

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 577.24

СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗРАСТА В КРИМИНАЛИСТИКЕ

© 2019 г. А. Д. Золотаренко¹, Е. В. Чекалин¹, С. А. Брускин¹, *

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: sergey.bruskin@gmail.com

Поступила в редакцию 14.06.2019 г.

После доработки 25.07.2019 г.

Принята к публикации 26.07.2019 г.

В данной статье представлен обзор современных молекулярно-генетических методов определения возраста индивидуума на основе анализа образцов различных тканей. Приведены данные по определению возраста: по скорости накопления мутаций в митохондриальной ДНК, по длине теломер, по частоте повторов ДНК, по анализу изменений экспрессии генов, по оценке уровней метилирования ДНК. Анализ рассмотренных источников позволяет сделать вывод, что наиболее перспективным направлением исследований с целью увеличения точности предсказания возраста в условиях ограниченного количества и качества исходного материала является оценка профилей метилирования образцов. Разработка новых математических моделей позволит увеличить точность и снизить среднюю ошибку предсказания.

Ключевые слова: определение возраста, ДНК-идентификация, метилирование ДНК, криминалистические исследования.

DOI: 10.1134/S0016675819120154

Одним из этапов идентификации личности в криминалистике является определение возраста индивидуума. Увеличение возраста человека, или старение, можно представить как постепенный процесс накопления изменений в биомолекулах, например, на уровне ДНК и белков. Анализ таких изменений позволяет определять возраст живых людей или останков. Оценка возраста может использоваться для получения информации, актуальной при расследовании уголовных дел, при проведении юридических и антропологических исследований. Помимо непосредственной информации о возрасте индивидуума можно предсказать связанные с возрастом фенотипические признаки, например, цвет волос или облысение. Кроме того, это важный фактор для идентификации неопознанных останков (пропавших без вести, жертв массовых беспорядков или стихийных бедствий), а также при проведении археологических исследований [1].

Традиционно для оценки возраста в судебно-медицинской экспертизе применяются морфологические методы исследования останков (например оценка морфологических особенностей зубов или частей скелета), а также биохимический метод определения возраста, основанный на эффекте увеличения рацемизации аспарагиновой кислоты в дентине при старении. Ошибка при

определении возраста морфологическими методами составляет около десяти лет, а при применении биохимического метода – около трех лет [2].

Однако при отсутствии достаточного количества материала (например на месте преступления) или высокой степени его деградации применение перечисленных методов является затруднительным. Кроме того, не все типы тканей подходят для проведения анализа. В таких случаях применяются молекулярно-генетические методы анализа, которые позволяют использовать для оценки возраста материалы человека, не содержащие морфологических признаков возраста, а также образцы, содержащие очень малое количество материала. К ним относятся образцы крови, спермы, слюны и других биологических выделений, в том числе в форме высушенных мазков и пятен; мягкие ткани (фрагменты кожи, эпителиальные клетки слизистой оболочки, другие фрагменты мягких тканей); волосы с волосяными фолликулами; ДНК, оставшаяся на сигаретных окурках и личных вещах, например, на зубной щетке [3, 4]. Основным материалом в молекулярно-генетических исследованиях является именно ДНК, поскольку она является относительно стабильной и долгоживущей молекулой и сохраняется даже в переработанном биологическом материале (сухие пятна биологических жидкостей, переработанные пи-

шевые продукты, копролиты, мумифицированные ткани и т.д.) [5]. Кроме того она присутствует во всех биологических жидкостях, что позволяет проводить анализ из почти всех видов биологических субстратов (слюна, фекалии, молоко и т.д.). Наконец, из-за вырожденности генетического кода и существования длинных некодирующих участков, анализ ДНК может быть более информативен, чем анализ белков [6].

Основными молекулярно-генетическими методами определения возраста индивидуума, в которых в качестве исследуемого материала используется ДНК, являются: 1) оценка накопления мутаций в митохондриальной ДНК, 2) оценка длины теломер, 3) оценка количества повторов в ДНК, 4) оценка экспрессии генов, 5) оценка уровней метилирования ДНК и ее частный случай – оценка метилирования рибосомальной ДНК [3, 6, 7].

ОЦЕНКА ВОЗРАСТА ИНДИВИДУУМОВ ПО СКОРОСТИ НАКОПЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Митохондрии являются полуавтономными органеллами и имеют свой собственный геном. Митохондриальный геном обладает определенными особенностями, которые делают его более устойчивым к стрессовым воздействиям окружающей среды, чем ядерный геном. Прежде всего геном митохондрии имеет кольцевую форму, что делает его менее подверженным деградации нуклеазами. Во-вторых, он присутствует в каждой соматической клетке в больших количествах (от 3000 копий митохондриального генома на клетку и больше), поэтому в неблагоприятных условиях митохондриальная ДНК (мтДНК) сохраняется гораздо лучше, чем ядерная [8]. Митохондриальная ДНК человека наследуется по материнской линии и не подвергается рекомбинации, благодаря чему она может быть использована при предсказании этнического происхождения индивидуума [6].

В клетке митохондрии являются энергетическими центрами, в которых происходят реакции окислительного фосфорилирования, сопровождающиеся высвобождением свободных радикалов. Поэтому геном митохондрий постоянно находится в условиях окислительного стресса, что приводит к активному мутагенезу. Соматические мутации в митохондриях могут накапливаться с возрастом, проявляя тканеспецифический рисунок [9]. Накопление мутаций в мтДНК, в том числе делеций, дупликаций и точечных мутаций, было обнаружено во множестве тканей во время старения у людей, обезьян и грызунов. В криминалистике накопление мутаций в мтДНК в основном применяется для оценки возраста на момент смерти, при этом применяется как оценка

накопления точечных мутаций, так и накопление митохондриальных делеций [10].

Митохондриальный геном содержит некодирующую регуляторную область, D-петлю, которая важна для репликации тяжелой цепи и транскрипции обеих цепей мтДНК. В разных исследованиях обнаружено накопление точечных мутаций в этой области, в том числе замен *A189G*, *T408A* и *T414G*, ассоциированных со старением. Так, при исследовании мутации *A189G* в мышечной ткани лиц в возрасте 1–97 лет было выявлено, что у пожилых людей наблюдается более высокий процент мутаций [11]. Однако, поскольку накопление мутаций может сильно варьировать между индивидуумами, а также между тканями одного индивидуума, применимость данного метода при оценке возраста в судебно-медицинской экспертизе ограничена.

Накопление дупликаций в мтДНК также наблюдается с увеличением возраста. Поскольку данный типа маркеров характеризуется нестабильностью между различными индивидуумами, в основном он исследуется в контексте ассоциаций с различными заболеваниями, в первую очередь с онкологическими заболеваниями [12, 13], и мало подходит для нужд криминалистики.

Митохондриальные делеции являются стохастическими событиями в отдельной клетке, которые накапливаются с возрастом. При этом было рассчитано, что для того, чтобы делеция накопилась на значимом уровне к возрасту 80 лет, она должна появиться в первые 30 лет жизни индивидуума. Распространенная делеция размером в 4977 пн, которая применяется для определения возраста, была проанализирована разными группами исследователей на различных типах тканей; показано, что она наиболее эффективно может использоваться в анализах с применением ПЦР [8]. Так, при анализе данной делеции на образцах скелетных мышц 93 индивидуумов, был получен коэффициент корреляции с возрастом $r = 0.83$ [14]. В дальнейшем применение количественной ПЦР в реальном времени позволило улучшить этот показатель до $r = 0.84$. Однако, при анализе различных тканей данный маркер характеризуется различной эффективностью определения возраста ($r = 0.57–0.84$, $p < 0.05$) [15–17].

Другим недостатком использования митохондриальных делеций для определения возраста индивидуумов является их накопление из-за клональной экспансии, причем в клетках в одной и той же ткани одного индивидуума может наблюдаться гетерогенность по количеству делеций. Кроме того у различных индивидуумов на скорость возникновения делеций могут влиять стрессовые факторы: УФ-радиация, ионизирующая радиация, токсические воздействия, а также различные заболевания (гипоксия/реперфузия,

ишемия и терминальная почечная недостаточность) [18].

Таким образом накопление мутаций в мтДНК является достаточно грубым маркером при определении возраста и позволяет лишь разделить образцы по возрастным группам, но не оценить возраст индивидуума с уровнем точности, достаточным для задач криминалистики.

ОЦЕНКА ВОЗРАСТА ОБРАЗЦОВ ПО ДЛИНЕ ТЕЛОМЕР

Хромосомы эукариот защищены от деградации и нарушений рекомбинации теломерами — специализированными структурами, расположенными на концах хромосом. Теломеры позвоночных, в том числе человека, содержат до нескольких тысяч повторов последовательности TTAGGG. С каждым делением клетки длина теломер уменьшается, поскольку ДНК-полимераза не может реплицировать 3'-конец родительской цепи ДНК в отсутствие праймера, а может лишь добавлять нуклеотиды к существующей 3'-гидроксильной группе. Постепенное укорачивание теломер приводит к старению и, в конце концов, к гибели клеток, чего не наблюдается в раковых и стволовых клетках, где активен фермент теломеразы, достраивающий теломеры. Недостаточная активность теломеразы приводит к более раннему старению и различным патологиям: фиброзу и эмфиземе легких, гипоплазии костного мозга, циррозу [19].

Важным преимуществом данного маркера по сравнению с маркерами возраста, анализируемыми по мтДНК, является чувствительность, т.е. для оценки длины теломер нет необходимости в большом объеме исследуемого образца или в каких-то определенных типах тканей, а достаточно мазка или небольшого пятна крови [20].

Для оценки длины теломер разработано несколько методов: анализ длин рестрикционных фрагментов теломер (TRF), различные варианты ПЦР (ПЦР в реальном времени, монохромная мультиплексная ПЦР в реальном времени — *monochrome multiplex quantitative polymerase chain reaction* (MMqPCR); измерение абсолютной длины теломер — *absolute telomere length PCR* (aTLqPCR). Также применяется метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и различные его вариации (количественная флуоресцентная гибридизация, *quantitative FISH* — Q-FISH; флуоресцентная гибридизация с проточной цитометрией — *Flow-FISH*; метод анализа длины одиночных теломер — *single telomere length analysis* — STELA). Анализ длин рестрикционных фрагментов теломер (TRF) является своего рода “золотым стандартом”. Данный метод заключается в обработке геномной ДНК смесью часто щепящих ферментов рестрикции, которые не

узнают (и не фрагментируют) теломерные и субтеломерные последовательности. Затем полученные фрагменты, содержащие последовательности теломер всех хромосом, разделяют с помощью электрофореза в агарозном геле. Фрагменты визуализируют с помощью Саузерн-блоттинга или гибридизации с использованием зонда, специфичного для теломерной ДНК. Однако для успешного применения данного метода необходимы большие количества ДНК (несколько микрограмм) и высокое качество ДНК, что не всегда доступно в судебно-медицинской практике. Для методов, основанных на количественной ПЦР, нужно меньше ДНК, и результаты, полученные в различных лабораториях с применением данного метода, являются более воспроизводимыми. Поскольку методы с применением флуоресцентной гибридизации используют специфичные пробы, они позволяют оценивать длину теломер отдельных хромосом, применимы только для митотически-активных клеток. Flow-FISH, в которой используются пан-теломерные пробы, связывающиеся со всеми теломерами, позволяет осуществлять высокопроизводительный анализ длины теломер и широко применяется для оценки их длины в популяциях гематопоетических клеток. Однако для этого типа анализа необходима высококачественная малодegradированная ДНК, и наилучшие результаты можно получить при анализе изолированных ядер клеток, поэтому в настоящее время его применение ограничено свежими образцами крови [21–23].

Одними из наиболее многообещающих стали результаты исследования Tsuji с соавт. [20], в котором была показана четкая зависимость между длиной рестрикционных фрагментов теломер и возрастом индивидуума. Регрессионный анализ выявил коэффициент корреляции, равный $r = 0.82$ (коэффициент дисперсии $R^2 = 0.69$). Авторы вывели формулу, позволяющую вычислять возраст индивидуума по длине рестрикционных фрагментов теломер в его клетках. Сами авторы однако отмечают, что данный тип анализа неприменим к исследованию фрагментов ДНК короче 500 пн длиной.

В другом исследовании [24] метод TRF применялся для определения возраста на 100 образцах крови, полученных от индивидуумов обоего пола возрастом от 0 до 60+ лет. Коэффициент корреляции в данном случае был значительно ниже ($r = -0.625$), что авторы связывают с деградацией ДНК и другими биологическими факторами, например расовой принадлежностью или типом проанализированных образцов ДНК.

В исследовании Karlsson с соавт. [25] для оценки связи длины теломер с возрастом индивидуума применялся анализ 100 образцов крови, полученных от доноров различного возраста, при помощи количественной ПЦР в реальном времени. Сред-

няя ошибка определения возраста составила 22 года, что является слишком большой погрешностью для применения данного теста в криминалистике. При этом основной проблемой исследования была высокая вариабельность длин теломер у разных индивидуумов, в том числе у людей одинакового возраста. Кроме того наблюдалась большая разница по длине теломер в клетках крови и в клетках буккального эпителия – в последнем случае теломеры были значительно длиннее. Исследователи сделали вывод о том, что такие факторы как заболевания, воздействия окружающей среды и стиль жизни оказывают влияние на длину теломер, а также на наследуемую длину теломер и активность теломеразы.

При оценке длины теломер в образцах зубов (91 образец от 77 индивидуумов обоих полов в возрасте от 15 до 85 лет) при помощи ПЦР в реальном времени было выяснено, что данный показатель варьирует даже в разных типах зубов, при этом длиннее всего теломеры в молярах. Средняя ошибка определения возраста составила 13 лет. Поэтому был сделан вывод, что определение возраста по длине теломер может быть дополнительным методом исследования, не дающим точной оценки возраста, но применимым в тех случаях, когда для исследования доступны лишь образцы зубов [26].

В целом можно отметить, что длина теломер непосредственно связана не только с возрастом, но и с уровнем окислительного стресса, сердечно-сосудистыми заболеваниями, ожирением, различными формами рака. Также показана связь укорочения теломер с психологическим стрессом, хотя разные исследования поразному оценивают значимость этой взаимосвязи [27].

Таким образом можно сделать вывод, что длина теломер скорее является показателем, важным для медицины, нежели для криминалистики, поскольку данный показатель ассоциирован с различными заболеваниями и варьирует как между отдельными индивидуумами, так и между различными типами клеток и тканей одного индивидуума.

ОЦЕНКА ВОЗРАСТА ИНДИВИДУУМОВ ПО ЧАСТОТЕ ПОВТОРОВ В ДНК

Еще одной группой показателей, которые используются в криминалистике, являются повторы в ДНК. Геном человека содержит более трех миллиардов пар оснований, при этом число белок-кодирующих генов в геноме составляет около 1.5%. Остальная ДНК долгое время считалась “мусорной”, однако, более поздние исследования показывают, что зачастую такая “некодирующая” ДНК содержит важные регуляторные области, некодирующие РНК, повторы, транспозоны и псевдогены [28]. Часть этой “некодирующей” ДНК пред-

ставляет собой повторяющиеся последовательности – тандемные повторы (сателлиты, мини- и микросателлиты), а также длинные и короткие диспергированные повторы. Для оценки представленности повторов используются такие подходы, как анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (restriction fragment length polymorphisms (RFLP) и его производная – ДНК дактилоскопия (DNA fingerprinting), VNTR-анализ (variable-number tandem repeat analysis), типирование коротких повторяющихся последовательностей (short tandem repeat, STR) [29].

Анализ повторов в судебно-следственной практике в первую очередь применяется при идентификации индивидуума, поскольку для любого человека можно найти такое сочетание повторов, которое будет индивидуально и будет отличать его от любого другого индивидуума.

Поскольку частота повторов в ДНК как правило не изменяется в течение жизни индивидуума, она не информативна для оценки возраста. Однако анализ соматических перестроек подходит для оценки возраста индивидуума и одним из вариантов такого анализа является количественное определение специфических перестроек рецепторов Т-клеток (δ Rec- ψ Ja signal-joint/T-cell receptor excision circle (sjTREC) genomic DNA, sjTREC) при анализе образцов крови. В ходе развития Т-клеток происходит перестройка генов Т-клеточных рецепторов, что приводит к образованию эписомальных кольцевых молекул ДНК (sjTREC). Было показано, что с возрастом количество sjTREC уменьшается в результате процесса инволюции тимуса, начинающегося уже в первый год жизни человека и прогрессирующего на протяжении всей жизни. В пилотном исследовании по разработке данного типа маркеров анализ образцов крови 195 индивидуумов показал высокую статистически значимую корреляцию количества sjTREC с возрастом, $R^2 = 0.835$, ошибка составила 8.9 лет [30].

ОЦЕНКА ВОЗРАСТА ПО АНАЛИЗУ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Поскольку матричная РНК (мРНК) вне организма сильно подвержена деградации, долгое время считалось, что оценка экспрессии генов неприменима в криминалистической практике. Одной из проблем называлась возможность возникновения ложноотрицательных результатов из-за высокой скорости деградации образцов. С другой стороны, низкая стабильность мРНК может рассматриваться как положительный фактор, поскольку скорость деградации мРНК и других типов РНК может быть использована при разработке методов оценки возраста биологического материала. Другим фактором, ограничивающим применимость данного подхода, является ткане-

специфичность экспрессии, вследствие чего необходимо использовать тканеспецифичные маркеры, а также нормализовать образцы по их сохранности, так как уровень деградации РНК отличается в разных тканях и это различие может привести к возникновению ошибочных результатов. В качестве маркера нормализации по сохранности можно использовать транскрипт низкоэкспрессирующегося гена, который подвергается деградации с той же или большей скоростью, чем анализируемый ген [31]. Развитие методов и подходов привело к тому, что на сегодняшний день оценка представленности транскриптов при помощи ПЦР по конечной точке или количественной ПЦР в реальном времени являются распространенными методами, а для увеличения точности и воспроизводимости результатов применяют взвешенные балльные системы оценки, многомерное шкалирование, использование контролей и стандартов [32].

Поскольку микроРНК являются более стабильными, чем мРНК [33], некоторые авторы предлагают применять данный класс молекул для идентификации различных типов биологических жидкостей [34, 35]. Были выявлены маркерные микроРНК, которые позволяют различать образцы крови, спермы, слюны и вагинального секрета [36, 37]. Однако успешных исследований по применению данного типа РНК для оценки возраста индивидуума при подготовке данного обзора обнаружено не было.

В работе Peters с соавт. [38] для оценки возраста образцов периферической крови применялся метаанализ экспрессии генов. Всего были оценены профили экспрессии генов у 14 983 индивидуумов европейского происхождения. На первом этапе были использованы результаты шести исследований, в которые вошли 7074 образца крови, проанализированные с применением разных платформ. В “консенсусный” список генов, экспрессия которых была идентифицирована на всех платформах, вошло 11908 генов. После введения поправки на пол, количество клеток крови и курение, 2228 из них были ассоциированы с возрастом ($p < 4.2E^{-6}$). На втором этапе были проанализированы 7909 образцов крови, на которых ассоциация с возрастом подтвердилась для 1497 генов ($p < 2.2E^{-5}$). Результаты двух этапов исследования хорошо коррелировали друг с другом ($r = 0.972$). Для того, чтобы оценить возможность распространения результатов исследования на большее количество случаев, авторы проанализировали профили экспрессии выбранных 1497 генов на образцах древней ДНК, образцах ДНК из тканей мозга и в различных типах клеток крови. У американских индейцев ($n = 1457$) наблюдалась экспрессия 95% из 1497 генов, а 71% (1005 генов) были ассоциированы с хронологическим возрастом ($p < 0.05$). У

американцев испанского происхождения ($n = 1244$) наблюдалась экспрессия 40% из 1497 генов, а 74% (440 генов) были ассоциированы с хронологическим возрастом ($p < 0.05$). У афроамериканцев ($n = 1359$) наблюдалась экспрессия 99% из 1497 генов, а 27% (440 генов) были ассоциированы с хронологическим возрастом ($p < 0.05$). В проанализированных образцах тканей мозга (ткани мозжечка и лобной коры) наблюдалась экспрессия 58% генов, из них 19 (163 гена) и 26% (229 генов) соответственно, были ассоциированы с хронологическим возрастом. Среди 50 наиболее ассоциированных генов были выявлены три – *SERPINE2*, *LDHB* и *BZW2*, которые были ассоциированы с возрастом во всех проанализированных тканях ($p < 0.05$). Затем исследователи проанализировали влияние изменений профилей метилирования на ассоциации 1497 генов с возрастом. Проводили оценку профилей метилирования 135230 CpG-сайтов в области ± 250 тпн от генов, ассоциированных с возрастом. Анализ проводили на образцах цельной крови или мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) из семи когорт ($n = 3073$). Для 31331 CpG-сайтов были установлены ассоциации метилирования с хронологическим возрастом, а для 12280 сайтов – ассоциации между метилированием и уровнем экспрессии расположенных рядом генов ($p < 3.7E^{-7}$). Из 1497 ассоциированных с возрастом генов наблюдались ассоциации для 1248 генов, при этом в области ± 250 тпн наблюдалось слабое обогащение дифференциально метилированными CpG, ассоциированными с возрастом (отношение шансов $OR = 1.04$; 95%-ный доверительный интервал $CI = 1.02-1.06$; $P = 7.9E^{-5}$), но при этом сильное обогащение CpG-сайтами, ассоциированными с экспрессией генов. Исследователи сравнили разработанный ими транскриптомный предиктор возраста с двумя опубликованными исследованиями, в которых хронологический возраст определялся по профилям метилирования [39, 40] путем анализа 1396 образцов. Транскриптомный предиктор показывал более низкую корреляцию с хронологическим возрастом, чем эпигенетические маркеры [38].

Таким образом можно сделать вывод, что в настоящее время подходы, основанные на оценке профилей метилирования ДНК, являются более перспективными для предсказания хронологического возраста образцов.

ОЦЕНКА ВОЗРАСТА ИНДИВИДУУМОВ ПО УРОВНЯМ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Метилирование ДНК является процессом модификации молекулы ДНК без изменения ее последовательности путем присоединения метильной группы к углероду в C5-положении цитозина в составе динуклеотида CpG с образованием 5-метилцитозина. Эта реакция осуществляется семейством фер-

ментов ДНК-метилтрансфераз (у человека это DNMT3A и DNMT3B, которые *de novo* добавляют метильные группы к неметилированным участкам, а также DNMT1, которая копирует паттерн метилирования на дочернюю цепь ДНК после репликации в ходе деления клеток). Деметилирование осуществляется семейством ТЕТ метилцитозин диоксигеназ, которые катализируют первый этап деметилирования, задействуя систему эксцизионной репарации [41, 42].

Метилирование ДНК может возникать как в отдельных CpG-локусах, так и затрагивать целые области — CpG-островки. CpG-островки — это области с повышенной представленностью CpG, которые обычно располагаются вблизи регуляторных областей генов и являются слабо метилированными. Повышение уровня метилирования регуляторной области гена как правило приводит к ингибированию его экспрессии через воздействие на сайт связывания транскрипционных факторов, изменение активности инсуляторных областей и компактизацию целого участка хромосомы. Среди факторов, которые приводят к изменениям уровней метилирования ДНК, можно отметить дифференцировку клеток, старение, генетическую вариабельность, воздействие окружающей среды: воздействие солнечного света и ультрафиолетового излучения, инфекции, физические упражнения, питание, употребление алкоголя, стрессы и т.д. [43]. Некоторые исследования показали, что ограничения калорийности рациона и физические упражнения позволяют изменить профили метилирования в скелетной мускулатуре и в тканях сердца, делая их сходными с более “молодыми” образцами. Кроме того, согласно некоторым исследованиям, они способны изменить профили метилирования в тканях мозга, и тем самым воздействовать на когнитивные функции [44, 45].

Впервые изменения уровня метилирования ДНК в онтогенезе и при старении были идентифицированы при анализе различных тканей и жизненных стадий лосося [43]. Позже было показано, что возрастное глобальное ДНК-гипометилирование наблюдается у самых разных видов, включая крыс, мышей и человека [43, 46]. Однако это правило не является универсальным для всех генов — например, с возрастом увеличивается уровень метилирования промоторных областей генов-мишеней белков группы Polycomb, так же как и уровень метилирования промоторов ключевых генов, связанных с развитием организма [47–49].

Появление микрочипов, развитие технологий масштабного параллельного секвенирования и расширение их применения в эпигенетике позволило выявить более специфические возрастные изменения профилей метилирования определенных генов или геномных областей. Были выявлены маркеры, уровни метилирования которых мо-

гут быть использованы для определения возраста индивидуума [49]. Важным моментом при использовании данных метилирования для предсказания возраста индивидуумов является оценка качества пробоподготовки образцов, а именно — качества бисульфитной конверсии. В последние годы количество публикаций, описывающих взаимосвязь профилей метилирования с возрастом, растет лавинообразно. Большинство исследователей используют анализ крови индивидуумов, однако встречаются и публикации с результатами анализа других биологических жидкостей, а также различных типов клеток [1]. Точность некоторых моделей для предсказания возраста индивидуумов по профилям метилирования уже достигла более высокого уровня, чем при применении вышеописанных методик (оценки длины теломер и др.) и достигает ошибки предсказания менее четырех лет. Краткое описание этих исследований приведено в табл. 1.

Зачастую при поиске информативных локусов исследователи пытаются найти гены с изменяющимися с возрастом профилями метилирования, которые имели бы биологические функции, релевантные для процессов старения (например участвующие в процессах репарации, метаболических каскадах или онкогенезе). Такие попытки не всегда успешны, поскольку хороший маркер не всегда связан с функцией. Однако в исследовании M. Wang и V. Lemos попытка поиска таких информативных локусов, обоснованных биологической функцией, оказалась весьма успешной [67]. Ученые обратили внимание на профили метилирования генов рибосомальной ДНК, которые являются высококонсервативной областью. Поскольку гены рибосомальной ДНК богаты повторами, точная сборка и картирование данного локуса долгое время были затруднены, поэтому не проводилось оценки уровней метилирования и их возрастных изменений. Однако в более ранних исследованиях размер и активность ядрышка, являющегося частью ядра клетки и отвечающего за образование рибосомных субъединиц, механистически уже ассоциировали с возрастом и долголетием [68].

Исследователи начали с того, что проанализировали результаты бисульфитного секвенирования ограниченных наборов геномных локусов (RRBS) образцов цельной крови 141 самца мышей линии C57BL/6 в возрасте от 0.67 до 35 месяцев (16 возрастных групп). Из 928 информативных CpG для 620 локусов, расположенных в транскрибируемых или промоторных областях рибосомальной ДНК была выявлена статистически достоверная положительная корреляция уровня метилирования с возрастом ($\text{page} > 0$, $FDR < 0.01$). Наиболее значимая ассоциация была обнаружена для локуса 7044, расположенного в области, кодирующей 5.8S субъединицу ($\text{page} = 0.78$, $P < 2.2 \times 10^{-16}$) [68].

Таблица 1. Исследования, посвященные оценке возраста индивидуумов на основе оценки профиля метилирования ДНК

Исследование	Проанализированные образцы	Метод анализа, платформа	Количество маркеров в финальной модели	Точность предсказания возраста на независимых выборках
Hannum et al. [39]	Две когорты ($N_1 = 482$, белая европейская популяция; $N_2 = 174$, латиноамериканская популяция), возраст 19 лет–101 год	Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Chip	71	Коэффициент корреляции 0.96, ошибка предсказания 3.9 лет
Steve Horvath [40]	Находящиеся в свободном доступе 82 набора данных, содержащие 7844 образцов, относящихся к 51 различному типу тканей и клеток	Illumina Human Methylation 27K, Illumina Human Methylation 450K	1.353 2.110	1. Коэффициент корреляции 0.96, ошибка предсказания 3.6 года 2. Коэффициент корреляции 0.95, ошибка предсказания 4.2 года
Bocklandt et al. [50]	Образцы слюны, полученные от 34 пар однояйцевых близнецов мужского пола, возраст 21–55 лет	Illumina Human Methylation 27K	Три сайта в промоторах генов <i>EDARADD</i> , <i>TOM1L1</i> и <i>NPTX2</i>	Коэффициент корреляции 0.87, ошибка предсказания 3.5 года
Koch, Wagner [51]	Публично доступные данные: образцы дермы, эпидермиса, вагинальных мазков, Т-клеток и моноцитов	Illumina Human Methylation 27K	1. CpG в генах <i>NPTX2</i> , <i>TRIM58</i> , <i>GRIA2</i> , <i>KCNQ1DN</i> , <i>BIRC4BP</i> 2. CpG в генах <i>NPTX2</i> , <i>GRIA2</i> и <i>KCNQ1DN</i>	1. Ошибка предсказания 12.7 лет 2. Ошибка предсказания 1.4 года
Weidner et al. [52]	Публично доступные данные: 575 образцов, ДНК из крови, возраст 0–78 лет	Illumina Human Methylation 27K, бисульфитное пиросеквенирование	1. 102 CpG 2. <i>ITGA2B</i> , <i>ASPA</i> и <i>PDE4C</i>	1. $R^2 = 0.98$, минимальная ошибка предсказания на независимой выборке 4.02 года 2. Ошибка предсказания 4.5 года
Yi et al. [53]	105 образцов периферической крови, возраст 10–72 года	Метилчувствительный репрезентативный дифференциальный анализ (MS-RDA)	Восемь дифференциально метилированных локусов: <i>TBOX3</i> , <i>GPR137</i> , <i>ZIC4</i> , <i>ZDNHC22</i> , <i>MEISI</i> , <i>UBE2E1</i> , <i>PTDSS2</i> и <i>UBQLN1</i>	$R^2 = 0.918$, корреляция реального возраста с предсказанным 0.91
Zbieć-Piekarcka et al. [54]	1. 303 образца крови, возраст 2–75 лет 2. Пятна крови, хранившихся при комнатной температуре 5–15 лет	Бисульфитная конверсия с пиросеквенированием	Два CpG в гене <i>ELOVL2</i>	1. $R^2 = 0.859$, ошибка предсказания 7 лет 2. Общая предсказательная сила модели сохранялась, уровень успешного определения возраста составлял 60–78%

Таблица 1. Продолжение

Исследование	Проанализированные образцы	Метод анализа, платформа	Количество маркеров в финальной модели	Точность предсказания возраста на независимых выборках
Zbieć-Piekarska et al. [55]	420 образцов, возраст 2–75 лет	Бисульфитная конверсия с пиросеквенированием	Четыре CpG, расположенных в локусах <i>ELOVL2</i> , <i>C1orf132</i> , <i>TRIM59</i> , <i>KLF14</i> и <i>FHL2</i>	Средняя ошибка определения возраста составила 3.9 лет, точность зависела от возраста исследуемого образца: для образцов возрастом 2–19 лет количество корректно оцененных образцов составляло 86.7%, и постепенно с увеличением возраста до 60–75 лет точность оценки снижалась до 50%
Beckaert et al. [56]	1. 206 образцов крови, возраст 0–91 лет, анализировались образцы и от живых, и от мертвых людей 2. 29 образцов зубов, возрастной диапазон 19–70 лет	Бисульфитная конверсия с пиросеквенированием	Четыре CpG, расположенных в генах <i>ASPA</i> , <i>PDE4C</i> , <i>ELOVL2</i> и <i>EDARADD</i>	1. $R^2 = 0.95$, ошибка предсказания 3.75 лет 2. $R^2 = 0.74$, ошибка предсказания 4.86 лет
Beckaert et al. [57]	50 образцов ДНК Buccalного эпителия, возраст от 0–73 лет	Бисульфитная конверсия с пиросеквенированием	Четыре CpG в генах <i>ASPA</i> , <i>PDE4C</i> , <i>ELOVL2</i> и <i>EDARADD</i>	$R^2 = 0.95$, ошибка предсказания 3.32
Park et al. [58]	Публично доступные данные базы GEO: GSE32148, GSE36064, GSE40005, GSE40279, GSE41169, GSE51032, GSE53128, GSE53740, всего 765 образцов ДНК крови корейцев, возраст 11–90 лет	Human Methylation 450 Bead-Chip, пиросеквенирование	cg16867657 (ген <i>ELOVL2</i>), cg04208403 (ген <i>ZNF423</i>), cg19283806 (ген <i>CCDC102B</i>)	Ошибка предсказания 6 лет, точность 77.30% в возрастной группе <60 лет, точность 57.30% в группе ≥60 лет
Huang et al. [59]	89 образцов крови, возраст 9–75 лет	Бисульфитная конверсия с пиросеквенированием	Четыре CpG в генах <i>ASPA</i> , <i>ITGA2B</i> и <i>NPTX2</i>	$R^2 = 0.819$, ошибка предсказания 7.99 лет
Cheng Xu et al. [60]	Образцы крови восьми пар монозиготных близнецов, 50 образцов крови, возраст 20–80 лет, женщины, Китай	Illumina Human Methylation 450 BeadChip, Sequenom MassARRAY	Шесть CpG в генах <i>ADAR</i> , <i>ITGA2B</i> , <i>PDE4C</i>	Минимальная ошибка предсказания 4.23 года

Таблица 1. Окончание

Исследование	Проанализированные образцы	Метод анализа, платформа	Количество маркеров в финальной модели	Точность предсказания возраста на независимых выборках
Freire-Aradas et al. [61]	Публично доступные данные базы GEO: GSE40279, GSE55763 GSE42861, собственные данные – 725 образцов крови, возраст 18–104 года	Illumina Human Methylation 450 BeadChip, Agena Bioscience EpiTYPER system	СрG в локусах <i>ELOVL2</i> , <i>ASPA</i> , <i>PDE4C</i> , <i>FHL2</i> , <i>CCDC102B</i> , <i>C1orf132</i> и <i>chr16:85395429</i>	$R^2 = 0.96$, ошибка предсказания 4.23 года
Florath et al. [62]	965 образцов крови, возраст 50–75 лет	Infinium Human Methylation 450 BeadChip	Десять СрG в локусах <i>ZYG11A</i> , <i>LRRC23</i> , <i>CBX4</i> , <i>SFMBT1</i> , <i>NW1D1</i> , <i>GPR62</i> , <i>cg16867657</i>	$r = 0.84$, ошибка предсказания 2.6 лет
Намапо et al. [63]	22 образца крови живых людей и 82 образца аутопсий	Бисульфитная конверсия и метилчувствительный анализ плавления высокого разрешения MS-HRM	Промоторы генов <i>ELOVL2</i> и <i>FHL2</i>	$R^2 = 0.83$, ошибка предсказания 7.71 лет
Намапо et al. [64]	263 образца ДНК слюны, возраст 1–73 лет, 16 образцов с сигаретных окурков	Бисульфитная конверсия и метилчувствительный анализ плавления высокого разрешения MS-HRM	Промоторы генов <i>ELOVL2</i> и <i>EDARADD</i>	$R^2 = 0.60$, ошибка предсказания для образцов слюны – 6.25 лет. Ошибка предсказания для образцов ДНК с сигаретных окурков 7.65 лет
Vidal-Bralo et al. [65]	Публично доступные данные базы GEO: GSE19711, GSE20242, GSE20236, GSE23638, возраст 20–78 лет, собственные данные – 57 образцов ДНК, возраст 45–89 лет	Illumina Methylation BeadChip 27K, MS-SNuPE	Восемь СрG: <i>cg16386080</i> , <i>cg24768561</i> , <i>cg19761273</i> , <i>cg25809905</i> , <i>cg09809672</i> , <i>cg02228185</i> , <i>cg17471102</i> , <i>cg10917602</i>	Ошибка предсказания 6.07 года
Naue et al. [66]	Публично доступные данные базы GEO: GSE42861, GSE51032, GSE55491, GSE61496, GSE66459, GSE66552, GSE67444, GSE74548. 324 образца цельной крови, возраст 18–69 лет	Infinium 450K Human Methylation BeadChip, бисульфитная конверсия и массивное параллельное секвенирование	1. 13 СрG в генах <i>DDO</i> , <i>ELOVL2</i> , <i>F5</i> , <i>GRM2</i> , <i>HOXC4</i> , <i>KLF14</i> , <i>LDB2</i> , <i>MEIS1-AS3</i> , <i>NKIRAS2</i> , <i>RPA2</i> , <i>SAMD10</i> , <i>TRIM59</i> , <i>ZYG11A</i> 2. Четыре СрG в генах <i>ELOVL2</i> , <i>F5</i> , <i>KLF14</i> , <i>TRIM59</i>	1. Ошибка предсказания 3.16 года, 3.93 года 2. Среднеквадратичная ошибка 4.63 года, ошибка предсказания 3.64 года

Верификация полученных результатов на двух независимых выборках образцов тканей мышей (18 образцов печени, полученных от самок мышей линии C3В6F1 двух возрастных групп (5 месяцев (молодые) и 26 месяцев (старые)), а также на выборке 62 образцов, полученных из тканей (головной мозг, сердце, печень и легкие) самцов мышей линии C57BL/6 J/Balb четырех возрастных групп (новорожденные, 14 недель, 27 недель и 41 неделя)) показала, что для различных тканей и разных линий мышей сохранялась зависимость уровней метилирования рибосомальных локусов CpG от возраста ($p \geq 0.24$, $P \leq 6.38 \times 10^{-9}$). Сравнение показателей корреляции метилирования с возрастом при полногеномном анализе метилирования показало значительно более низкую корреляцию уровней метилирования, чем при анализе локусов рибосомальной ДНК (9.14% CpG с $p > 0.2$ при полногеномном анализе против 71.8% для рибосомальной ДНК) [69].

Для того чтобы оценить, являются ли CpG рибосомальной ДНК достаточными для предсказания возраста образцов, исследователи проанализировали 816 локусов с применением регрессионной модели, основанной на алгоритме Elastic Net. Конечная модель включала в себя 736 локусов и предсказывала возраст с медианным значением коэффициента Спирмена $p = 0.92$ и MAE = 3.15 месяцев. Модель с наименьшим уровнем MAE была основана на оценке статуса 72 CpG, расположенных в рибосомальной ДНК. Затем авторы показали, что уровень метилирования рибосомальной ДНК является достаточно робастным показателем, и под воздействием генетических факторов и факторов окружающей среды, влияющих на продолжительность жизни, его изменения хорошо согласуются с возрастом [69].

Учитывая высокую консервативность анализируемого локуса, Wang и Lemos предположили возможность экстраполяции результатов, полученных на *Mus musculus* на другие виды (*Homo sapiens* и *Canis lupulus*) [67]. Для создания математических моделей были использованы CpG мыши, которые имели гомологи в геномах собаки и человека. При анализе гомологичных CpG (88 локусов) было получено медианное значение коэффициента Спирмена $p = 0.48$. Полногеномный анализ гомологичных локусов показал более низкий результат ($p = 0.22$). Когда модель, разработанная при исследовании препаратов ДНК из образцов крови и тканей мыши, была использована для оценки образцов человека (образцы кожи шести взрослых индивидуумов), была получена достаточно высокая корреляция показателей возраста ($p = 0.79$, $P = 0.0041$). Полученные результаты позволили авторам говорить о применимости разработанного ими метода для исследования других объектов [67].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние десять лет появилось большое количество исследований, посвященных поиску универсальных маркеров старения. На сегодняшний день наиболее точными и робастными в условиях ограниченного количества исходного материала являются методы, основанные на оценке профилей метилирования в различных тканях, в то время, как методы транскриптомики и метаболомики являются менее точными, а оценка длины теломера сильно варьирует между индивидуумами и отдельными тканями.

Вероятно, в ближайшем будущем развитие технологий предсказания возраста будет идти в двух направлениях: часть исследователей сосредоточится на анализе максимального количества точек и на объединении результатов проведенных исследований в крупные метаанализы с применением новых математических моделей, другая часть сосредоточит свое внимание на уменьшении стоимости и снижении временных затрат на анализ, что может быть достигнуто выбором небольшого консенсусного набора локусов и включением в анализ большего количества CpG-сайтов из одного и того же локуса. Исследования профилей метилирования при различных заболеваниях, в том числе ассоциированных с более ранним старением отдельных тканей и всего организма, также могут внести свой вклад в развитие технологии и разработку новых, более точных методов предсказания возраста на основе оценки профилей метилирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке научно-технической программы Союзного государства “Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства” (“ДНК-идентификация”) (ГК № 011-17 от 26.09.2017).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Freire-Aradas A., Phillips C., Lareu M.V. Forensic individual age estimation with DNA: From initial approaches to methylation tests // *Forensic Sci. Rev.* 2017. V. 29. № 2. P. 121–144.
2. Alkass K., Buchholz B.A., Ohtani S.T. et al. Age estimation in forensic sciences: application of combined aspartic acid racemization and radiocarbon analysis //

- Mol. Cell. Proteomics. 2010. V. 9. № 5. P. 1022–1030.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M900525-MCP200>
3. *Dumache R., Ciocan V., Muresan C. et al.* Molecular DNA analysis in forensic identification // *Clin. Lab.* 2016. V. 62. № 1–2. P. 245–248.
 4. *Lee S.B., Crouse C.A., Kline M.C.* Optimizing Storage and Handling of DNA Extracts // *Forensic Sci. Rev.* 2010. V. 22. № 2. P. 131–144.
<https://doi.org/10.1201/b15361>
 5. *Holland N.T., Smith M.T., Eskenazi B., Bastaki M.* Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies // *Mutat. Res.* 2003. V. 543. № 3. P. 217–234.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00090-X)
 6. *Pereira F., Carneiro J., Amorim A.* Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges // *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 2008. V. 2. № 3. P. 187–199.
<https://doi.org/10.2174/187221508786241738>
 7. *Kayser M.* Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015. V. 18. P. 33–48.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.003>
 8. *Meissner C., Ritz-Timme S.* Molecular pathology and age estimation // *Forensic Sci. Int.* 2010. V. 203. № 1–3. P. 34–43.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.010>
 9. *Zapico S.C., Ubelaker D.H.* Relationship between mitochondrial DNA mutations and aging. Estimation of age-at-death // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2016. V. 71. № 4. P. 445–450.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glv115>
 10. *Zapico S.C., Ubelaker D.H.* mtDNA Mutations and their role in aging, diseases and forensic sciences // *Aging Dis.* 2013. V. 4. № 6. P. 364–380.
<https://doi.org/10.14336/AD.2013.0400364>
 11. *Theves C., Keyser-Tracqui C., Crubezy E. et al.* Detection and quantification of the age-related point mutation A189G in the human mitochondrial DNA // *J. Forensic Sci.* 2006. V. 51. № 4. P. 865–873.
<https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00163.x>
 12. *Lacan M., Theves C., Keyser C. et al.* Detection of age-related duplications in mtDNA from human muscles and bones // *Int. J. Legal. Med.* 2011. V. 125. № 2. P. 293–300.
<https://doi.org/10.1007/s00414-010-0440-x>
 13. *Damas J., Samuels D.C., Carneiro J. et al.* Mitochondrial DNA rearrangements in health and disease – a comprehensive study // *Hum. Mutat.* 2014. V. 35. № 1. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1002/humu.22452>
 14. *Meissner C., von Wurmb N., Schimansky B., Oehmichen M.* Estimation of age at death based on quantitation of the 4977-bp deletion of human mitochondrial DNA in skeletal muscle // *Forensic Sci. Int.* 1999. V. 105. № 2. P. 115–124.
[https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(99\)00126-7](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(99)00126-7)
 15. *von Wurmb-Schwark N., Higuchi R., Fenech A.P. et al.* Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR1 // *Forensic Sci. Int.* 2002. V. 126. № 11. P. 34–39.
[https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(02\)00026-9](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00026-9)
 16. *Meissner C., Bruse P., Mohamed S.A. et al.* The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: a useful biomarker or more? // *Exp. Gerontol.* 2008. V. 43. № 7. P. 645–652.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.03.004>
 17. *Liu V.W., Zhang C., Nagley P.* Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing // *Nucl. Acid. Res.* 1998. V. 26. № 5. P. 1268–1275.
<https://doi.org/10.1093/nar/26.5.1268>
 18. *Polisecki E.Y., Schreiber L.E., Ravioli J., Corach D.* Common mitochondrial DNA deletion associated with sudden natural death in adults // *J. Forensic Sci.* 2004. V. 49. № 6. P. 1335–1338.
<https://doi.org/10.1520/JFS2004073>
 19. *He S., Sharpless N.E.* Senescence in health and disease // *Cell.* 2017. V. 169. № 6. P. 1000–1011.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>
 20. *Tsuji A., Ishiko A., Takasaki T., Ikeda N.* Estimating age of humans based on telomere shortening // *Forensic Sci. Int.* 2002. V. 126. № 3. P. 197–199.
[https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(02\)00086-5](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00086-5)
 21. *O'Callaghan N.J., Fenech M.* A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length // *Biol. Proced. Online.* 2011. V. 13. P. 3.
<https://doi.org/10.1186/1480-9222-13-3>
 22. *Aubert G., Hills M., Lansdorp P.M.* Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools // *Mutat. Res.* 2012. V. 730. № 1–2. P. 59–67.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.04.003>
 23. *Montpetit A.J., Alhareeri A.A., Montpetit M. et al.* Telomere length: a review of methods for measurement // *Nurs. Res.* 2014. V. 63. № 4. P. 289–299.
<https://doi.org/10.1097/NNR.0000000000000037>
 24. *Srettabunjong S., Sattisri S., Thongnoppakhun W., Tirawanchai N.* The study on telomere length for age estimation in a Thai population // *Am. J. Forensic. Med. Pathol.* 2014. V. 35. № 2. P. 148–153.
<https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000095>
 25. *Karlsson A.O., Svensson A., Marklund A., Holmlund G.* Estimating human age in forensic samples by analysis of telomere repeats // *Forensic Sci. Intern.: Genetics Supplement Series.* 2008. V. 1. № 1. P. 569–571.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2007.10.153>
 26. *Marquez-Ruiz A.B., Gonzalez-Herrera L., Valenzuela A.* Usefulness of telomere length in DNA from human teeth for age estimation // *Int. J. Legal. Med.* 2018. V. 132. № 2. P. 353–359. 2017.
<https://doi.org/10.1007/s00414-017-1595-5>
 27. *Mathur M.B., Epel E., Kind S. et al.* Perceived stress and telomere length: A systematic review, meta-analysis, and methodologic considerations for advancing the field // *Brain Behav. Immun.* 2016. V. 54. P. 158–169.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.002>
 28. *Ling H., Vincent K., Pichler M. et al.* Junk DNA and the long non-coding RNA twist in cancer genetics // *Oncogene.* 2015. V. 34. № 39. P. 5003–5011.
<https://doi.org/10.1038/onc.2014.456>

29. *Panneerchelvam S., Norazmi M.N.* Forensic DNA profiling and database // *Malays. J. Med. Sci.* 2003. V. 10. № 2. P. 20–26.
30. *Zubakov D., Liu F., Kokmeijer I. et al.* Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2016. V. 24. P. 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.05.014>
31. *Vennemann M., Koppelkamm A.* mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations // *Forensic Sci. Int.* 2010. V. 203. № 1–3. P. 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.006>
32. *Wang Z., Zhang J., Luo H. et al.* Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2013. V. 7. № 1. P. 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.07.006>
33. *Aryani A., Denecke B.* In vitro application of ribonucleases: comparison of the effects on mRNA and miRNA stability // *BMC Res. Notes.* 2015. V. 8. № 164. P. 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1114-z>
34. *Hanson E., Lubenow H., Ballantyne J.* Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs // *Anal Biochem.* 2009. V. 387. № 2. P. 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.037>
35. *Bavykin A.* Circulating microRNAs in the identification of biological fluids: a new approach to standardization of expression-based diagnostics // *Mol. Biol. (Mosk)* 2017. V. 51. № 4. P. 506–513. <https://doi.org/10.1134/S0026893317040045>
36. *Silva S.S., Lopes C., Teixeira A.L. et al.* Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015. V. 14. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.09.002>
37. *Sijen T.* Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015. V. 18. P. 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.11.015>
38. *Peters M.J., Joehanes R., Pilling L.C. et al.* The transcriptional landscape of age in human peripheral blood // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 8570. <https://doi.org/10.1038/ncomms9570>
39. *Hannum G., Guinney J., Zhao L. et al.* Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates // *Mol. Cell.* 2013. V. 49. № 2. P. 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016>
40. *Horvath S.* DNA methylation age of human tissues and cell types // *Genome Biol.* 2013. V. 14. № 10. P. R115. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0649-6>
41. *Jones P.A.* Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. № 7. P. 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
42. *Smith Z.D., Meissner A.* DNA methylation: roles in mammalian development // *Nat. Rev. Genet.* 2013. V. 14. № 3. P. 204–220. <https://doi.org/10.1038/nrg3354>
43. *Jung S.E., Shin K.J., Lee H.Y.* DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids // *BMB Rep.* 2017. V. 50. № 11. P. 546–553. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.11.175>
44. *Park S.K., Prolla T.A.* Lessons learned from gene expression profile studies of aging and caloric restriction // *Ageing Res. Rev.* 2005. V. 4. № 1. P. 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2004.09.003>
45. *Fernandes J., Arida R.M., Gomez-Pinilla F.* Physical exercise as an epigenetic modulator of brain plasticity and cognition // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2017. V. 80. P. 443–456. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.06.012>
46. *Wilson V.L., Smith R.A., Mag S., Cutler R.G.* Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 21. P. 9948–9951.
47. *Rakyan V.K., Down T.A., Maslau S. et al.* Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains // *Genome Res.* 2010. V. 20. № 4. P. 434–439. <https://doi.org/10.1101/gr.103101.109>
48. *Dozmorov M.G.* Polycomb repressive complex 2 epigenomic signature defines age-associated hypermethylation and gene expression changes // *Epigenetics.* 2015. V. 10. № 6. P. 484–495. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1040619>
49. *Mozhui K., Pandey A.K.* Conserved effect of aging on DNA methylation and association with EZH2 polycomb protein in mice and humans // *Mech. Ageing Dev.* 2017. V. 162. P. 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.02.006>
50. *Bocklandt S., Lin W., Sehl M.E. et al.* Epigenetic predictor of age // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 6. P. e14821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014821>
51. *Koch C.M., Wagner W.* Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues // *Ageing (Albany NY).* 2011. V. 3. № 10. P. 1018–1027. <https://doi.org/10.18632/aging.100395>
52. *Weidner C.I., Lin Q., Koch C.M. et al.* Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites // *Genome Biol.* 2014. V. 15. № 2. P. R24. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r24>
53. *Yi S.H., Xu L.C., Mei K. et al.* Isolation and identification of age-related DNA methylation markers for forensic age-prediction // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014. V. 11. P. 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.03.006>
54. *Zbiec-Piekarska R., Spolnicka M., Kupiec T. et al.* Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015. V. 14. P. 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.10.002>
55. *Zbiec-Piekarska R., Spolnicka M., Kupiec T. et al.* Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015. V. 17. P. 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.001>
56. *Bekaert B., Kamalandua A., Zapico S.C. et al.* Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers // *Epigenetics.* 2015. V. 10. № 10. P. 922–930. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1080413>

57. *Bekaert B., Kamalandua A., Zapicoc S.C. et al.* A selective set of DNA-methylation markers for age determination of blood, teeth and buccal samples // *Forensic Sci. Int. Genet., Suppl. Series.* 2015. V. 5. P. e144–e145.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.058>
58. *Park J.L., Kim J.H., Seo E. et al.* Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2016. V. 23. P. 64–70.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.03.005>
59. *Huang Y., Yan J., Hou J. et al.* Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015. V. 17. P. 129–136.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.007>
60. *Xu C., Qu H., Wang G. et al.* A novel strategy for forensic age prediction by DNA methylation and support vector regression model // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 17788.
<https://doi.org/10.1038/srep17788>
61. *Freire-Aradas A., Phillips C., Mosquera-Miguel A. et al.* Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2016. V. 24. P. 65–74.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.06.005>
62. *Florath I., Butterbach K., Mülle H. et al.* Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites // *Hum. Mol. Genet.* 2014. V. 23. № 5. P. 1186–1201.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddt531>
63. *Hamano Y., Manabe S., Morimoto C. et al.* Forensic age prediction for dead or living samples by use of methylation-sensitive high resolution melting // *Leg. Med. (Tokyo).* 2016. V. 21. P. 5–10.
<https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.05.001>
64. *Hamano Y., Manabe S., Morimoto C. et al.* Forensic age prediction for saliva samples using methylation-sensitive high resolution melting: exploratory application for cigarette butts // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 10444.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-10752-w>
65. *Vidal-Bralo L., Lopez-Golan Y., Gonzalez A.* Simplified assay for epigenetic age estimation in whole blood of adults // *Front. Genet.* 2016. V. 7. P. 126.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00126>
66. *Naue J., Hoefsloot H.C.J., Mook O.R.F. et al.* Chronological age prediction based on DNA methylation: Massive parallel sequencing and random forest regression // *Forensic Sci. Int.: Suppl. Genetics.* 2017. V. 31. C. P. 19–28.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.015>
67. *Wang M., Lemos B.* Ribosomal DNA harbors an evolutionarily conserved clock of biological aging // *Genome Res.* 2019. V. 29. № 3. P. 325–333.
<https://doi.org/10.1101/gr.241745.118>
68. *Buchwalter A., Hetzer M.W.* Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 328.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00322-z>
69. *Stubbs T.M., Bonder M.J., Stark A.K. et al.* Multi-tissue DNA methylation age predictor in mouse // *Genome Biol.* 2017. V. 18(1). P. 68.
<https://doi.org/10.1186/s13059-017-1203-5>

Current Molecular Genetic Techniques of the Age Estimation in Forensics

A. D. Zolotareno^a, E. V. Chekalin^a, and S. A. Bruskin^{a, *}

^a*Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: sergey.bruskin@gmail.com*

This article reviews the current molecular genetic methods for determining the age of an individual using various tissue samples. Age estimation methods based on the evaluation of the mutation rates of mitochondrial DNA, the length of telomeres, the frequency of DNA repeats, the changes of gene expression, the DNA methylation levels are discussed. The performed literature review allowed us to conclude the evaluation of the DNA methylation profiles to be the most promising method to increase the accuracy of age prediction for various types of samples with limited quantity and quality. The development of new prediction models will increase the accuracy of age estimation.

Keywords: age estimation, DNA identification, DNA methylation, forensics.