

Медико-биологические проблемы жизнедеятельности

Научно-практический рецензируемый журнал

№ 2(26)

2021 г.

Учредитель

Государственное учреждение
«Республиканский научно-
практический центр
радиационной медицины
и экологии человека»

Журнал включен в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования диссертационных исследований по медицинской и биологической отраслям науки (31.12.2009, протокол 25/1)

Журнал зарегистрирован Министерством информации Республики Беларусь, Свид. № 762 от 6.11.2009

Подписано в печать 30.09.21
Формат 60×90/8. Бумага мелованная.
Гарнитура «Times New Roman».
Печать цифровая. Тираж 130 экз.
Усл. печ. л. 21,75. Уч.-изд. л. 13,99.
Зак. 81.

Издатель ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»
Свидетельство N 1/410 от 14.08.2014

Отпечатано в КУП
«Редакция газеты
«Гомельская праўда»
г. Гомель, ул. Полесская, 17а

ISSN 2074-2088

Главный редактор, председатель редакционной коллегии

А.В. Рожко (д.м.н., доцент)

Редакционная коллегия

В.С. Аверин (д.б.н., профессор, зам. гл. редактора), В.В. Аничкин (д.м.н., профессор), В.Н. Беляковский (д.м.н., профессор), К.Н. Буздакин (к.т.н., доцент), Н.Г. Власова (д.б.н., профессор, научный редактор), А.В. Величко (к.м.н., доцент), И.В. Веякин (к.б.н., доцент), А.В. Воропаева (к.б.н., доцент), Д.И. Гавриленко (к.м.н.), А.В. Жарикова (к.м.н.), С.В. Зыблева (к.м.н., отв. секретарь), С.А. Игумнов (д.м.н., профессор), А.В. Коротаев (к.м.н., доцент), А.Н. Лызилов (д.м.н., профессор), А.В. Макарич (к.м.н., доцент), С.Б. Мельнов (д.б.н., профессор), В.М. Мицура (д.м.н., доцент), Я.Л. Навменова (к.м.н., доцент), Э.А. Надыров (к.м.н., доцент), И.А. Новикова (д.м.н., профессор), Э.Н. Платошкин (к.м.н., доцент), Э.А. Повелица (к.м.н.), А.С. Подгорная (к.м.н.), Ю.И. Рожко (к.м.н., доцент), И.П. Ромашевская (к.м.н.), М.Г. Русаленко (к.м.н., доцент), А.П. Саливончик (к.б.н.), А.Е. Силян (к.б.н., доцент), А.Н. Стожаров (д.б.н., профессор), И.О. Стома (д.м.н., доцент), Н.И. Шевченко (к.б.н., доцент), Ю.И. Ярец (к.м.н., доцент)

Редакционный совет

Е.Л. Богдан (МЗ РБ, Минск), А.В. Аклеев (д.м.н., профессор, Челябинск), О.В. Алейникова (д.м.н., чл.-кор. НАН РБ, Минск), С.С. Алексанин (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Д.А. Базыка (д.м.н., профессор, Киев), А.П. Бирюков (д.м.н., профессор, Москва), Л.А. Бокерия (д.м.н., академик РАН и РАМН, Москва), А.Ю. Бушманов (д.м.н., профессор, Москва), И.И. Дедов (д.м.н., академик РАМН, Москва), В.И. Жарко (Минск), М.П. Захарченко (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Л.А. Ильин (д.м.н., академик РАМН, Москва), К.В. Котенко (д.м.н., профессор, Москва), В.Ю. Кравцов (д.б.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Г. Кручинский (д.м.н., профессор, Пинск), Т.В. Мохорт (д.м.н., профессор, Минск), Д.Л. Пиневиц (МЗ РБ, Минск), В.Ю. Рыбников (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Д. Тронько (д.м.н., чл.-кор. НАН, акад. НАМН Украины, Киев), А.Л. Усс (д.м.н., профессор, Минск), В.А. Филонюк (к.м.н., доцент, Минск), Р.А. Часнойть (к.э.н., Минск), В.Д. Шило (Минск)

Технический редактор

С.Н. Никонович

Адрес редакции 246040 г. Гомель, ул. Ильича, д. 290,
ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», редакция журнала
тел (0232) 38-95-00, факс (0232) 37-80-97
<http://www.mbp.rcrm.by> e-mail: mbp@rcrm.by

© Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека», 2021

№ 2(26)

2021

Medical and Biological Problems of Life Activity

Scientific and Practical Journal

Founder

Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

Journal registration
by the Ministry of information
of Republic of Belarus

Certificate № 762 of 6.11.2009

© Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

ISSN 2074-2088

Обзоры и проблемные статьи

- А.В. Величко, С.Л. Ачинович, Ю.В. Бондарева**
Морфологические аспекты в диагностике аденомы и гиперплазии паращитовидных желез (обзор литературы) 6
- Б.О. Кабешев**
Серебро и нанотехнологии при профилактике развития инфекции области хирургического вмешательства 13
- В.М. Мицура**
Последствия перенесенной инфекции COVID-19 и возможности реабилитации пациентов с пост-ковидным синдромом 22
- Е.В. Молчанова, Л.М. Габдрахманов, Ю.И. Рожко, А.В. Куроедов, И.Р. Газизова, Н.А. Бакунина, Ю.П. Сотникова**
Сахарный диабет и глаукома: взаимосвязи патогенетических механизмов развития заболеваний 28

Медико-биологические проблемы

- О.Е. Клементьева, А.С. Лунёв, К.А. Лунёва, Г.Г. Шимчук**
Дифференциальная визуализация злокачественных и доброкачественных процессов с использованием фторированного тимидина у лабораторных животных 38
- В.А. Лемеш, В.Н. Кипень, М.В. Богданова, А.А. Буракова, А.Г. Булгак, А.В. Байда, О.В. Зотова, М.А. Кругликова, О.И. Добыш, В.И. Сакович**
Метилирование ДНК в образцах буккального эпителия человека в связи с определением возраста 44
- В.П. Невзоров, Т.М. Буланова, В.В. Пырву**
Математическая модель изменения состояния здоровья населения и демографии в едином территориально-временном пространстве 53
- Е.С. Пашинская**
Экспрессия сурвивина (*BIRC5*), эпидермального фактора роста (*ErbB-2/HER2-Neu*), фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*) и антионкогена *TP53* при токсоплазмозе во время развития экспериментальной глиомы 63

Reviews and problem articles

- A.V. Velichko, S.L. Achinovich, Y.V. Bondareva**
Morphological aspects in the diagnosis of adenoma and parathyroid hyperplasia (literature review) 6
- B. Kabeshev**
Silver and nanotechnologies in modification of suture material for prevention of surgical site infection 13
- V.M. Mitsura**
Long-term consequences of COVID-19 infection and the rehabilitation options for patients with post-covid syndrome 22
- E.V. Molchanova, L.M. Gabdrakhmanov, Yu.I. Razhko, A.V. Kuroyedov, I.R. Gazizova, N.A. Bakunina, Yu.P. Sotnikova**
Diabetes mellitus and glaucoma: interrelations of pathogenetic mechanisms of disease development 28

Medical-biological problems

- O.E. Klement'eva, A.S. Lunev, K.A. Luneva, G.G. Shimchuk**
Differential visualization of malignant and benign processes using fluorinated thymidine in laboratory animals 38
- V.A. Lemesh, V.N. Kipen, M.V. Bahdanava, A.A. Burakova, A.G. Bulgak, A.V. Bayda, O.V. Zotova, M.A. Kruglikova, O.I. Dobysh, V.I. Sakovich**
DNA methylation in human buccal epithelium samples in determining age 44
- V.P. Nevzorov, T.M. Bulanova, V.V. Pyrvu**
Mathematical model of change of a state of health of the population and demography in uniform territorial and time space 53
- E.S. Pashinskaya**
Expression of survivin (*BIRC5*), epidermal growth factor (*ErbB-2/HER2-Neu*), vascular endothelial growth factor (*VEGF*) and anti-oncogene *TP53* in toxoplasmosis during the development of experimental glioma 63

Н.Л. Проскурякова, А.В. Симаков, Т.М. Алферова К вопросу сочетанного действия ионизирующей радиации и вредных факторов на организм человека	70	N.L. Proskuryakova, A.V. Simakov, T.M. Alferova To the question of the combined effect of ionizing radiation and harmful factors on the human body	
М.Н. Стародубцева, И.А. Челнокова, А.Н. Шклярора, Е.В. Цуканова, О.В. Шаховская, Н.И. Егоренков, Н.Н. Веялкина Наноархитектоника и наномеханические свойства поверхности эритроцитов человека и мыши линии BALB/c после облучения цельной крови рентгеновским излучением в дозе 0,5 Гр	77	M.N. Starodubtseva, I.A. Chelnokova, A.N. Shklyarova, A.U. Tsukanava, O.V. Shakhovskaya, N.I. Yegorenkov, N.N. Veyalkina Nanoarchitectonics and nanomechanical properties of the surface of human and mouse erythrocytes of the BALB/c line after irradiation of whole blood with x-ray radiation at a dose of 0,5 Gy	
Д.А. Чечетин Динамика антропометрических показателей позвоночника и стоп в процессе реабилитационных мероприятий при нарушениях осанки у детей	85	D.A. Chechetin Dynamics of anthropometric indicators of spine and feet during the process of rehabilitation measures for children posture disorders	
Клиническая медицина		Clinical medicine	
О.Н. Василькова, И.Ю. Пчелин, В.К. Байрашева, Я.А. Боровец, Ю.И. Ярец, Я.Л. Навменова, Е.П. Науменко, Т.В. Мохорт Кардиопротективные эффекты эмпаглифлозина и вилдаглиптина: клинико-инструментальная оценка структурно-функциональных показателей сердца и сердечных маркеров у пациентов с СД 2 типа	91	V.N. Vasilkova, I.Yu. Pchelin, V.K. Bayrasheva, Ya.A. Borovets, Yu.I. Yarets, Ya.L. Navmenova, E.P. Naumenka, T.V. Mokhort Cardioprotective effects of empagliflozin and vildagliptin: clinical and instrumental assessment of structural and functional parameters of the heart and cardiac markers in patients with diabetes type 2	
В.В. Гарькавенко Клинико-демографическая характеристика пациентов с первичной открытоугольной глаукомой и эффективность их хирургического лечения в Красноярском крае	99	V.V. Gar'kavenko Clinical and demographic characteristics of patients with primary open-angle glaucoma and the efficiency of their surgical treatment in Krasnoyarsk region	
С.Л.Зыблев, С.В.Зыблева, Л.Е.Коротаева Цитокиновый профиль реципиентов почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде	105	S. Zyblev, S. Zybleva, L. Korotaeva Cytokine profile in kidney transplant recipients in the early postoperative period	
Н.А. Метляева, А.Ю. Бушманов, И.А. Галстян, А.А. Давтян, В.В. Кореньков, О.В. Щербатых Психофизиологическая адаптация двух пациентов с острой лучевой болезнью и лейкозом, пострадавших в аварии на ЧАЭС	111	N.A. Metlyaeva, A.Yu. Bushmanov, I.A. Galstyan, A.A. Davtyan, V.V. Korenykov, O.V. Shcherbatykh Psychophysiological adaptation of two patients with acute radiation sickness and leukemia affected in the accident at Chernobyl NPP	

Е.А. Полякова, С.А. Берестень, М.В. Стёганцева, И.Е. Гурьянова, Д.В. Луцкович, М.В. Белевцев

Оценка влияния перинатальных и интранатальных факторов на количество копий ТРЭК/КРЕК у недоношенных новорожденных

121

В.В. Татчихин

Клинические результаты хирургического лечения пациентов при раке оррофарингеальной области

128

Ю.И. Ярец, Н.И. Шевченко, В.Н. Мартинков
Биологические свойства *Staphylococcus aureus*-продуцентов биопленки, выделенных из раневого отделяемого пациентов

134

Обмен опытом

Н.А. Бакунина, Ю.П. Сотникова, Ю.И. Рожко, А.В. Куроедов, И.Р. Газизова, Е.В. Молчанова, Л.М. Габдрахманов

Современный взгляд на эпидемиологию, классификацию и генетику закрытоугольной глаукомы

144

А.Ю. Бушманов, Н.А. Богданенко, В.А. Ратников

Метрологическое обеспечение и стандартизация основных направлений деятельности ФГБУ «ГНЦ РФ – ФМБЦ им. А.И. Бурназяна» ФМБА России в области радиобиологии, радиационной и химической защиты и безопасности, радиационного и дозиметрического контроля, медико-биологической безопасности неионизирующих излучений

153

Л.П. Зайцева, В.Н. Беляковский, Д.М. Лось, В.В. Похожай

Способы стандартизации цитологического исследования клеточного осадка мочи

159

Ю.И. Рожко, И.А. Глушнёв, Н.А. Ребенко, А.В. Куроедов, А.Ю. Брежнев

Оригинальные авторские идеи в сфере лечения глаукомы (обзор изобретений по базам патентов)

165

E.A. Polyakova, S.A. Beresten, M. V. Stegantseva, I.E. Guryanova, D.V. Lutsckovich, M.V. Belevtsev

Assessment of the Influence of Perinatal and Intranatal Factors on the Number of TREC/KREC Copies in Premature Infants

V.V. Tatchikhin

Clinical results of surgical treatment of patients with oropharyngeal cancer

Y.I. Yarets, N.I. Shevchenko, V.N. Martinkov

Biological properties of *Staphylococcus aureus* – biofilm producers isolated from wound swabs from patients

Experience exchange

N.A. Bakunina, Yu.P. Sotnikova, Yu.I. Razhko, A.V. Kuroyedov, I.R. Gazizova, E.V. Molchanova, L.M. Gabdrakhmanov

Modern aspects of epidemiology, classification and genetics of angle-closure glaucoma

A.Yu. Bushmanov, N.A. Bogdanenko, V.A. Ratnikov

Metrological support and standardization of the main activities of State research center Burnasyan Federal medical biophysical center of Federal medical biological agency in the field of radiobiology, radiation and chemical protection and safety, radiation and dosimetric control, medical and biological safety of non-ionizing radiation

L.P. Zaitsava, V.N. Belyakovski, D.M. Los, V.V. Pohozhay

Ways to standardize the cytological examination of urine cell sludge

Yu.I. Razhko, I.A. Glushnev, N.A. Rebenok, A.V. Kuroyedov, A.Yu. Brezhnev

Original author's ideas in field of glaucoma treatment (review of inventions from patent databases)

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК В ОБРАЗЦАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА В СВЯЗИ С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ВОЗРАСТА

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии» НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь;

²Государственное учреждение «РНПЦ «Кардиология», г. Минск, Беларусь;

³ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Беларусь

На основании биоинформатического и статистического анализа ГЕО-проектов по определению полногеномного профиля метилирования ДНК человека сформирован перечень из CpG-динуклеотидов с высоким прогностическим потенциалом для создания моделей предсказания возраста человека по образцам буккального эпителия. Определен уровень метилирования для 466 образцов индивидов из Республики Беларусь, рассчитаны коэффициенты корреляции R и построены математические модели определения возраста человека. Среднее значение точности предсказания возраста по образцам буккального эпителия составило 4,6 года. Полученные результаты будут положены в основу при разработке калькуляторов предсказания возраста индивида по биологическим следам для экспертов-криминалистов.

Ключевые слова: криминалистика, определение возраста, буккальный эпителий, метилирование ДНК, HumanMethylation450 BeadChip

Введение

Для снижения смертности от внешних причин принципиально важное значение имеет вопрос обеспечения национальной и личной безопасности, в том числе эффективное предупреждение преступлений против личности и идентификация преступников. Причем особую социальную значимость имеет максимально быстрое раскрытие таких резонансных преступлений как террористические акты и серийные преступления. Нередко ключевое значение для задержания преступников имеет быстрота розыска, выявление и достоверность установления их личности. Современные достижения генетики позволяют повысить эффективность розыска преступника и идентификации его личности в сочетании с другими известными в криминалистике методами. Получение информации для проведения оперативно-розыскных мероприятий на основе разви-

тия генетических технологий становится возможным практически по любым биологическим следам, остающимся на месте преступления.

В криминалистической практике для установления личности подозреваемого зачастую в качестве биологических образцов используются следы слюны и содержащиеся в ней клетки буккального эпителия. Слизистая оболочка внутренней поверхности щеки человека представлена многослойным плоским неороговевающим эпителием, который обновляется за счет деления базального слоя. Базальные клетки в процессе созревания постепенно выходят в поверхностный слой. Время, которое необходимо для выхода клеток в верхний слой, индивидуально и зависит от характера воздействия факторов внешней среды на организм. Клетки буккального эпителия проникают в верхний пласт через 5-14 дней, данный параметр весьма вари-

ативен у различных людей [1]. На клетки в ротовой полости человека воздействует множество факторов окружающей среды, а также индивидуальные алиментарные и вредные привычки человека. К тому же в случае медленной скорости обновления клеточных пулов в ротовой полости эффект влияния ксенобиотиков на эпигеном клетки может также быть недооценен, что и отразится на разности биологического и хронологического возраста человека при молекулярно-генетическом исследовании [2].

Изменение организма с возрастом (старение) связывают с изменением эпигенетических процессов в организме человека, в частности, с уровнем метилирования ДНК в CpG-динуклеотидах. Молекулярно-генетический анализ данных изменений позволяет определять хронологический возраст живых людей или останков уже умерших. Поиск пропавших без вести людей или при стихийных бедствиях и археологических раскопках предполагает применение методик для предсказания возраста индивида по уровню метилирования ДНК [3, 4].

Образцы буккального эпителия могут служить биологическим материалом для предсказания возраста индивида по уровню прижизненной химической модификации (метилованию) ДНК в CpG-сайтах [5-8]. Вместе с тем, эффективность применения данного подхода для определения возраста представителей населения регионов Союзного государства не установлена и может различаться в довольно широких пределах для различных народов или национальностей [9, 10].

Цель данной работы – оценить точность предсказания возраста человека с использованием математических моделей на основании результатов анализа метилирования CpG-динуклеотидов в образцах буккального эпителия индивидов из Республики Беларусь.

Материал и методы исследования

Материалом для исследования служили образцы буккального эпителия 466 индивидов (мужчины – 262, женщины – 204).

Отбор биологического материала осуществлен с использованием процедур, одобренных Комитетом по биоэтике при Институте генетики и цитологии НАН Беларуси. Средний возраст добровольцев составил $45,9 \pm 18,1$ лет (для мужчин – $46,7 \pm 18,1$ лет; для женщин – $44,8 \pm 18,2$ лет), диапазон – от 9 до 93 полных лет.

Забор буккального эпителия проводили на ватный тампон-зонд в трехкратной повторности. Тампон-зонды хранили при -20°C в течение 4-6 месяцев, для более длительного хранения использовали низкотемпературный фризер (-80°C). ДНК экстрагировали с использованием набора MagMAX™ DNA Multi-Sample Kit (ThermoFisher, США) в соответствии с инструкциями производителя. Выделенную ДНК количественно оценивали с использованием NanoPhotometer N50 (IMPLEN, США).

Образцы из GEO-проектов. Информация об уровне метилирования ДНК с использованием ИММ 450K BeadChip (Illumina) для образцов буккального эпителия представлена в открытом доступе на платформе NCBI GEO datasets (Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) для девяти проектов: GSE39560, GSE59505, GSE72120, GSE72556, GSE78874, GSE92767, GSE99029, GSE110128, GSE111223. Количество здоровых индивидов различного этногеографического происхождения составило 690 человек, с наличием в анамнезе заболеваний острого или хронического характера – 182 человека. Диапазон хронологического возраста включенных в анализ индивидов составил от 1 месяца (для новорожденных) до 91 года. Количество образцов буккального эпителия от мужчин составило 391, от женщин – 299.

Отбор CpG-динуклеотидов для анализа. Sae Rom Hong et al. предложили использовать тест-систему для определения возраста по образцам буккального эпителия, включающую 7 CpG-динуклеотидов – cg00481951 (ген SST, NCBI Gene ID – 280932), cg07547549 (SLC12A5, 57468), cg08928145 (TSSK6, 83983), cg12757011

(TBR1, 10716), cg14361627 (KLF14, 136259), cg18384097 (PTPN7, 5778), cg19671120 (CNGA3, 1261) [11].

Проведенный статистический анализ данных полногеномного профиля метилирования в рамках девяти GEO-проектов подтвердил высокий прогностический потенциал этих CpG-динуклеотидов для предсказания возраста по образцам буккального эпителия для различных этнорегиональных групп [12].

Таким образом, на основании проведенного анализа для практической проверки нами отобраны 7 CpG-динуклеотидов и для них определен профиль метилирования в 466 образцах буккального эпителия индивидов из Республики Беларусь.

Бисульфитное секвенирование с использованием SNaPshot. Праймеры и SBE-олигонуклеотиды для анализа CpG-динуклеотидов cg00481951, cg07547549, cg08928145, cg12757011, cg14361627, cg18384097 и cg19671120 представлены в таблице 1.

Бисульфитная конверсия ДНК проводилась для 200-500 нг с использованием MethylEdge® Bisulfite Conversion System Kit (Promega, США). В дальнейшем ПЦР проводили в объеме 20 мкл, содержащем 10-15 нг конвертированной ДНК, 1 ед. ArtStart DNA полимеразы (ArtBioTech, Беларусь), 2 мкл 10× буфера для ПЦР (в состав которого входил хлорид магний в концентрации 3,0 мМ), 200 нМ каждого дНТФ и 0,4-1,0 мкМ каждого праймера. Протокол амплификации на термоциклере ProFlex PCR System (ThermoFisher, США) включал следующие этапы: 95°C – 4 минуты, далее 34 цикла (94°C – 20 сек, 56°C – 30 сек, 72°C – 45 сек), финальная элонгация при 72°C в течение 7 минут. В дальнейшем 5 мкл амплификата очищали с использованием Exo-SIP™ Rapid PCR Cleanup Kit (NEB, США). Реакцию секвенирования (SBE, Single-base extension) проводили с использованием SNaPshot Kit (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя, каждая реакция включала также 3 мкл очищенного на предыдущей ста-

дии амплификата и 0,2-0,4 мкМ соответствующего SBE-олигонуклеотида. В дальнейшем 10 мкл амплификата очищали с использованием 1 ед. FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (ThermoFisher, США).

Электрофоретическая детекция продуктов реакции секвенирования проводилась с использованием генетического анализатора ABI PRISM 3500 и программного обеспечения GeneMapper® 5.0 (Applied Biosystems, США).

Процент метилирования (0-100%) для каждого CpG-динуклеотида рассчитывали согласно формуле: интенсивность флуоресцентного сигнала для G (метилированные, т.е. неконвертированные цитозины; согласно правилу комплементарности C-G) разделить на сумму флуоресцентных сигналов G и A (неметилированные, т.е. конвертированные в T цитозины; согласно правилу комплементарности T-A).

Статистический анализ данных. В ходе биоинформатического и статистического анализа были рассчитаны: коэффициенты корреляции R по Спирману (Spearman rank correlation coefficient); коэффициенты детерминации (R^2), а также скорректированные R^2 , равные доле дисперсии зависимой переменной «Возраст», обусловленной влиянием независимых переменных, представляющих собой уровень метилирования CpG-динуклеотидов; значения среднего абсолютного отклонения (Mean Absolute Deviation, MAD) от истинного возраста и среднеквадратическая ошибка модели (Root Mean Square Error, RMSE). Данные уровня метилирования CpG-динуклеотидов были нормализованы с использованием алгоритма Batch normalization (n=30). Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS v.20.0.

Результаты исследования

Коэффициенты корреляции R. Коэффициенты R для 7 CpG-динуклеотидов, рассчитанные по результатам молекулярно-генетического анализа 466 образцов буккального эпителия, представлены в таблице 2.

Таблица 1 – Информация о CpG-динуклеотидах, отобранных для молекулярно-генетического исследования

№№	CpG-динуклеотид	Ген	Хромосомная позиция*
1	cg00481951	<i>SST</i>	Chr.3:g.187669862
	F-праймер (5'>3'): AGGTGAGTTTTTATTTGGTATTTAAGAAA R-праймер (5'>3'): TTAAATTACCCCTTACCCSTAATC SBE-олигонуклеотид (5'>3'): (T)n-CCAAAATCAACACCAAAAATAAAC		
2	cg07547549	<i>SLC12A5</i>	Chr.20:g.46029586
	F-праймер (5'>3'): GGTTTAGTTAATTTAAGTTAGTT R-праймер (5'>3'): AAACSTCAACTCCATTTAAATACTCC SBE-олигонуклеотид (5'>3'): (T)n-CRAACRCTATCCAAAATACTAAAATAC		
3	cg08928145	<i>TSSK6</i>	Chr.19:g.19514555
	F-праймер (5'>3'): AGGGAAGYGGAAGGGAAAAAG R-праймер (5'>3'): ACTAAAAACCRATAATTCCAACCATTCCT SBE-олигонуклеотид (5'>3'): (T)n- CCAAAAACACTAAACCAAAAAC		
4	cg12757011	<i>TBR1</i>	Chr.2:g.161424600
	F-праймер (5'>3'): GGGTGGGTTTAGGTTTTAGAGTTA R-праймер (5'>3'): ATAAAATATCCTCCTACAATTCCC SBE-олигонуклеотид (5'>3'): (T)n-ACCTAAACAATCCTATCAAACAACAAC		
5	cg14361627	<i>KLF14</i>	Chr.7:g.130734355
	F-праймер (5'>3'): AGGTTGTTGTAATTTAGAAGTTT R-праймер (5'>3'): ATATTTAACAACCTCAAAAATTATCTTATC SBE-олигонуклеотид (5'>3'): (T)n-AACAACCTCAAAAATTATCTTATCTCC		
6	cg18384097	<i>PTPN7</i>	Chr.1:g.202160438
	F-праймер (5'>3'): TGTTTTAGTAAGTATTTGAAGGGG R-праймер (5'>3'): CATCAAATCTATAAACACCCATACC SBE-олигонуклеотид (5'>3'): (T)n-CATACCCCAACCAAAACACTATAAC		
7	cg19671120	<i>CNGA3</i>	Chr.2:g.98346511
	F-праймер (5'>3'): GGAGAGGGAGGTTATAGGTTTTTT R-праймер (5'>3'): TCCTTACCCTACCAAAATTTAAACTT SBE-олигонуклеотид (5'>3'): (T)n-CTACCAAAATTTAAACTTCTCC		

Примечание: *GRCh38.p13 (GCF_000001405.39).

Наибольшие расчетные значения R показаны для CpG-динуклеотидов cg07547549 (0,774), cg14361627 (0,762), cg00481951 (0,718), cg12757011 (0,621) и cg08928145 (0,606). Для шести CpG-динуклеотидов корреляция с возрастом была положительной, только для cg18384097 зависимость оказалась обратно пропорциональной. Именно для этого CpG-динуклеотида статистически значимая ассоциация с возрастом была наименее выраженной, а при рассмотрении только выборки из мужчин и вовсе нивелировалась. В биоинформатическом анализе данных GEO-проектов выявленный нами факт нашел подтверждение – ни для одной из групп: «Caucasian/European» (n=376, GSE110128, GSE111223, GSE72120, GSE78874, GSE39560, GSE78874), «Hispanic/Mexican» (n=236, GSE111223, GSE72556, GSE78874) или «Bantu/

European» (n=57, GSE99029), – не было показано статистически значимой ассоциации уровня метилирования cg18384097 и возраста [12]. Соответственно, этот CpG-динуклеотид оказался информативным только для индивидов из Южной Кореи [11]. Таким образом, данный маркер в дальнейшем моделировании не использовался.

Регрессионная модель предсказания возраста. При использовании множественной линейной регрессии (6 CpG-динуклеотидов) в качестве модели предсказания возраста по образцам буккального эпителия в общей группе индивидов (без разделения по полу) значение MAD составило 4,6 года (RMSE – 3,4 года). Полученные нами результаты сопоставимы с аналогичными исследованиями [4-8]. Скорректированный процент объясненной дисперсии R² составил не менее 83,6%. По

Таблица 2 – Коэффициенты корреляции (R) с возрастом для 7 CpG-динуклеотидов

Группа	R (95% ДИ), р-уровень	CpG-динуклеотид			
		cg00481951 (SST)	cg07547549 (SLC12A5)	cg08928145 (TSSK6)	cg12757011 (TBR1)
Все участники (n=466)	НГ 95%	0,669	0,731	0,541	0,561
	R	0,718	0,774	0,606	0,621
	ВГ 95%	0,761	0,812	0,662	0,676
	р-уровень	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Мужчины (n=262)	НГ 95%	0,654	0,714	0,467	0,551
	R	0,722	0,770	0,555	0,633
	ВГ 95%	0,779	0,819	0,634	0,702
	р-уровень	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Женщины (n=204)	НГ 95%	0,638	0,710	0,579	0,519
	R	0,717	0,780	0,671	0,613
	ВГ 95%	0,778	0,833	0,743	0,687
	р-уровень	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Группа	R (95% ДИ), р-уровень	CpG-динуклеотид			
		cg14361627 (KLF14)	cg18384097 (PTPN7)	cg19671120 (CNGA3)	
Все участники (n=466)	НГ 95%	0,716	-0,233	0,154	
	R	0,762	-0,143	0,234	
	ВГ 95%	0,799	-0,059	0,318	
	р-уровень	<0,001	0,0020	<0,001	
Мужчины (n=262)	НГ 95%	0,694	-0,230	0,139	
	R	0,753	-0,112	0,254	
	ВГ 95%	0,796	-0,001	0,359	
	р-уровень	<0,001	0,0709	<0,001	
Женщины (n=204)	НГ 95%	0,700	-0,310	0,080	
	R	0,770	-0,184	0,210	
	ВГ 95%	0,826	-0,058	0,328	
	р-уровень	<0,001	0,009	0,003	

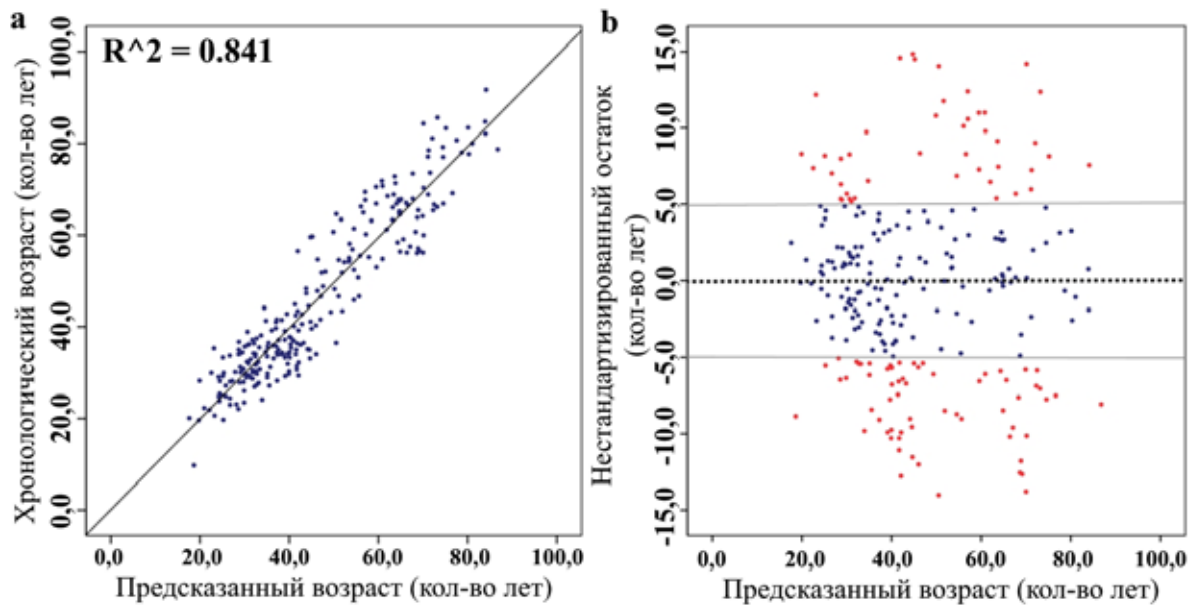
Примечание: НГ 95% – нижняя граница 95% доверительного интервала; ВГ 95% – верхняя граница 95% доверительного интервала

влиянию на изменение коэффициента детерминации (R^2) CpG-динуклеотиды расположились в следующей последовательности: cg07547549 (62,8%), cg14361627 (11,6% к предыдущему значению), cg00481951 (4,9%), cg08928145 (2,1%), совокупный вклад остальных маркеров составил не более 2,2%. Возраст с точностью до 3 лет корректно предсказан для 33,9% индивидов, с точностью до 5 лет – для 54,1%, с точностью до 7 лет – для 70,5%, для 29,5% ошибка предсказания возраста составила более 7 лет.

При создании модели предсказания возраста по образцам буккального эпителия в группе мужчин значение MAD составило 4,5 года (RMSE – 3,4 года), рисунок 1. Скорректированный процент объясненной

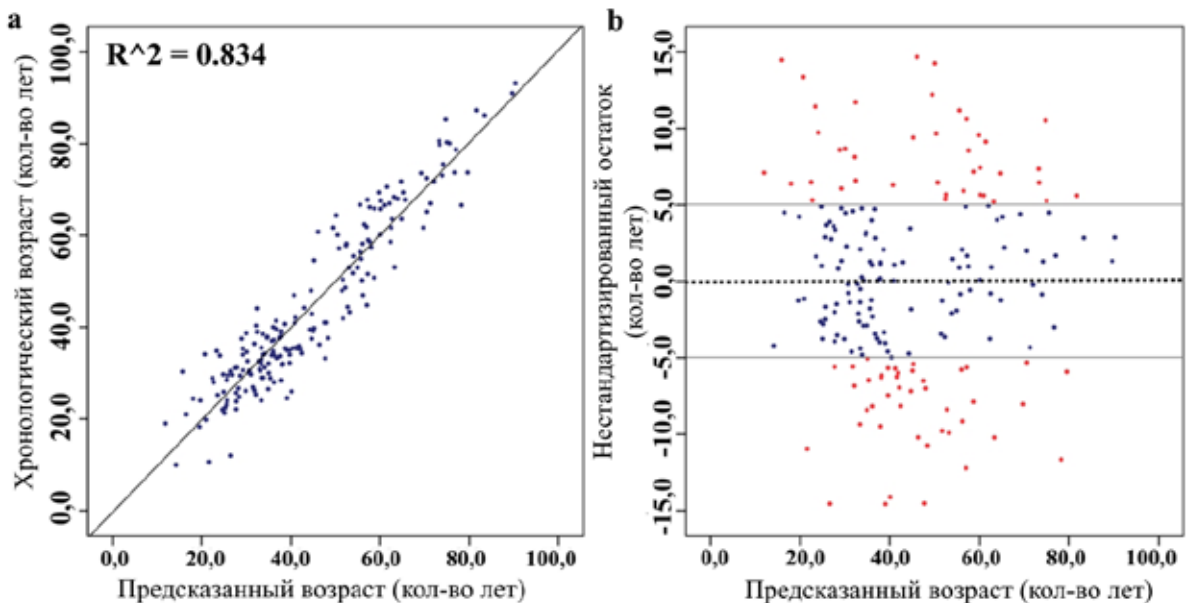
дисперсии R^2 составил не менее 84,1%. По влиянию на изменение коэффициента детерминации (R^2) CpG-динуклеотиды расположились в следующей последовательности: cg07547549 (61,5%), cg14361627 (12,4% к предыдущему значению), cg00481951 (5,1%), cg08928145 (2,3%), совокупный вклад остальных маркеров составил не более 2,4%. Возраст с точностью до 3 лет корректно предсказан для 36,6% индивидов, с точностью до 5 лет – для 53,8%, с точностью до 7 лет – для 69,8%, для 30,2% ошибка предсказания возраста составила более 7 лет.

При создании модели предсказания возраста по образцам буккального эпителия в группе женщин значение MAD составило 4,7 года (RMSE – 3,5 года), рисунок 2. Скор-



а) точность; б) график нестандартизованных остатков

Рисунок 1 – Предсказание возраста для мужчин по образцам буккального эпителия с использованием 6 CpG-динуклеотидов



а) точность; б) график нестандартизованных остатков

Рисунок 2 – Предсказание возраста для женщин по образцам буккального эпителия с использованием 6 CpG-динуклеотидов

ректированный процент объясненной дисперсии R^2 составил не менее 83,4%. По влиянию на изменение коэффициента детерминации CpG-динуклеотиды расположились в следующей последовательности: cg07547549 (64,6%), cg14361627 (10,1% к предыдущему значению), cg00481951 (4,7%), cg08928145 (2,4%), совокупный

вклад остальных маркеров составил не более 1,7%. Возраст с точностью до 3 лет корректно предсказан для 32,8% индивидов, с точностью до 5 лет – для 53,9%, с точностью до 7 лет – для 71,1%, для 28,9% ошибка предсказания возраста составила более 7 лет.

Таким образом, лучшая точность предсказания возраста индивида (без указания

половой принадлежности) по образцам буккального эпителия составила не более 4,5 года при анализе 6 CpG-динуклеотидов. При высоких значениях скорректированного процента объясненной дисперсии R^2 (>80%) точность предсказания возраста на уровне 4-5 лет и более может быть обусловлена спецификой такого биологического материала, как буккальный эпителий: высокая скорость обновления клеточного пула, различия в уровне метилирования ДНК в различных клеточных пулах, значительное влияние на клеточные пулы условий (сухость, кариес, избыточное слюноотделение, и т.д.) в ротовой полости индивида и прочее. Все эти факторы в совокупности влияют на точность предсказания хронологического возраста.

Вероятность отнесения образца к возрастной группе. Известно, что показатели R^2 , MAD и RMSE отражают общую точность модели и позволяют сравнивать модели между собой. Для характеристики точности предсказания зависимой переменной «Возраст» для конкретного образца, на наш взгляд, целесообразно рассчитывать также вероятность отнесения образца к возрастной группе, например, «≤40 лет», «>40 и ≤60 лет» и «>60 лет».

На рисунке 3 представлена информация о количестве индивидов (без разделения по полу), выраженном в процентах в пределах трех возрастных групп, для которых с использованием регрессионной модели из 6 CpG-динуклеотидов были предсказаны значения возраста в пределах ошибки «≤3 лет», «>3 и ≤5 лет», «>5 и ≤7 лет» и «>7 лет».

Наибольший процент корректных расчетов (ошибка предсказания менее 3 лет) приходится на возрастной диапазон «≤ 40 лет», что связано, в первую очередь, с возрастной структурой анализируемой нами выборки: данная группа наиболее многочисленная – 51,9% от всего объема выборки. Также из рисунка 3 следует, что в группах «≤ 40 лет» «> 60 лет» ошибка предсказания возраста более 7 лет составляет 41,1% и 39,7%. Такая тенденция может

быть обусловлена возрастанием дисперсии для уровня метилирования анализируемых CpG-динуклеотидов с возрастом, что может быть связано с широким диапазоном нормы при физиологических процессах развития и старения организма.

Для криминалистов в судебной практике при выяснении предположительного возраста неизвестного индивида может быть важна информация не только о конкретном возрасте, но и об отнесении данного субъекта к определенной возрастной группе, например: «моложе 40 лет» или «старше 40 лет» и т.п. Точность отнесения неизвестного индивида к конкретной группе по результатам анализа метилирования CpG-динуклеотидов будет выше, чем при ответе на вопрос о приближенном к истинному значению хронологического возраста, т.к. количество групп в анализе с использованием, например, логистической регрессии, будет составлять в большинстве случаев не более двух. Например, при разбиении всего массива образцов на две категории (без разделения по полу): «моложе 40 лет» или «старше 40 лет», – и использовании логистической регрессии на основании 6 CpG-динуклеотидов cg00481951, cg07547549, cg08928145, cg12757011, cg14361627 и cg19671120, в среднем по модели с вероятностью 93,8% имеется возможность сделать заключение, что возраст неизвестного индивида составляет меньше 40 лет, с вероятностью 89,8% – больше 40 лет.

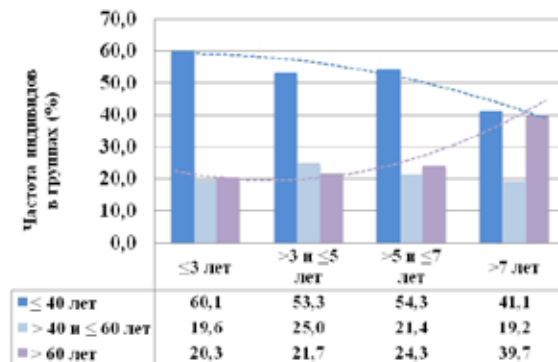


Рисунок 3 – Процент индивидов с корректно предсказанным возрастом в пределах заданных интервалов ошибки для трех возрастных групп

Для уточнения предсказанного возраста может быть использована двухэтапная схема: первоначальное отнесение образца неизвестного индивида к определенной возрастной группе, и на втором этапе – предсказание значения возраста в годах (с уровнем точности в пределах предсказательной модели) уже в пределах возрастной группы.

Заключение

На основании данных, представленных в открытом доступе на платформе GEO NCBI для проектов по определению полногеномного профиля метилирования ДНК, нами определены CpG-динуклеотиды с высокими значениями линейной зависимости между уровнем метилирования и хронологическим возрастом. Для молекулярно-генетического анализа были отобраны семь CpG-динуклеотидов с высоким прогностическим потенциалом для создания модели предсказания возраста человека по образцам буккального эпителия.

Для данных CpG-динуклеотидов определен уровень метилирования в образцах буккального эпителия 466 индивидов из Республики Беларусь, рассчитаны коэффициенты корреляции R с возрастом. С использованием множественной линейной регрессии создана модель для предсказания возраста, основанная на анализе шести CpG-динуклеотидов. Средняя ошибка предсказания возраста составила 4,6 года. Точность предложенной нами модели соответствует мировому уровню.

Предложенная нами модель предсказания возраста на основании профиля метилирования CpG-динуклеотидов по образцам буккального эпителия отличается относительной простотой, т.к. в анализе используется всего шесть маркеров, и, таким образом, она может быть задействована в криминалистических лабораториях молекулярно-генетической направленности.

Работа выполнена в рамках мероприятия 2 «Разработка методики определения вероятного возраста индивида по характеристике его ДНК» научно-технической программы Союзного государства «Разработка инновацион-

ных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства» (ДНК-идентификация).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Библиографический список

1. Assessment of DNA Damage by Comet Assay in Buccal Epithelial / J. Sanchez-Alarcon J. [et al.] // Cells: Problems, Achievement, Perspectives, Environmental Health Risk. – 2016. – P. 77-135. DOI:10.5772/61472
2. Генетика – судебной экспертизе Беларуси / А. Кильчевский [и др.] // Наука и инновации. – 2020. – № 10(212). – С. 22-28.
3. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers / B. Bekaert [et al.] // Epigenetics. – 2015. – Vol. 10(10). – P. 922-930. DOI: 10.1080/15592294.2015.1080413
4. Postmortem age estimation via DNA methylation analysis in buccal swabs from corpses in different stages of decomposition-a «proof of principle» study / B.E. Koop [et al.] // International Journal of Legal Medicine. – 2021. – Vol. 135(1). – P. 167-173. DOI: 10.1007/s00414-020-02360-7
5. Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific DNA methylation signatures / M. Eipel [et al.] // Aging (Albany NY). – 2016. – Vol. 8(5). – P. 1034-1048. DOI: 10.18632/aging.100972
6. The PedBE clock accurately estimates DNA methylation age in pediatric buccal cells / L.M. McEwen [et al.] // PNAS. – 2020. – Vol. 22;117(38). – P. 23329-23335. DOI: 10.1073/pnas.1820843116
7. Genome-wide analysis of DNA methylation in buccal cells: a study of monozygotic twins and mQTLs / J. Dongen [et al.] // Epigenetics Chromatin. – 2018. – Vol. 25, 11(1). – P. e1-e14. DOI: 10.1186/s13072-018-0225-x
8. Development of the VISAGE enhanced tool and statistical models for epigenetic age estimation in blood, buccal cells and bones / A. Wozniak [et al.] // Aging (Albany NY). – 2021. – Vol.15;13(5). – P. 6459-6484. DOI: 10.18632/aging.202783

9. Impact of genetic ancestry on chronological age prediction using DNA methylation analysis / J. Fleckhaus [et al.] // *Forensic Science International: Genetics. Supplement Series.* – 2017. – Vol.6. – P. e399-e400. DOI: 10.1016/j.fsigss.2017.09.162

10. Sperm epigenetics and influence of environmental factors / I. Donkin, R. Barres // *Molecular Metabolism.* – 2018. – Vol.14. – P. e1-e11. DOI: 10.1016/j.molmet.2018.02.006

11. DNA methylation-based age prediction from saliva: High age predictability by combination of 7 CpG markers / S. R. Hong [et al.] // *Forensic Science International: Genetics.* – 2017. – Vol.29. – P. 118-125. DOI: 10.1016/j.fsigen.2017.04.006

12. Предсказательный потенциал CpG-маркеров для определения хронологического возраста человека / В.Н. Кипень [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика.* – 2020. – №.28. – С. 70-80.

V.A. Lemesh, V.N. Kipen, M.V. Bahdanava, A.A. Burakova, A.G. Bulgak, A.V. Bayda, O.V. Zotova, M.A. Kruglikova, O.I. Dobysh, V.I. Sakovich

DNA METHYLATION IN HUMAN BUCCAL EPITHELIUM SAMPLES IN DETERMINING AGE

Based on bioinformatics and statistical analysis of GEO-projects to determine the genome-wide profile of human DNA methylation, a list of CpG dinucleotides with high predictive potential was formed to create models for predicting human age from buccal epithelium samples. The methylation level was determined for 466 samples of individuals from the Republic of Belarus. The correlation coefficients R were calculated, and mathematical models for determining the age of individual were constructed. The average value of the accuracy of age prediction from buccal epithelium samples using 6 CpG-dinucleotides was 4,6 years. The results obtained will be used as a basis for the development of calculators for predicting the age of an individual based on traces of biological character for forensic experts.

Key words: *forensic, age determination, buccal epithelium, DNA methylation, human methylation 450k BeadChip*

Поступила 09.06.21