 May 30;11(1):25.
121. Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Parys-Proszek A, Makowska Ż, Pałeczka A, Kucharczyk K, Płoski R, Branicki W. Development of a

forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2015 Jul;17:173-179.

122. Horvath S, Oshima J, Martin GM, Lu AT, Quach A, Cohen H, Felton S, Matsuyama M, Lowe D, Kabacik S, Wilson JG, Reiner AP, Maierhofer A, Flunkert J, Aviv A, Hou L, Baccarelli AA, Li Y, Stewart JD, Whitsel EA, Ferrucci L, Matsuyama S, Raj K. Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and *ex vivo* studies. *Aging (Albany NY).* 2018 Jul 26;10(7):1758-1775.

123. McEwen LM et al. The PedBE clock accurately estimates DNA methylation age in pediatric buccal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Sep 22;117(38):23329-23335.

124. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 1994 Aug 11;22(15):2990-7.

125. Daunay A, Baudrin LG, Deleuze JF, How-Kit A. Evaluation of six blood-based age prediction models using DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Sci Rep.* 2019 Jun 20;9(1):8862.

## Додаток 1

### Дані дослідження рівнів метилювання CpG ділянок генів ASPA, EDARADD, ELOVL2 та PDE4C

id	Age	Sex	ASPA1	ASPA2	EDARAD	EDARAD	ELOVL21	ELOVL22	ELOVL23	ELOVL24	ELOVL25	ELOVL26	ELOVL27	PDE4C1	PDE4C2	PDE4C3	PDE4C4	PDE4C5	PDE4C6	PDE4C7	PDE4C8
1	0	f	85	88	79	73	8	7	20	11	5	16	18	8	17	6	9	7	5	5	4
2	2	f	80	85	72	55	10	8	25	15	9	21	27	10	21	7	8	8	5	5	4
3	3	f	73	80	49	33	30	26	63	46	25	52	69	16	26	10	11	10	7	7	6
4	5	f	79	83	65	49	13	10	31	21	11	28	36	13	23	8	10	9	6	5	5
5	7	f	82	85	60	44	16	14	37	22	11	30	38	13	24	9	10	10	7	6	5
6	8	f	81	85	63	45	15	12	37	24	13	30	40	14	23	10	7	10	6	7	6
7	10	f	80	85	59	41	18	15	42	28	15	33	43	27	27	13	12	12	7	8	7
8	12	f	76	82	53	34	25	14	41	25	13	33	44	13	27	8	9	10	6	6	6
9	14	f	78	83	47	27	17	14	43	27	14	34	47	11	24	8	10	8	6	6	5
10	15	f	76	83	62	44	18	16	49	33	17	39	51	16	26	10	11	11	8	7	6
11	17	f	76	83	56	37	22	18	51	35	18	40	54	16	28	10	9	9	6	7	6
12	18	f	70	77	58	41	21	18	49	31	18	42	54	15	25	11	12	11	7	7	6
13	20	f	75	83	39	27	24	20	53	36	21	43	56	28	31	14	13	13	10	9	9
14	22	f	78	83	45	26	21	18	50	33	18	44	58	14	23	9	9	9	5	6	5
15	24	f	70	77	48	30	29	25	60	43	24	50	66	19	28	11	12	11	7	8	7
16	25	f	72	78	47	37	27	25	59	43	26	50	63	18	27	13	12	12	9	9	8
17	27	f	70	75	45	28	26	21	58	42	22	48	63	19	28	10	11	11	6	7	6
18	28	f	67	72	55	33	24	20	58	41	23	50	66	19	27	9	8	9	6	6	5
19	30	f	75	81	40	16	30	27	63	45	25	55	68	14	20	9	10	8	6	7	5
20	31	f	66	73	38	23	28	24	60	43	5	52	69	22	27	11	11	10	7	7	6
21	33	f	67	75	56	42	34	28	64	45	25	51	67	25	28	10	10	13	9	8	8
22	35	f	64	71	38	26	30	27	64	44	26	43	70	24	24	10	11	11	7	8	8
23	36	f	64	70	29	19	38	32	75	59	34	64	78	28	32	13	11	12	8	8	7
24	38	f	66	74	39	26	30	27	66	48	25	56	74	19	27	10	11	9	6	6	5
25	40	f	68	73	34	22	33	27	67	50	28	56	72	22	28	11	11	11	7	7	6
26	41	f	59	69	44	26	33	29	67	50	31	61	75	28	28	12	11	12	8	8	7
27	43	f	64	72	31	13	37	33	71	55	33	63	77	24	30	12	12	11	8	7	7
28	45	f	65	74	40	28	37	33	70	55	35	64	77	23	29	12	12	12	8	8	7
29	46	f	55	64	39	23	40	36	77	62	39	69	82	26	31	12	13	11	8	7	7
30	48	f	66	73	51	37	38	33	71	56	39	66	80	26	27	13	13	12	7	9	7
31	51	f	61	69	35	19	36	31	75	59	34	64	79	26	29	13	11	12	7	8	7
32	53	f	52	60	34	22	38	32	68	52	34	63	77	26	24	12	12	13	8	8	8
33	54	f	58	65	34	20	39	36	76	62	40	69	81	36	35	20	15	17	13	13	13
34	56	f	53	62	36	28	42	38	64	61	41	72	84	29	28	14	14	14	9	10	10
35	57	f	61	68	30	18	37	36	78	63	40	75	85	25	24	15	10	12	9	10	9
36	60	f	64	72	42	30	44	40	78	65	42	74	85	33	28	16	14	14	10	11	10

37	60 f	54	61	16	12	52	34	73	63	40	71	81	28	32	12	15	11	8	7	8
38	62 f	58	64	38	26	45	39	76	63	41	71	83	32	34	15	17	16	9	10	12
39	63 f	57	65	29	18	45	40	79	65	43	72	85	30	28	16	13	15	11	10	10
40	65 f	59	74	28	30	27	54	63	24	23	83	89	38	26	6	5	5	2	2	2
41	66 f	52	60	31	23	39	35	74	60	38	69	81	34	33	15	15	14	8	9	10
42	67 f	67	74	32	25	50	46	83	70	49	77	88	15	27	10	11	11	6	7	6
43	68 f	68	73	37	25	40	37	76	62	41	70	85	31	32	14	12	12	8	8	9
44	70 f	54	62	22	15	42	39	77	66	50	73	84	30	25	14	14	13	9	11	12
45	70 f	45	55	34	22	46	42	83	69	47	76	88	32	32	16	14	14	9	10	10
46	72 f	69	78	29	22	49	46	83	72	50	77	89	35	33	16	16	16	11	10	11
47	73 f	57	63	31	18	44	38	79	65	46	73	86	29	28	13	16	13	8	8	7
48	78 f	63	70	23	15	50	47	83	68	49	79	89	40	33	24	16	15	10	10	10
49	79 f	49	55	33	19	55	45	82	70	48	78	90	39	29	22	12	13	8	8	9
50	80 f	69	74	17	13	38	40	84	70	53	74	87	34	39	17	13	17	13	10	11
51	80 f	52	63	24	24	60	52	87	75	56	84	92	41	35	16	17	14	12	11	13
52	1 m	84	88	74	67	12	9	28	17	8	21	26	10	21	7	8	8	5	6	4
53	5 m	78	85	64	44	12	11	31	19	9	26	32	12	23	9	9	8	6	6	4
54	6 m	73	80	55	35	20	16	45	29	15	39	53	12	26	9	9	8	5	6	4
55	7 m	78	84	55	37	16	13	37	23	12	30	39	14	23	9	10	10	7	6	6
56	9 m	79	84	63	47	16	13	39	27	15	32	43	13	24	8	7	9	6	6	5
57	10 m	74	82	57	39	18	14	39	26	13	31	42	14	25	11	10	10	7	7	6
58	12 m	78	84	60	40	17	15	43	28	17	33	47	12	24	8	9	9	6	6	5
59	13 m	75	81	55	38	21	17	47	31	15	38	49	16	25	9	8	10	6	7	6
60	15 m	73	81	55	40	24	20	52	36	19	43	57	15	26	9	9	9	6	6	5
61	16 m	74	82	48	30	22	19	51	35	19	41	55	15	25	9	10	10	6	6	5
62	18 m	71	78	30	30	26	23	63	50	34	44	60	16	29	12	11	10	7	6	5
63	21 m	81	85	53	33	25	21	55	36	20	46	60	18	28	11	11	9	7	7	6
64	22 m	69	77	51	32	18	16	47	32	18	41	56	16	24	9	10	9	6	6	4
65	24 m	72	82	44	28	23	20	55	37	19	44	60	17	25	10	10	10	7	7	6
66	26 m	72	77	45	26	23	20	55	37	21	48	61	16	25	9	9	10	6	6	6
67	28 m	70	78	44	28	27	23	59	41	22	49	65	18	27	9	11	11	7	7	6
68	29 m	67	75	46	31	30	26	64	46	25	54	70	17	25	10	10	11	6	7	6
69	32 m	70	79	47	32	27	24	60	44	25	52	67	20	29	12	12	12	8	8	7
70	33 m	64	72	49	35	31	27	63	47	29	58	70	22	27	12	12	12	8	9	8
71	35 m	65	74	43	32	32	27	65	50	29	57	72	26	29	13	11	11	6	8	7
72	36 m	67	73	37	25	32	30	67	51	33	59	73	22	27	12	12	13	9	9	8
73	37 m	71	77	38	25	32	27	66	51	29	62	73	22	27	13	12	14	9	10	10
74	38 m	81	83	55	35	32	27	69	51	31	61	76	21	23	19	11	10	6	6	6
75	41 m	71	78	31	19	32	28	67	50	28	57	75	23	30	14	13	13	7	7	6
76	42 m	51	58	18	13	44	39	80	68	49	74	85	31	35	16	11	11	8	8	8
77	43 m	74	79	49	34	38	34	73	56	34	61	76	28	27	12	12	12	7	9	8
78	45 m	64	70	39	26	37	34	72	56	37	66	80	29	31	13	12	14	12	8	8
79	46 m	69	77	39	28	39	34	83	55	32	64	77	28	32	14	14	14	10	10	8

80	49	m	61	69	35	25	40	35	74	59	38	69	81	30	33	13	14	13	9	9	9
81	50	m	58	69	30	20	35	31	72	56	34	64	78	25	30	13	11	12	8	9	8
82	52	m	71	77	42	30	38	36	74	53	36	67	80	30	30	15	13	15	18	9	10
83	54	m	67	72	28	20	42	38	77	63	40	68	81	30	30	19	13	13	9	9	9
84	56	m	66	72	38	22	41	34	75	61	40	69	82	36	29	17	14	14	10	9	9
85	57	m	51	61	32	24	41	39	76	60	38	68	82	31	33	17	14	15	10	10	11
86	58	m	62	69	31	19	35	31	71	57	36	69	83	32	16	15	14	14	7	8	7
87	60	m	59	69	42	30	46	42	81	65	41	72	85	20	30	11	11	11	8	7	7
88	61	m	57	64	19	12	36	31	74	58	38	71	83	23	24	13	10	9	7	24	6
89	63	m	58	65	29	21	43	38	77	65	42	73	84	36	33	16	15	15	10	9	10
90	65	m	36	42	16	12	56	42	78	64	40	75	87	34	42	15	12	12	8	9	8
91	65	m	53	63	24	18	47	44	83	73	60	72	90	36	33	13	15	10	10	14	9
92	66	m	49	57	18	12	41	37	77	66	46	75	86	30	35	17	13	11	7	8	8
93	68	m	40	50	25	16	43	37	76	60	40	73	84	34	30	21	15	18	11	5	11
94	71	m	41	48	29	22	50	46	82	71	51	80	88	34	32	19	16	17	10	12	10
95	72	m	58	68	28	18	45	44	81	67	47	76	88	37	33	16	15	15	9	10	9
96	74	m	44	54	33	26	48	43	83	69	48	78	87	37	36	20	18	16	11	11	12
97	79	m	64	69	24	20	53	52	85	80	60	83	89	43	28	16	11	13	8	8	9
98	80	m	41	51	11	8	46	43	83	70	50	78	89	35	34	22	21	20	10	8	9