

# ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЧАСЫ: МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК КАК МАРКЕР БИОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА И ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2025 г. И. С. КИСЕЛЕВ<sup>1,2,\*</sup>, Н. М. БАУЛИНА<sup>1,2</sup>, О. О. ФАВОРОВА<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е. И. Чазова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва,

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

I. Введение. II. Эпигенетический механизм метилирования ДНК. III. Связь метилирования ДНК со старением: эпигенетические часы. IV. Эпигенетические часы первого поколения. V. Эпигенетические часы второго поколения. VI. Заболевания, ассоциированные с изменением эпигенетического возраста. VII. Новые направления исследований эпигенетического возраста. VIII. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Хронологический (календарный) возраст человека является одним из ключевых критериев его здоровья, которые используются в практической медицине для прогнозирования вероятности развития различных заболеваний и тяжести их течения, для оценки круга неблагоприятных этиологических факторов, приводящих к их развитию, а также для выбора тактики лечения. Однако, биологический возраст, отражающий индивидуальное состояние организма, функциональные возможности человека, его социальное благополучие и риск преждевременной смерти от различных причин, часто не совпадает с календарным, что свидетельствует о вариабельности скорости старения (rate of aging) [1].

Показано, что многие социально-демографические факторы прямо или опосредованно связаны с продолжительностью жизни, а, значит, и со скоростью старения. Такие факторы разделяют на 12 взаимосвязанных категорий [2]: (1) благополучность окружения; (2) богатство социальных связей или изоляция; (3) подверженность насилию; (4) диета и режим питания; (5) употребление и воздействие табака, (6) злоупотребление алкоголем; (7) физическая активность, (8) уровень грамотности в вопросах здоровья; (9) наличие стресса и негативное настроение (в том числе депрессия и тревога); (10) страна происхождения; (11) качество образования; (12) занятость и финансовое благополучие.

---

*Список сокращений:* ЭЧ – эпигенетические часы; IEAA – внутреннее ускорение эпигенетического старения (intrinsic epigenetic age acceleration); EEAA – внешнее ускорение эпигенетического старения (extrinsic epigenetic age acceleration).

---

\*Адрес для корреспонденции: e-mail – kiselev.ivan.1991@gmail.com

Замедлению старения могут способствовать пересмотр диеты [3, 4], отказ от курения [5], улучшение качества сна [6], физические упражнения [7, 8] и другие факторы, связанные с нормализацией образа жизни.

На молекулярном, клеточном и системном уровнях вычлняют три типа процессов, ассоциированных со старением и потенциально способных служить маркерами биологического возраста: основные, антагонистические и интегративные [9]. К основным процессам относят нестабильность генома, укорочение теломер, эпигенетические изменения, нарушения протеостаза и макроаутофагии; они отражают повреждения, прогрессивно накапливающиеся в клетке с течением времени. Так называемые антагонистические процессы – нарушение чувствительности к нутриентам, митохондриальная дисфункция и клеточное старение (сенесценция) – могут оказывать как позитивные, так и негативные эффекты в зависимости от своей выраженности и/или этапа онтогенеза. Наконец, интегративные процессы, такие как истощение пула стволовых клеток, нарушение межклеточной коммуникации, хроническое воспаление и дисбиоз, являются системным следствием изменений, происходящих в организме под действием процессов первых двух типов.

Метилирование ДНК – один из универсальных эпигенетических механизмов, который относится к числу основных ассоциированных с биологическим возрастом процессов. Он способен модулировать экспрессию генов в конкретной ткани в ответ на множество различных воздействий, начиная от смены пищевых предпочтений человека и заканчивая развитием заболеваний [3]. Изучение профилей метилирования ДНК широко используется в фундаментальной медицине как высоко информативный метод оценки состояния организма в норме и при патологии. Полученные данные позволяют разрабатывать компактные ткань- и/или болезнь-специфические диагностические и прогностические панели, которые можно применять в клинической практике. Собранный за десятилетия исследований массив данных об изменениях уровней метилирования отдельных сайтов генома с возрастом позволил сформировать из таких сайтов удобные композитные маркеры для оценки биологического возраста и индивидуальной скорости старения, которые получили название «эпигенетических часов» (ЭЧ). Настоящий обзор посвящен связи метилирования ДНК со старением и основным типам разработанных к настоящему времени ЭЧ. Описаны результаты исследований, изучающих индивидуальную скорость старения при распространенных возраст-ассоциированных заболеваниях, и очерчен круг основных направлений, развитие которых может расширить применение ЭЧ в фундаментальной науке и практической медицине.

## II. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Метилирование ДНК – реакция присоединения метильной группы к остатку азотистого основания, в качестве которого чаще всего выступает цитозин в составе CpG-динуклеотида. В последнее время внимание исследователей привлекает также метилирование аденина и связанные с этой реакцией потенциальные регуляторные механизмы, но пока эта область остается мало изученной [10].

Метилирование цитозина осуществляют ДНК-метилтрансферазы; у человека DNMT1 метилирует дочернюю цепь ДНК после репликации по матрице метилированной материнской цепи, а DNMT3a, DNMT3b и DNMT3L в основном участвуют в метилировании ДНК *de novo* [11]. В качестве донора метильных групп при этом выступает S-аденозилметионин. Образование 5-метилцитозина в ходе реакции метилиро-

вания не препятствует распознаванию азотистого основания ферментами, участвующими в процессах репликации и транскрипции, но привлекает специфические белки, содержащие метил-связывающие домены; эти белки могут влиять на уровень экспрессии близлежащих генов по различным механизмам [12]. Природа сформированной ковалентной химической связи в 5-метилцитозине определяет ее стабильность и длительность оказываемых ей регуляторных воздействий. Деметилирование 5-метилцитозина может происходить как в ходе активного процесса с участием метилцитозин-диоксигеназ TET 1, 2 и 3, так и спонтанно. Образующиеся в ходе этого процесса промежуточные соединения, 5-гидроксиметилцитозин, 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин, не распознаются DNMT1 в ходе репликации и в конечном итоге элиминируются по механизму эксцизионной репарации оснований [13].

В соматических клетках человека доля 5-метилцитозина составляет около 1% от общего числа оснований ДНК, и метилированными оказываются 70-80% всех CpG-сайтов [14]. При этом CpG-сайты, подвергающиеся метилированию, распределены в геноме неравномерно и могут образовывать скопления, называемые CpG-островками. Согласно классическому определению [15], CpG-островки – это участки ДНК протяженностью от 200 п.н. и более, содержащие в своей последовательности более 50% нуклеотидов G и C и характеризующиеся соотношением между реальным количеством CpG-сайтов и ожидаемым при равномерном их распределении по геному более 0.6. Более половины известных промоторов генов человека и других позвоночных содержат CpG-островки, а островки в межгенных областях часто оказываются ассоциированными с дистальными регуляторными элементами, такими как энхансеры и сайленсеры [16, 17]. Неудивительно, что CpG-островки в норме обычно характеризуются низким уровнем метилирования и формируют области открытого хроматина, в то время как CpG-сайты, расположенные за пределами островков, наоборот, чаще всего гиперметилированы [17]. Вследствие этого наиболее заметными изменениями в профиле метилирования ДНК, сопровождающими различные патологические состояния, являются гиперметилирование CpG-островков и гипометилирование отдельно расположенных CpG-сайтов [18].

### **III. СВЯЗЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК СО СТАРЕНИЕМ: ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЧАСЫ**

К настоящему времени накоплено большое количество данных, указывающих на изменение с возрастом уровней метилирования ДНК (эпигенетический дрейф) у позвоночных. Первые результаты подобного рода были получены при исследовании лососевых рыб еще в 60-х годах XX века [19] и далее неоднократно подтверждались для различных клеток и тканей разных модельных организмов [20]. На протяжении долгого времени доминировало представление о снижении среднего уровня метилирования ДНК по мере старения, однако повсеместное распространение высокопроизводительных методов анализа генома (в том числе на уровне единичных клеток) показало, что во многих тканях такие изменения носят локальный характер и могут быть разнонаправленными [21]. Возраст-ассоциированному гиперметилированию чаще всего подвергаются CpG-богатые промоторы генов, регулируемых белками семейства polycomb. Предполагается, что polycomb-содержащие репрессорные комплексы защищают ДНК от воздействия DNMT по конкурентному механизму, и их деградация по мере старения способствует повышению метилирования ДНК [22]. Возраст-ассоциированное гипометилирование носит выраженный тканеспецифический характер и обычно наблюдается за пределами

СрG-островков, часто в области регуляторных элементов, удаленных от точек инициации транскрипции [18]. Показана корреляция паттернов метилирования, ассоциированных с возрастом, с активностью mTOR, которая может изменяться под действием химических агентов и гормонов [23, 24], а также при умеренном голодании [25], гипоксии [26] и нарушении регуляции циркадных ритмов [27]. В то же время, сигнальные каскады, связанные с регуляцией длины теломер, ответом на повреждения ДНК, клеточным старением, пролиферацией, терминальной дифференцировкой клеток и другими процессами, традиционно связываемыми со старением, судя по всему, не влияют на возраст-ассоциированные паттерны дифференциального метилирования [23, 28]. Более подробно упомянутые механизмы описаны в [29].

В последнее время предпринимается все больше попыток установить основные механизмы, приводящие к наблюдаемым изменениям метилирования ДНК по мере старения, однако знания в этой области пока довольно ограничены. Тем не менее, собранные в ходе таких исследований данные позволили сформировать концепцию «эпигенетического возраста» как интегрального показателя, суммирующего информацию о возраст-ассоциированных изменениях уровней метилирования отдельных СрG-сайтов генома и выступающего в качестве суррогата биологического возраста. Первая панель, использующая набор СрG-сайтов генома для определения эпигенетического возраста и позже названная ЭЧ, была предложена в 2011 году [30], а в 2013 году описаны сразу два наиболее известных и широко применяемых варианта: часы Хорвата (Horvath) [31] и часы Ханнума (Hannum) [32]. На сегодняшний день разработано несколько десятков ЭЧ человека, включающих от одного до сотен тысяч СрG-сайтов и используемых для решения разных задач. Принято выделять ЭЧ первого поколения, сформированные только на основании данных о связи метилирования ДНК с хронологическим возрастом, и ЭЧ второго поколения, разработанные для определения индивидуальной скорости старения с учетом отдельных клинико-демографических характеристик и возраст-ассоциированных маркеров [1]. Иногда говорят еще об ЭЧ третьего поколения, но разные исследователи понимают эту пока неустоявшуюся категорию по-разному, поэтому мы не будем выделять ее из числа двух других.

Для систематизации имеющихся данных нами проведен поиск опубликованных работ, предлагающих различные варианты ЭЧ. Предшествующий анализ литературы такой направленности предпринимался в 2021 году и позволил обнаружить 34 работы [33]. Нами найдено 49 исследований, которые будут описаны далее.

#### IV. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЧАСЫ ПЕРВОГО ПОКОЛЕНИЯ

ЭЧ первого поколения представляют собой панели СрG-сайтов генома, уровни метилирования которых коррелируют с хронологическим возрастом. Чаще всего для их создания используют информацию о календарном возрасте здоровых индивидов, подвергнутых анализу метилирования ДНК. Далее разработанные ЭЧ можно использовать как для определения примерного возраста конкретного индивида, если он неизвестен (например, в криминалистике), так и для выявления отклонений эпигенетического возраста от хронологического. Краткое описание таких ЭЧ, предложенных в 40 найденных нами работах, представлено в таблице 1 (в порядке возрастания количества анализируемых СрG-сайтов). Еще в двух работах описаны ЭЧ для определения гестационного возраста плода по уровням метилирования ДНК из пуповинной крови [34, 35]. Они решают специфическую задачу, важную в первую очередь для педиатрии, поэтому в рамках настоящего обзора мы отдельно не будем на них останавливаться.

Мы условно разделили ЭЧ первого поколения, представленные в таблице 1, на две категории в зависимости от числа возраст-ассоциированных CpG-сайтов, входящих в их состав: (1) «малые» ЭЧ, предполагающие определение уровней метилирования менее 20 CpG-сайтов, и (2) «большие» ЭЧ, включающие более 70 CpG-сайтов. Диапазон количества CpG-сайтов в больших ЭЧ очень велик, вплоть до 123930 сайтов в работе [72]. Если в работе предлагалось несколько вариантов ЭЧ, различающихся по числу включенных CpG-сайтов, мы вносили в таблицу ЭЧ с меньшим количеством CpG-сайтов как наиболее привлекательные для практического применения.

Уже упоминавшиеся два наиболее известных варианта ЭЧ – часы Хорвата и Ханнума – относятся к большим ЭЧ. Последние как правило позволяют определять биологический возраст с высокой точностью и потому активно используются в фундаментальных исследованиях. Больше половины «больших» ЭЧ, разработанных на сегодняшний день, предназначены для исследования ДНК из цельной крови. Исключение составляют ЭЧ для анализа буккального соскоба [59], моноцитов [62] и коры головного мозга [66]. В двух работах предложены ЭЧ, которые можно использовать для исследования как крови, так и клеток кожи [67, 68]. Часы Хорвата были разработаны на основании анализа данных метилирования CpG-сайтов в клетках и тканях 51-го типа и потому, с одной стороны, являются достаточно универсальными, а с другой – имеют относительно невысокую для 353 анализируемых CpG-сайтов точность предсказания: коэффициент корреляции с возрастом  $r \leq 0.96$ , в то время как у ЭЧ, адаптированных для конкретного биоматериала,  $r$  может достигать 0.99 [68]. Часы AltumAge разработаны недавно с помощью нейросетей и, как и часы Хорвата, могут быть применимы для различных органов и тканей [71]. Они значительно превосходят последние, особенно при определении патологического ускорения старения клеток. Однако AltumAge включают 20318 CpG-сайтов, и для их использования анализ метилирования ДНК необходимо проводить исключительно с помощью ДНК-микрочипов высокой плотности.

Особое положение занимают представленные недавно ЭЧ [65], которые были разработаны с использованием геномных данных для различных тканей 185 видов животных и потому могут рассматриваться как универсальные для различных видов млекопитающих. Следует отметить, что авторами было предложено три возможных набора CpG-сайтов, и наименьший из них, указанный в таблице 1 (336 CpG-сайтов), характеризовался значением  $r$ , не превышающим 0.84. Второй и третий наборы, включающие 761 и 817 CpG-сайтов, соответственно, позволили достичь значения  $r \geq 0.95$ .

Многолетние эпигеномные исследования показали, что скорость накопления изменений в профиле метилирования ДНК относительно высока в детстве и замедляется после пубертантного периода [73]. Поэтому ЭЧ, созданные с использованием выборок взрослых индивидов, характеризуются низкой точностью при определении эпигенетического возраста у детей и подростков. Для решения этой проблемы было предложено несколько вариантов ЭЧ, обладающих максимальной эффективностью в возрастных группах до 18 лет [58–60] и от 12 до 25 лет [64].

Использование больших ЭЧ, включающих до сотен тысяч CpG-сайтов [72], требует применения трудоемких и дорогостоящих методических подходов, таких как высокопроизводительное секвенирование ДНК или анализ на ДНК-микрочипах высокой плотности. Кроме того, интерпретация полученных результатов зачастую связана со сложным математическим анализом, т.к. в состав таких ЭЧ включаются, наряду с другими, CpG-сайты, уровни метилирования которых слабо коррелируют с возрастом, а сами корреляции могут быть разнонаправленными и часто нелинейными. В связи с

**Таблица 1.** Эпигенетические часы первого поколения, построенные на основании корреляции уровней метилирования ДНК с хронологическим возрастом человека.

Число анализируемых CpG-сайтов	Биоматериал для анализа	Параметры выборки, использованной для разработки		Год, библиографическая ссылка (предложенное название)
		Число индивидов	Возрастной диапазон	
1	2	3	4	5
«Малые» эпигенетические часы				
1	Цельная кровь	64	9–99	2012 [36]
2	Цельная кровь	300	2–75	2015 [37]
2	Цельная кровь	100	18–60	2021 [38]
3	Цельная кровь	575	45–75	2014 [39]
3	Цельная кровь	196	0–88	2021 [40]
4	Цельная кровь	206	0–91	2015 [41]
5	Т-лимфоциты, моноциты, кожа, эпителий шейки матки	130	0–78	2011 [30]
5	Цельная кровь	53	1–93	2020 [42]
5	Цельная кровь	160	0–93	2021 [43]
5	Цельная кровь	656	19–101	2022 [44]
5	Цельная кровь	56	1–94	2022 [45]
6	Цельная кровь	16	27–54	2015 [46]
6	Цельная кровь	1322	0–103	2018 [47]
7	Цельная кровь	180	2–18	2016 [48]
7	Цельная кровь	278	0–112	2022 [49]
8	Цельная кровь	390	20–70	2016 [50]
8	Цельная кровь	216	4–82	2016 [51]
9	Цельная кровь	973	1–101	2020 [52]
13	Цельная кровь	208	18–69	2017 [53]
14	Цельная кровь и ушки предсердий	288	40–82	2023 [54]
16	Цельная кровь	1156	2–90	2017 [55]
17	Цельная кровь	965	50–75	2014 [56]
19	Ткани зуба	21	17–77	2016 [57]
«Большие» эпигенетические часы				
71	Цельная кровь	482	19–101	2013 [32] (часы Ханнума, DNAmHannum)
83	Цельная кровь	90	6–17	2018 [58]
94	Буккальный соскоб	1032	0–20	2020 [59] (PedBE)
111	Цельная кровь	716	0–18	2019 [60]
111	Цельная кровь	1191	19–97	2021 [61]
186	Моноциты	1202	44–83	2022 [62] (MonoDNAmAge)
239	Цельная кровь	539	18–81	2018 [63]

1	2	3	4	5
267	Цельная кровь	2315	12–25	2023 [64]
336	59 типов клеток и тканей от 185 видов животных *	–	–	2023 [65] (Pan-mammalian clocks)
347	Кора головного мозга	1397	1–108	2020 [66] (The cortical clocks)
353	51 тип клеток и тканей	3931	0–100	2013 [31] (часы Хорвата, DNAmHorvath)
391	Цельная кровь, лимфоциты, фибробласты, кожа, букальный эпителий и слюна, эндотелий	278	19–82	2018 [67] (The skin and blood clock)
514	Цельная кровь и слюна	13566	9–75	2019 [68]
1000	Цельная кровь	4930	0–103	2021 [69] (DeepMAge)
1791	Цельная кровь	2227	19–66	2020 [70] (eABEC)
20318	142 публично доступных набора данных метилирования из более 50 типов клеток и тканей	8050	0–110	2022 [71] (AltumAge)
123930	Цельная кровь	4409	10–101	2021 [72]

\* В отличие от остальных представленных в таблице, эти эпигенетические часы разработаны с использованием геномных данных животных разных видов и потому универсальны по крайней мере для млекопитающих.

этим, большие ЭЧ сложно рассматривать в качестве практически значимых предикторов биологического возраста. На эту роль куда больше подходят малые ЭЧ, включающие ограниченное число CpG-сайтов, уровни метилирования которых могут быть относительно быстро и недорого измерены при помощи масс-спектрометрии, пиросеквенирования или метил-специфической ПЦР.

Малые ЭЧ, как и большие, чаще всего создаются для исследования периферической крови (20 из 23 работ). В работе [30] отбирали CpG-сайты, универсальные для нескольких различных типов тканей (несколько популяций лейкоцитов, клетки кожи и эпителий шейки матки), и только в двух работах предложены варианты ЭЧ для специфических органов и тканей [54,57]. Часы [57] пригодны для изучения зубов и разрабатывались как один из инструментов археологии и судебной медицины. Часы [54], созданные для изучения биоптатов ткани сердца, могут найти свое применение в кардиологии для профилактики, диагностики и прогнозирования исходов сердечно-сосудистых заболеваний как самых распространенных и опасных возраст-ассоциированных заболеваний, ответственных за наибольшее число смертей по всему миру [74].

Очевидно, что при разработке малых ЭЧ стараются отбирать только локусы генома, уровни метилирования которых наиболее прямо и сильно коррелируют с возрастом. Определение набора наиболее часто используемых локусов может помочь при создании новых ЭЧ или оптимизации уже существующих их вариантов. С целью выявления таких локусов мы проанализировали данные всех работ, в которых описаны малые ЭЧ (см. табл. 1). CpG-сайты в области 15 генов были использованы в двух и более работах (рис. 1).

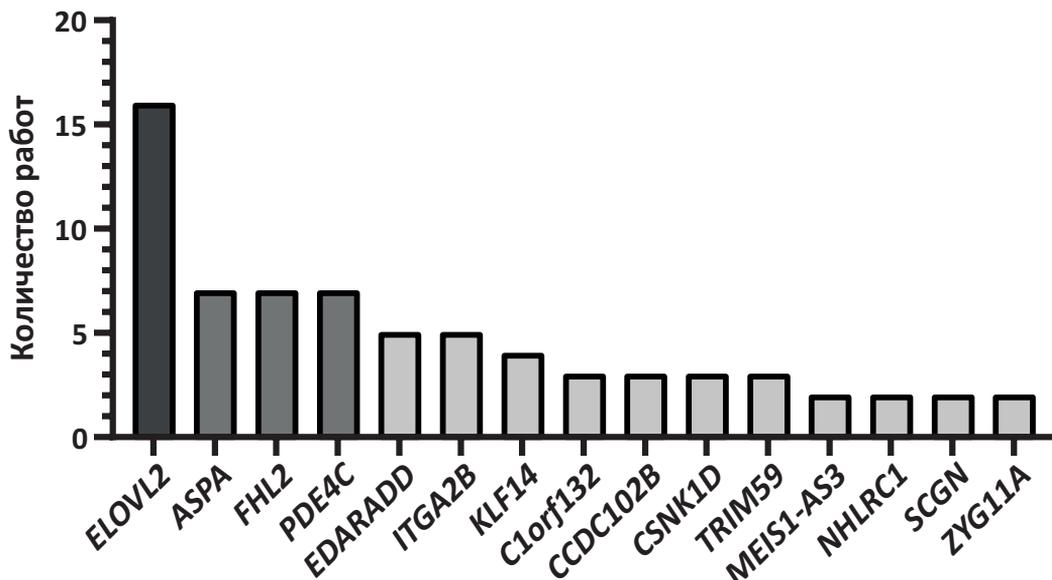


Рис. 1. Гены, дифференциально метилированные сайты в области которых включены в состав малых (содержащих менее 20 CpG-сайтов) эпигенетических часов.

Абсолютным лидером по числу упоминаний является ген *ELOVL2*. CpG-сайты из CpG-островка в его промоторной области использовали для определения биологического возраста в 16 работах, причем в четырех из них [36–38, 45] это был единственный локус, включенный в панель. *ELOVL2* кодирует один из ферментов, катализирующих удлинение полиненасыщенных жирных кислот. Корреляция уровня метилирования этого гена с возрастом была показана одной из первых, в 2012 году [36], и не является тканеспецифической [75], а потому включение *ELOVL2* в большинство работ неудивительно.

CpG-сайты в области еще трех генов были включены в состав малых ЭЧ в семи работах. Изменение уровня метилирования одного из них, *FHL2*, было впервые показано в уже цитированном исследовании 2012 года [36], а *ASPA* и *PDE4C* – двумя годами позже [39]. CpG-сайты генов *EDARADD*, *ITGA2B*, *KLF14*, *C1orf132*, *CCDC102B*, *CSNK1D*, *TRIM59*, *MEIS1-AS3*, *NHLRC1*, *SCGN*, *ZYG11A* входят в состав ЭЧ в двух-пяти работах.

В целом, к настоящему моменту разработано много вариантов ЭЧ первого поколения, позволяющих определять биологический возраст человека путем анализа уровней метилирования CpG-сайтов периферической крови. Учитывая тканеспецифичность большинства возраст-ассоциированных изменений метилирования [75], актуальной научной задачей последующих лет может стать создание ориентированных на фундаментальную и практическую медицину ЭЧ для оценки скорости старения отдельных органов и тканей. Оптимальной стратегией для их разработки может стать выбор наиболее часто используемых «универсальных» возраст-ассоциированных CpG-сайтов в области генов *ELOVL2*, *FHL2*, *ASPA*, *PDE4C* и др. и дополнение их тканеспецифичными CpG-сайтами из открытых геномных данных, полученных с использованием высокопроизводительного секвенирования и/или ДНК-микрочипов.

## V. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЧАСЫ ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ

Еще одним перспективным для медицины и пока еще мало разработанным направлением исследований является создание ЭЧ второго поколения, которые должны оценивать индивидуальную скорость старения и риск развития возраст-ассоциированных заболеваний и/или смерти. Такие ЭЧ основываются не только на данных о хронологическом возрасте, но еще и на различных интегральных индикаторах состояния здоровья. Нам удалось обнаружить семь исследований подобного рода (табл. 2). Все они предполагают анализ метилирования ДНК, выделенной из цельной крови, но опираются на разные индикаторы состояния здоровья и используют разные статистические подходы.

Первые ЭЧ подобного рода были предложены Zhang et al в 2017 году [76]. Авторами была сформирована панель из 10 CpG-сайтов, уровни метилирования которых значимо коррелируют с риском смерти от любых причин. Несколько позднее были предложены часы DNAmTL [78], включающие 140 CpG-сайтов, уровни метилирования которых коррелируют со средней длиной теломер лейкоцитов. Имея относительно невысокую эффективность предсказания хронологического возраста ( $r \sim -0.75$ ), DNAmTL хорошо справляются с прогнозированием смерти от любых причин, а также ишемической болезни сердца и сердечной недостаточности.

Часы DNAm PhenoAge [80] и GrimAge [81] опираются уже не на единичные индикаторы состояния здоровья, а на 10 и 7 различных маркеров, соответственно. Обе панели имеют большой размер (513 и 1030 CpG-сайтов, соответственно) и позволяют оценивать как вероятность смерти и риск развития различных возраст-ассоциированных заболеваний (нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, метаболических и опухолевых), так и, при необходимости, некоторые особенности образа жизни обследуемого индивида, например, пищевые предпочтения, наличие вредных привычек и уровень физической активности.

В таблице 2 представлены также часы DunedinPoAm [77] и их обновленная, более совершенная версия – DunedinPACE [79]. Эти ЭЧ опираются на данные длительного наблюдения (12–20 лет) за когортой индивидов из исследования The Dunedin Study. Авторами отобраны индикаторы состояния здоровья, наиболее интенсивно меняющиеся с возрастом и отражающие индивидуальную скорость старения организма [83], а затем сформированы панели CpG-сайтов, уровни метилирования которых коррелирует с этой скоростью. Часы DunedinPACE показали эффективность предсказания смертности и заболеваемости, сопоставимую, а иногда и превосходящую GrimAge [81], при том что число анализируемых CpG-сайтов у них меньше почти в шесть раз (173 против 1030 в GrimAge).

В 2024 г. опубликовано исследование [82], в котором разработали новый подход, позволяющий не только предсказывать биологический возраст, но и анализировать причинно-следственные связи между метилированием ДНК и различными факторами, ассоциированными со старением. Авторы использовали масштабные данные о генетических вариантах, определяющих статус метилирования близлежащих локусов генома (так называемые methylation quantitative trait loci, meQTL), и отобрали таким образом 420509 генотип-зависимых CpG-сайтов, чтобы определить те из них, метилирование которых может являться причиной, а не следствием восьми известных фенотипов, связанных со ускоренным старением. Выявлено 586 предположительно казуальных CpG-сайтов, которые не входили в состав разработанных ранее ЭЧ; среди них присутствуют сайты, ассоциированные как с ускорением, так и с замедлением старения.

**Таблица 2.** Эпигенетические часы второго поколения, построенные на основании корреляции уровней метилирования ДНК из крови пациента с различными индикаторами состояния здоровья.

Число анализируемых CpG-сайтов	Параметры выборки, использованной для разработки		Индикаторы состояния здоровья, использованные для разработки эпигенетических часов	Год, библиографическая ссылка (предложенное название)
	Число индивидов	Возрастной диапазон		
10	2727	32–81	Время до смерти от любых причин	2017 [76]
46	954	26–38	ИМТ, соотношение окружности талии и бедер, среднее артериальное давление, FEV1, FEV1/FVC, VO2Max, уровень гликированного гемоглобина, С-реактивного белка, триглицеридов, липопротеина высокой плотности, липопротеина(а), соотношение аполипопротеина В100/А1, общий холестерин, азот мочевины, количество лейкоцитов, СКФ, заболевания пародонта, длина теломер лейкоцитов	2020 [77] (DunedinPoAm)
140	2256	21–100	Длина теломер	2019 [78] (DNAmTL)
173	1037	26–45	ИМТ, соотношение окружности талии и бедер, среднее артериальное давление, FEV1, FEV1/FVC, VO2Max, уровень гликированного гемоглобина, лептина, С-реактивного белка, триглицеридов, липопротеина высокой плотности, липопротеина(а), соотношение аполипопротеина В100/А1, общий холестерин, азот мочевины, количество лейкоцитов, СКФ, заболевания пародонта, кариес	2022 [79] (DunedinPACE)
513	9926	0–100	Возраст, уровень альбумина, креатинина, глюкозы, С-реактивного белка и щелочной фосфатазы, общее количество лейкоцитов, процент лимфоцитов, ширина распределения эритроцитов и средний объем клеток	2018 [80] (DNAm PhenoAge)
1030	6935	46–78	Курение (количество пачек сигарет в год), уровень адреномедуллина, бета-2-микроглобулина, цистатина С, GDF-15, лептина, PAI-1 и тканевого ингибитора металлопротеиназ 1,	2019 [81] (GrimAge)
1000/1090	2664	0–100	Продолжительность жизни, продолжительности жизни отца и матери, долгожительство, состояние здоровья по собственной оценке, индекс хрупкости (соотношение числа обнаруженных нарушений к числу всех анализируемых), Aging-GIP1 (интегративный показатель, который отражает совокупность перечисленных признаков) и Aging-GIP1-adj (тот же показатель с поправкой на уровень дохода и социально-экономического благополучия)	2024 [82] (DamAge/ AdaptAge*)

ИМТ – индекс массы тела; СКФ – скорость клубочковой фильтрации, FEV1 – объем форсированного выдоха за 1 секунду; FVC – форсированная жизненная емкость легких; VO2Max – максимальное потребление кислорода.

\* Эпигенетические часы DamAge и AdaptAge отслеживают неблагоприятные и благоприятные изменения в уровнях метилирования, соответственно.

Опираясь на эти данные, авторы создали новые, обогащенные предполагаемыми казуальными сайтами ЭЧ, DamAge и AdaptAge, которые отслеживают неблагоприятные (включая рост смертности) и благоприятные (адаптивные) изменения в уровнях метилирования, соответственно. Полученная эпигеномная карта CpG-сайтов, связанных с фенотипическими признаками старения человека через его генотип, может быть использована не только для создания панели казуальных биомаркеров старения, но и для динамичной оценки новых антивозрастных вмешательств и изучения обратимости неблагоприятных возрастных изменений.

В целом, созданные к настоящему моменту ЭЧ второго поколения показали высокую результативность подхода, основанного на выявлении корреляций метилирования ДНК с различными индикаторами здоровья, при стратификации риска возраст-ассоциированных заболеваний и смерти. Однако, перед внедрением разработанных биомаркеров старения в клиническую практику необходимо решить первоочередную задачу оценки их прогностической валидности [84]. Еще одной проблемой, стоящей на пути использования уже разработанных ЭЧ, является их многокомпонентность, а, значит, и низкая экономическая эффективность проводимого анализа. Тем не менее, не вызывает сомнений, что исследования в этой бурно развивающейся области достаточно скоро приведут к созданию небольшой эффективной панели эпигенетических маркеров здоровья, удобной для применения и в клинике, и в популяционных исследованиях.

## VI. ЗАБОЛЕВАНИЯ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ИЗМЕНЕНИЕМ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА

Еще в оригинальной работе Ханнума [32] активно обсуждалась идея, что оценка эпигенетического возраста может оказаться полезной для прогнозирования риска различных возраст-ассоциированных заболеваний у конкретного индивида. При этом удобно оперировать показателями, отражающими не эпигенетический возраст как таковой, а его отклонение от хронологического. Спустя всего два года после описания часов Хорвата и Ханнума было предложено несколько таких показателей, позволяющих адаптировать эти наиболее известные ЭЧ первого поколения для оценки скорости старения и ее изменений [85]. Первая из них, ускорение старения (age acceleration, AgeAccel), отражает простое отношение возраста, оцененного с помощью универсальных часов Хорвата (напомним, что они были разработаны на основании анализа множества типов клеток и тканей), к ожидаемому. В связи с тем, что с возрастом изменяется соотношение различных популяций иммунных клеток, в той же работе было предложено еще два показателя, включающих нормализацию на количество лейкоцитов, которое косвенно рассчитывается из данных метилирования: внутреннее ускорение эпигенетического старения (intrinsic epigenetic age acceleration, IEAA) и внешнее ускорение эпигенетического старения (extrinsic epigenetic age acceleration, EEAA). IEAA, как и AgeAccel, определяется с помощью часов Хорвата, но отражает изменения, уже не зависящие от соотношения клеток. EEAA рассчитывается при помощи часов Ханнума, построенных на основании анализа цельной крови, и, напротив, акцентирует внимание на изменениях, свойственных иммунным клеткам.

В таблице 3 суммирована информация о 22 основных исследованиях, в которых изучали ассоциацию скорости эпигенетического старения с риском возраст-ассоциированных заболеваний (за исключением онкологических): нейродегенеративных (болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона), аутоиммунных (рассеянный склероз

**Таблица 3.** Неонкологические возраст-ассоциированные заболевания, при которых наблюдается ускоренное эпигенетическое старение.

Заболевание	Ткани, в которых наблюдали ускоренное эпигенетическое старение клеток при заболевании	Характеристические признаки течения заболевания, коррелирующие с изменением скорости старения	Эпигенетические часы, с помощью которых показана ассоциация	Библиографические ссылки
Болезнь Альцгеймера	Кровь, кора мозга	Нейропатологические показатели болезни Альцгеймера (амилоидная нагрузка, количество нейритных бляшек и нейрофибрилярных клубков)	Часы Хорвата и Ханнума, DNAm PhenoAge, GrimAge, The cortical clocks	[80, 86, 87]
Болезнь Паркинсона	Кровь	Ранний возраст начала болезни Паркинсона	Часы Хорвата и Ханнума	[85, 88, 89]
Рассеянный склероз	Кровь, мозг (глиальные клетки, клетки бронхо-альвеолярного лаважа)	–	DNAm PhenoAge, DeepMAge, The cortical clocks, AltumAge	[69, 90–92]
Ревматоидный артрит	Кровь	–	Часы Хорвата и Ханнума, DNAm PhenoAge, GrimAge	[93]
Сахарный диабет 2 типа*	Кровь, поджелудочная железа, печень	Уровень гликированного гемоглобина и глюкозы крови, триглицерид-глюкозный индекс	Часы Хорвата и Ханнума, DNAm PhenoAge, GrimAge, DunedinPACE	[81, 94–96]
Сердечно-сосудистые заболевания	Кровь при различных сердечно-сосудистых заболеваниях, атеросклеротические бляшки	Риск неблагоприятных событий у пациентов с тяжелым атеросклерозом, уровень липопротеидов высокой и низкой плотности, количество баллов по Фрамингемской шкале сердечно-сосудистого риска и шкале AHA Life Simple 7	Часы Хорвата и Ханнума, DNAm PhenoAge, GrimAge	[80, 81, 97–103]

\*Ускоренное эпигенетическое старение может наблюдаться у пациентов еще за 10 лет до постановки диагноза.

и ревматоидный артрит), метаболических (сахарный диабет 2 типа) и сердечно-сосудистых, а также с отдельными их характеристиками. Из данных таблицы 3 следует, что ускорение эпигенетического возраста связано и с клиническим течением перечисленных хронических и в большинстве случаев неизлечимых заболеваний. В подавляющем большинстве работ для характеристики отклонения эпигенетического возраста от хронологического использовали часы Хорвата и значение IEAA, часы Ханнума и значение EEAA, а также различные ЭЧ второго поколения (чаще других DNAm PhenoAge и GrimAge, разработанные в числе первых). Важно отметить, что дизайн этих исследований очень разнообразен по используемым выборкам, включению конфаундеров, выбору ЭЧ, методам анализа уровней метилирования и после-

дующей обработки полученных данных. Тем не менее, положительная корреляция ускоренного старения со всеми упомянутыми заболеваниями и сопровождающими их развитие патологическими изменениями прослеживается достаточно четко. Полученные данные позволяют рассматривать степень отклонения эпигенетического возраста от хронологического в качестве эффективного универсального маркера для прогнозирования развития и клинического течения неонкологических возраст-ассоциированных заболеваний.

Онкологические возраст-ассоциированные заболевания стоят особняком от других возраст-ассоциированных заболеваний. Они представляют собой очень разнообразную группу патологий, эпигеномные исследования которых начались достаточно давно. Массив накопленных метиломных данных позволил в короткие сроки после разработки первых ЭЧ сформировать обширную базу исследований, сфокусированных на изучении эпигенетического возраста при различных онкологических заболеваниях, и число таких работ постоянно растет. Их подробное описание не укладывается в рамки настоящего обзора, однако можно выделить некоторые общие закономерности. Полученные к текущему моменту результаты подобных исследований в основном указывают на то, что ускоренное старение клеток крови является маркером высокого риска онкологических заболеваний и смертности от него [81, 104, 105], а ускоренное старение клеток опухолей ассоциировано с позитивным прогнозом [106–108].

## VII. НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА

Данные о связи возраст-ассоциированных заболеваний с ускорением эпигенетического старения открывают перспективы для применения ЭЧ в клинической практике. Однако, недостаточная надежность полученных с помощью ЭЧ оценок при анализе конкретных патологий, связанная со сложностью разделения возраст-зависимых и возраст-независимых изменений метилирования, в значительной мере тормозит их внедрение. Свой вклад вносит также необходимость проведения дорогостоящего метиломного анализа для использования общепризнанных вариантов ЭЧ.

Первая проблема особенно актуальна в онкологии. Развитие злокачественных новообразований сопровождается существенными перестройками паттернов метилирования ДНК опухолевых клеток. Эти перестройки связаны как с глобальным гипометилированием генома, так и с гиперметилированием отдельных областей, в том числе *polycomb*-ассоциированных регуляторных регионов [109], которые в нормальных тканях подвергаются метилированию по мере старения. В связи с этим значительно усложняются и определение эпигенетического возраста опухолевой ткани стандартными методами, и интерпретация полученных данных. Для решения этой проблемы разработано несколько вариантов специфичных для опухолевых клеток эпигенетических «митотических часов» [110–112]. Такие часы, в отличие от классических ЭЧ, не позволяют точно определить биологический возраст человека, но подсчитывают среднее число клеточных делений в конкретном образце ткани, чаще всего, путем оценки количества эпигенетических ошибок, накопленных в ходе многих циклов репликации. Использование митотических часов для исследования биоптатов тканей может помочь в прогнозировании риска онкологических заболеваний с большей точностью, чем стандартное гистологическое исследование.

В последнее время начали появляться и классические ЭЧ, ориентированные в первую очередь на тканеспецифический анализ, например, уже упомянутые ранее «сердечные часы» [54] и часы для коры головного мозга [66], которые должны хорошо подходить для изучения распространенных сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, соответственно. Накопление эпигеномных данных для различных тканей в норме и при патологии может существенно помочь в отборе новых возраст-зависимых маркеров метилирования, одинаково хорошо справляющихся с задачей определения биологического возраста и его ускорения при различных заболеваниях. Можно надеяться, что набор специфических ЭЧ, доступных специалистам в области не только фундаментальной, но и практической медицины, в ближайшем будущем будет только расширяться.

Вторая упомянутая проблема, высокая стоимость анализа, нуждается в решении, не сопровождающемся существенной потерей информативности. Для этого разрабатываются новые варианты ЭЧ, основанные на оценках не уровней метилирования отдельных CpG-сайтов, а общей неоднородности паттернов метилирования внутри анализируемого образца (*within-sample heterogeneity*) [113]. Значительным преимуществом такого подхода является отсутствие необходимости анализировать большой набор строго определенных областей генома с использованием ДНК-микрочипов высокой плотности. Вместо этого применяется один из вариантов таргетного секвенирования – бисульфитное секвенирование ограниченных наборов геномных локусов (*reduced-representation bisulfite sequencing, RRBS*), более дешевое и к тому же не зависящее от конкретной коммерческой платформы для высокопроизводительного анализа. Особенности изменения паттернов метилирования при различных возраст-ассоциированных заболеваниях, детектируемые такими ЭЧ, пока не изучены, а потому их выявление может стать интересным направлением для дальнейших исследований.

Другими актуальными научными направлениями, призванными снизить стоимость определения эпигенетического возраста, могут стать валидация отдельных вариантов малых ЭЧ первого поколения для последующего рутинного применения, а также оптимизация набора клинических параметров, используемых при создании ЭЧ второго поколения, и разработка на этой основе небольших и экономически эффективных панелей маркеров метилирования.

## VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Связь между эпигенетическими изменениями в геноме и старением давно обсуждается в научной литературе. Повсеместное распространение методов высокопроизводительного анализа генома и разработка первых ЭЧ подстегнули интерес к этой области и позволили за относительно короткий срок накопить большой массив данных, которые уже сейчас используются в археологии и криминалистике и приобретают все большее значение для фундаментальной и практической медицины.

Хотя к текущему моменту получены достаточно убедительные данные о связи скоростей эпигенетического старения с развитием различных возраст-ассоциированных заболеваний, пока нет достаточных оснований выстраивать причинно-следственные связи между этими феноменами. Маркеры метилирования, входящие в состав различных вариантов ЭЧ, могут как иметь этиологическое значение, так и быть лишь индикаторами, отражающими влияние генетических факторов, внешних воздействий или некоторых молекулярных процессов, сопровождающих формирование патологического фенотипа.

Уже сейчас предпринимаются попытки приблизиться к решению этой проблемы [82], и они несомненно будут продолжены в ближайшем будущем.

Раскрытие механизмов, лежащих в основе связи между скоростью эпигенетического старения и возраст-ассоциированными заболеваниями, и создание новых, оптимизированных для клинического применения, ЭЧ может сыграть ключевую роль для прогнозирования и ранней диагностики этих заболеваний, а также для разработки комплекса профилактических мер, которые могут отсрочить наступление болезни. Можно надеяться, что эти проблемы будут решены в скором будущем.

---

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России №124020900018-1.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Margiotti, K., Monaco, F., Fabiani, M., Mesoraca, A., & Giorlandino, C. (2023) Epigenetic Clocks: In Aging-Related and Complex Diseases, *Cytogenetic and genome research*, **163** (5–6), 247–256. <https://doi.org/10.1159/000534561>.
2. Noren Hooten, N., Pacheco, N.L., Smith, J.T., & Evans, M.K. (2022) The accelerated aging phenotype: The role of race and social determinants of health on aging, *Ageing research reviews*, **73**, 101536. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101536>.
3. Kresovich, J.K., Park, Y.M., Keller, J.A., Sandler, D.P., & Taylor, J.A. (2022) Healthy eating patterns and epigenetic measures of biological age, *The American journal of clinical nutrition*, **115**(1), 171–179. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab307>.
4. Kim, Y., Huan, T., Joehanes, R., McKeown, N.M., Horvath, S., Levy, D., & Ma, J. (2022) Higher diet quality relates to decelerated epigenetic aging, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **115**(1), 163–170. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab201>.
5. Lei, M.K., Beach, S.R., Dogan, M.V., & Philibert, R.A. (2017) A pilot investigation of the impact of smoking cessation on biological age, *The American journal on addictions*, **26**(2), 129–135. <https://doi.org/10.1111/ajad.12502>.
6. Gao, X., Huang, N., Guo, X., & Huang, T. (2022) Role of sleep quality in the acceleration of biological aging and its potential for preventive interaction on air pollution insults: Findings from the UK Biobank cohort, *Ageing Cell*, **21**(5), e13610. <https://doi.org/10.1111/accel.13610>.
7. Lehallier, B., Shokhirev, M.N., Wyss-Coray, T., & Johnson, A.A. (2020) Data mining of human plasma proteins generates a multitude of highly predictive aging clocks that reflect different aspects of aging, *Ageing Cell*, **19**(11), e13256. <https://doi.org/10.1111/accel.13256>.

8. Kankaanpää, A., Tolvanen, A., Bollepalli, S., Leskinen, T., Kujala, U.M., Kaprio, J., Ollikainen, M., & Sillanpää, E. (2021) Leisure-Time and Occupational Physical Activity Associates Differently with Epigenetic Aging, *Medicine and science in sports and exercise*, **53**(3), 487–495. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002498>.
9. López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023) Hallmarks of aging: An expanding universe, *Cell*, **186**(2), 243–278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>.
10. Li, H., Zhang, N., Wang, Y., Xia, S., Zhu, Y., Xing, C., Tian, X., & Du, Y. (2022) DNA N6-Methyladenine Modification in Eukaryotic Genome, *Frontiers in Genetics*, **13**, 914404. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.914404>.
11. Del Castillo Falconi, V.M., Torres-Arciga, K., Matus-Ortega, G., Díaz-Chávez, J., & Herrera, L.A. (2022) DNA Methyltransferases: From Evolution to Clinical Applications, *International journal of molecular sciences*, **23**(16), 8994. <https://doi.org/10.3390/ijms23168994>.
12. Du, Q., Luu, P.-L., Stirzaker, C., & Clark, S.J. (2015) Methyl-CpG-binding domain proteins: Readers of the epigenome, *Epigenomics*, **7**(6), 1051–1073. <https://doi.org/10.2217/epi.15.39>.
13. Wu, X., & Zhang, Y. (2017) TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond, *Nature Reviews. Genetics*, **18**(9), 517–534. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>.
14. Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A., & Gehrke, C. (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells, *Nucleic Acids Research*, **10**(8), 2709–2721. <https://doi.org/10.1093/nar/10.8.2709>.
15. Gardiner-Garden, M., & Frommer, M. (1987) CpG islands in vertebrate genomes, *Journal of Molecular Biology*, **196**(2), 261–282. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90689-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90689-9).
16. Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D.L. (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(5), 1412–1417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>.
17. Long, H.K., Sims, D., Heger, A., Blackledge, N.P., Kutter, C., Wright, M.L., Grützner, F., Odom, D.T., Patient, R., Ponting, C.P., & Klose, R.J. (2013) Epigenetic conservation at gene regulatory elements revealed by non-methylated DNA profiling in seven vertebrates, *eLife*, **2**, e00348. <https://doi.org/10.7554/eLife.00348>.
18. Pérez, R.F., Tejedor, J.R., Bayón, G.F., Fernández, A.F., & Fraga, M.F. (2018) Distinct chromatin signatures of DNA hypomethylation in aging and cancer, *Ageing Cell*, **17**(3), e12744. <https://doi.org/10.1111/acel.12744>.
19. Бердышев, Г.Д., Коротаев, Г.К., Боярских, Г.В., Ванюшин, Б.Ф. (1967) Нуклеотидный состав ДНК и РНК соматических тканей горбуши и его изменение в течение нереста, *Биохимия*, **32**(5), 988–993.
20. Unnikrishnan, A., Hadad, N., Masser, D.R., Jackson, J., Freeman, W.M., & Richardson, A. (2018) Revisiting the genomic hypomethylation hypothesis of aging, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1418**(1), 69–79. <https://doi.org/10.1111/nyas.13533>.
21. Unnikrishnan, A., Freeman, W.M., Jackson, J., Wren, J.D., Porter, H., & Richardson, A. (2019) The role of DNA methylation in epigenetics of aging, *Pharmacology & Therapeutics*, **195**, 172–185. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.001>.
22. Jung, M., & Pfeifer, G.P. (2015) Aging and DNA methylation, *BMC Biology*, **13**, 7. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0118-4>.

23. Horvath, S., Lu, A.T., Cohen, H., & Raj, K. (2019) Rapamycin retards epigenetic ageing of keratinocytes independently of its effects on replicative senescence, proliferation and differentiation, *Aging*, **11**(10), 3238–3249. <https://doi.org/10.18632/aging.101976>.
24. Fahy, G.M., Brooke, R.T., Watson, J.P., Good, Z., Vasanawala, S.S., Maecker, H., Leipold, M.D., Lin, D.T.S., Kobor, M.S., & Horvath, S. (2019) Reversal of epigenetic aging and immunosenescent trends in humans, *Aging Cell*, **18**(6), e13028. <https://doi.org/10.1111/accel.13028>.
25. Cole, J.J., Robertson, N.A., Rather, M.I., Thomson, J.P., McBryan, T., Sproul, D., Wang, T., Brock, C., Clark, W., Ideker, T., Meehan, R.R., Miller, R.A., Brown-Borg, H.M., & Adams, P.D. (2017) Diverse interventions that extend mouse lifespan suppress shared age-associated epigenetic changes at critical gene regulatory regions, *Genome biology*, **18**(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1185-3>.
26. Matsuyama, M., WuWong, D.J., Horvath, S., & Matsuyama, S. (2019) Epigenetic clock analysis of human fibroblasts in vitro: Effects of hypoxia, donor age, and expression of hTERT and SV40 largeT, *Aging*, **11**(10), 3012–3022. <https://doi.org/10.18632/aging.101955>.
27. Khapre, R.V., Kondratova, A.A., Patel, S., Dubrovsky, Y., Wrobel, M., Antoch, M.P., & Kondratov, R.V. (2014) BMAL1-dependent regulation of the mTOR signaling pathway delays aging, *Aging*, **6**(1), 48–57. <https://doi.org/10.18632/aging.100633>.
28. Kabacik, S., Horvath, S., Cohen, H., & Raj, K. (2018) Epigenetic ageing is distinct from senescence-mediated ageing and is not prevented by telomerase expression, *Aging*, **10**(10), 2800–2815. <https://doi.org/10.18632/aging.101588>.
29. Raj, K., & Horvath, S. (2020) Current perspectives on the cellular and molecular features of epigenetic ageing, *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, **245**(17), 1532–1542. <https://doi.org/10.1177/1535370220918329>.
30. Koch, C.M., & Wagner, W. (2011) Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues, *Aging*, **3**(10), 1018–1027. <https://doi.org/10.18632/aging.100395>.
31. Horvath, S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types, *Genome Biology*, **14**(10), R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>.
32. Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J. B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., & Zhang, K. (2013) Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates, *Molecular cell*, **49**(2), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016>.
33. Oblak, L., van der Zaag, J., Higgins-Chen, A.T., Levine, M.E., & Boks, M.P. (2021) A systematic review of biological, social and environmental factors associated with epigenetic clock acceleration, *Ageing Research Reviews*, **69**, 101348. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101348>.
34. Bohlin, J., Håberg, S.E., Magnus, P., Reese, S.E., Gjessing, H.K., Magnus, M.C., Parr, C.L., Page, C.M., London, S.J., & Nystad, W. (2016) Prediction of gestational age based on genome-wide differentially methylated regions, *Genome Biology*, **17**(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1063-4>.
35. Simpkin, A.J., Suderman, M., & Howe, L.D. (2017) Epigenetic clocks for gestational age: Statistical and study design considerations, *Clinical Epigenetics*, **9**, 100. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0402-y>.
36. Garagnani, P., Bacalini, M.G., Pirazzini, C., Gori, D., Giuliani, C., Mari, D., Di Blasio, A.M., Gentilini, D., Vitale, G., Collino, S., Rezzi, S., Castellani, G., Capri, M., Salvioli, S., & Franceschi, C. (2012) Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age, *Aging Cell*, **11**(6), 1132–1134. <https://doi.org/10.1111/accel.12005>.
37. Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Makowska, Ż., Spas, A., Parys-Proszek, A., Kucharczyk, K., Płoski, R., & Branicki, W. (2015) Examination of DNA methylation status

- of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science, *Forensic Science International. Genetics*, **14**, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.10.002>.
38. Sukawutthiya, P., Sathirapatya, T., & Vongpaisarnsin, K. (2021) A minimal number CpGs of ELOVL2 gene for a chronological age estimation using pyrosequencing, *Forensic Science International*, **318**, 110631. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110631>.
  39. Weidner, C.I., Lin, Q., Koch, C.M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Bauerschlag, D.O., Jöckel, K.H., Erbel, R., Mühlisen, T.W., Zenke, M., Brümmendorf, T.H., & Wagner, W. (2014) Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites, *Genome biology*, **15**(2), R24. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r24>.
  40. Thong, Z., Tan, J.Y.Y., Loo, E.S., Phua, Y.W., Chan, X.L.S., & Syn, C.K.-C. (2021) Artificial neural network, predictor variables and sensitivity threshold for DNA methylation-based age prediction using blood samples, *Scientific Reports*, **11**(1), 1744. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81556-2>.
  41. Bekaert, B., Kamalandua, A., Zapico, S.C., Van de Voorde, W., & Decorte, R. (2015) Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers, *Epigenetics*, **10**(10), 922–930. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1080413>.
  42. Correia Dias, H., Cordeiro, C., Corte Real, F., Cunha, E., & Manco, L. (2020) Age Estimation Based on DNA Methylation Using Blood Samples From Deceased Individuals, *Journal of forensic sciences*, **65**(2), 465–470. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14185>.
  43. Anaya, Y., Yew, P., Roberts, K.A., & Hardy, W.R. (2021) DNA methylation of decedent blood samples to estimate the chronological age of human remains, *International journal of legal medicine*, **135**(6), 2163–2173. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02650-8>.
  44. Li, A., Mueller, A., English, B., Arena, A., Vera, D., Kane, A.E., & Sinclair, D.A. (2022) Novel feature selection methods for construction of accurate epigenetic clocks, *PLoS Computational Biology*, **18**(8), e1009938. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009938>.
  45. Manco, L., & Dias, H.C. (2022) DNA methylation analysis of ELOVL2 gene using droplet digital PCR for age estimation purposes, *Forensic Science International*, **333**, 111206. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111206>.
  46. Xu, C., Qu, H., Wang, G., Xie, B., Shi, Y., Yang, Y., Zhao, Z., Hu, L., Fang, X., Yan, J., & Feng, L. (2015) A novel strategy for forensic age prediction by DNA methylation and support vector regression model, *Scientific Reports*, **5**, 17788. <https://doi.org/10.1038/srep17788>.
  47. Li, X., Li, W., & Xu, Y. (2018) Human Age Prediction Based on DNA Methylation Using a Gradient Boosting Regressor, *Genes*, **9**(9), 424. <https://doi.org/10.3390/genes9090424>.
  48. Freire-Aradas, A., Phillips, C., Mosquera-Miguel, A., Girón-Santamaría, L., Gómez-Tato, A., Casares de Cal, M., Álvarez-Dios, J., Ansedo-Bermejo, J., Torres-Español, M., Schneider, P.M., Pośpiech, E., Branicki, W., Carracedo, Á., & Lareu, M.V. (2016) Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system, *Forensic Science International. Genetics*, **24**, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.06.005>.
  49. Gensous, N., Sala, C., Pirazzini, C., Ravaioli, F., Milazzo, M., Kwiatkowska, K.M., Marasco, E., De Fanti, S., Giuliani, C., Pellegrini, C., Santoro, A., Capri, M., Salvioli, S., Monti, D., Castellani, G., Franceschi, C., Bacalini, M.G., & Garagnani, P. (2022) A Targeted Epigenetic Clock for the Prediction of Biological Age, *Cells*, **11**(24), 4044. <https://doi.org/10.3390/cells11244044>.
  50. Vidal-Bralo, L., Lopez-Golan, Y., & Gonzalez, A. (2016) Simplified Assay for Epigenetic Age Estimation in Whole Blood of Adults, *Frontiers in Genetics*, **7**, 126. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00126>.

51. Zubakov, D., Liu, F., Kokmeijer, I., Choi, Y., van Meurs, J.B.J., van IJcken, W.F.J., Uitterlinden, A.G., Hofman, A., Broer, L., van Duijn, C.M., Lewin, J., & Kayser, M. (2016) Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length, *Forensic Science International. Genetics*, **24**, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.05.014>.
52. Han, Y., Franzen, J., Stiehl, T., Gobs, M., Kuo, C.-C., Nikolić, M., Hapala, J., Koop, B.E., Strathmann, K., Ritz-Timme, S., & Wagner, W. (2020) New targeted approaches for epigenetic age predictions, *BMC Biology*, **18**(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00807-2>.
53. Naue, J., Hoefsloot, H.C.J., Mook, O.R.F., Rijlaarsdam-Hoekstra, L., van der Zwalm, M.C.H., Henneman, P., Kloosterman, A.D., & Verschure, P.J. (2017) Chronological age prediction based on DNA methylation: Massive parallel sequencing and random forest regression, *Forensic Science International. Genetics*, **31**, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.015>.
54. Mongelli, A., Panunzi, S., Nesta, M., Gottardi Zamperla, M., Atlante, S., Barbi, V., Mongiardini, V., Ferraro, F., De Martino, S., Cis, L., Re, A., Maltese, S., Bachetti, T., La Rovere, M.T., Martelli, F., Pesce, M., Nanni, S., Massetti, M., Pontecorvi, A., Farsetti, A., ... Gaetano, C. (2023) Distinguishable DNA methylation defines a cardiac-specific epigenetic clock, *Clinical epigenetics*, **15**(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13148-023-01467-z>.
55. Vidaki, A., Ballard, D., Aliferi, A., Miller, T.H., Barron, L.P., & Syndercombe Court, D. (2017) DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing, *Forensic science international. Genetics*, **28**, 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.02.009>.
56. Florath, I., Butterbach, K., Müller, H., Bewerunge-Hudler, M., & Brenner, H. (2014) Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites, *Human molecular genetics*, **23**(5), 1186–1201. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt531>.
57. Giuliani, C., Cilli, E., Bacalini, M.G., Pirazzini, C., Sazzini, M., Gruppioni, G., Franceschi, C., Garagnani, P., & Luiselli, D. (2016) Inferring chronological age from DNA methylation patterns of human teeth, *American Journal of Physical Anthropology*, **159**(4), 585–595. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22921>.
58. Li, C., Gao, W., Gao, Y., Yu, C., Lv, J., Lv, R., Duan, J., Sun, Y., Guo, X., Cao, W., & Li, L. (2018) Age prediction of children and adolescents aged 6-17 years: an epigenome-wide analysis of DNA methylation, *Aging*, **10**(5), 1015–1026. <https://doi.org/10.18632/aging.101445>.
59. McEwen, L.M., O'Donnell, K.J., McGill, M.G., Edgar, R.D., Jones, M.J., MacIsaac, J.L., Lin, D.T.S., Ramadori, K., Morin, A., Gladish, N., Garg, E., Unternaehrer, E., Pokhvisneva, I., Karnani, N., Kee, M.Z.L., Klengel, T., Adler, N.E., Barr, R.G., Letourneau, N., ... Kobor, M.S. (2020) The PedBE clock accurately estimates DNA methylation age in pediatric buccal cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **117**(38), 23329–23335. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820843116>.
60. Wu, X., Chen, W., Lin, F., Huang, Q., Zhong, J., Gao, H., Song, Y., & Liang, H. (2019) DNA methylation profile is a quantitative measure of biological aging in children, *Aging*, **11**(22), 10031–10051. <https://doi.org/10.18632/aging.102399>.
61. Zhang, J., Fu, H., & Xu, Y. (2021) Age Prediction of Human Based on DNA Methylation by Blood Tissues, *Genes*, **12**(6), 870. <https://doi.org/10.3390/genes12060870>.
62. Liang, X., Sinha, R., Justice, A.C., Cohen, M.H., Aouizerat, B.E., & Xu, K. (2022) A new monocyte epigenetic clock reveals nonlinear effects of alcohol consumption on biological aging in three independent cohorts (N = 2242), *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, **46**(5), 736–748. <https://doi.org/10.1111/acer.14803>.

63. Li, J., Zhu, X., Yu, K., Jiang, H., Zhang, Y., Wang, B., Liu, X., Deng, S., Hu, J., Deng, Q., Sun, H., Guo, H., Zhang, X., Chen, W., Yuan, J., He, M., Bai, Y., Han, X., Liu, B., ... Wu, T. (2018) Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Accelerated DNA Methylation Aging, *Environmental Health Perspectives*, **126**(6), 067005. <https://doi.org/10.1289/EHP2773>.
64. Aanes, H., Bleka, Ø., Dahlberg, P.S., Carm, K.T., Lehtimäki, T., Raitakari, O., Kähönen, M., Hurme, M., & Rolseth, V. (2023) A new blood based epigenetic age predictor for adolescents and young adults, *Scientific reports*, **13**(1), 2303. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29381-7>.
65. Lu, A.T., Fei, Z., Haghani, A., Robeck, T.R., Zoller, J.A., Li, C.Z., Lowe, R., Yan, Q., Zhang, J., Vu, H., Ablaeva, J., Acosta-Rodriguez, V.A., Adams, D.M., Almunia, J., Aloysius, A., Ardehali, R., Arneson, A., Baker, C.S., Banks, G., Belov, K., ... Horvath, S. (2023) Universal DNA methylation age across mammalian tissues, *Nature aging*, **3**(9), 1144–1166. <https://doi.org/10.1038/s43587-023-00462-6>.
66. Shireby, G.L., Davies, J.P., Francis, P.T., Burrage, J., Walker, E.M., Neilson, G.W.A., Dahir, A., Thomas, A.J., Love, S., Smith, R.G., Lunnon, K., Kumari, M., Schalkwyk, L.C., Morgan, K., Brookes, K., Hannon, E., & Mill, J. (2020) Recalibrating the epigenetic clock: implications for assessing biological age in the human cortex, *Brain: a journal of neurology*, **143**(12), 3763–3775. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa334>.
67. Horvath, S., Oshima, J., Martin, G.M., Lu, A.T., Quach, A., Cohen, H., Felton, S., Matsuyama, M., Lowe, D., Kabacik, S., Wilson, J.G., Reiner, A.P., Maierhofer, A., Flunkert, J., Aviv, A., Hou, L., Baccarelli, A.A., Li, Y., Stewart, J.D., Whitsel, E.A., ... Raj, K. (2018) Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and ex vivo studies, *Aging*, **10**(7), 1758–1775. <https://doi.org/10.18632/aging.101508>.
68. Zhang, Q., Vallerga, C.L., Walker, R.M., Lin, T., Henders, A.K., Montgomery, G.W., He, J., Fan, D., Fowdar, J., Kennedy, M., Pitcher, T., Pearson, J., Halliday, G., Kwok, J.B., Hickie, I., Lewis, S., Anderson, T., Silburn, P.A., Mellick, G.D., Harris, S.E., ... Visscher, P.M. (2019) Improved precision of epigenetic clock estimates across tissues and its implication for biological ageing, *Genome medicine*, **11**(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0667-1>.
69. Galkin, F., Mamoshina, P., Kochetov, K., Sidorenko, D., & Zhavoronkov, A. (2021) DeepMAGE: A Methylation Aging Clock Developed with Deep Learning, *Aging and Disease*, **12**(5), 1252–1262. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.1202>.
70. Lee, Y., Haftorn, K.L., Denault, W.R.P., Nustad, H.E., Page, C.M., Lyle, R., Lee-Ødegård, S., Moen, G.-H., Prasad, R.B., Groop, L.C., Sletner, L., Sommer, C., Magnus, M.C., Gjessing, H.K., Harris, J.R., Magnus, P., Håberg, S.E., Jugessur, A., & Bohlin, J. (2020) Blood-based epigenetic estimators of chronological age in human adults using DNA methylation data from the Illumina MethylationEPIC array, *BMC Genomics*, **21**(1), 747. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07168-8>.
71. de Lima Camillo, L.P., Lapierre, L.R., & Singh, R. (2022) A pan-tissue DNA-methylation epigenetic clock based on deep learning, *Npj Aging*, **8**(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41514-022-00085-y>.
72. Amiri Roudbar, M., Mousavi, S.F., Salek Ardestani, S., Lopes, F.B., Momen, M., Gianola, D., & Khatib, H. (2021) Prediction of biological age and evaluation of genome-wide dynamic methylomic changes throughout human aging, *G3 (Bethesda, Md.)*, **11**(7), jkab112. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab112>.
73. Seale, K., Horvath, S., Teschendorff, A., Eynon, N., & Voisin, S. (2022) Making sense of the ageing methylome, *Nature reviews. Genetics*, **23**(10), 585–605. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00477-6>.
74. Woodruff, R.C., Tong, X., Khan, S.S., Shah, N.S., Jackson, S.L., Loustalot, F., & Vaughan, A.S. (2024) Trends in Cardiovascular Disease Mortality Rates and Excess Deaths, 2010–2022,

- American journal of preventive medicine*, **66**(4), 582–589. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2023.11.009>.
75. Sliker, R.C., Relton, C.L., Gaunt, T.R., Slagboom, P.E., & Heijmans, B.T. (2018) Age-related DNA methylation changes are tissue-specific with ELOVL2 promoter methylation as exception, *Epigenetics & Chromatin*, **11**(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0191-3>.
76. Zhang, Y., Wilson, R., Heiss, J., Breitling, L. P., Saum, K.U., Schöttker, B., Holleczeck, B., Waldenberger, M., Peters, A., & Brenner, H. (2017) DNA methylation signatures in peripheral blood strongly predict all-cause mortality, *Nature communications*, **8**, 14617. <https://doi.org/10.1038/ncomms14617>.
77. Belsky, D.W., Caspi, A., Arseneault, L., Baccarelli, A., Corcoran, D.L., Gao, X., Hannon, E., Harrington, H.L., Rasmussen, L.J., Houts, R., Huffman, K., Kraus, W.E., Kwon, D., Mill, J., Pieper, C.F., Prinz, J.A., Poulton, R., Schwartz, J., Sugden, K., ... Moffitt, T.E. (2020) Quantification of the pace of biological aging in humans through a blood test, the DunedinPoAm DNA methylation algorithm, *eLife*, **9**, e54870. <https://doi.org/10.7554/eLife.54870>.
78. Lu, A.T., Seeboth, A., Tsai, P.C., Sun, D., Quach, A., Reiner, A.P., Kooperberg, C., Ferrucci, L., Hou, L., Baccarelli, A.A., Li, Y., Harris, S.E., Corley, J., Taylor, A., Deary, I.J., Stewart, J.D., Whitsel, E.A., Assimes, T.L., Chen, W., Li, S., ... Horvath, S. (2019) DNA methylation-based estimator of telomere length, *Aging*, **11**(16), 5895–5923. <https://doi.org/10.18632/aging.102173>.
79. Belsky, D.W., Caspi, A., Corcoran, D.L., Sugden, K., Poulton, R., Arseneault, L., Baccarelli, A., Chamarti, K., Gao, X., Hannon, E., Harrington, H.L., Houts, R., Kothari, M., Kwon, D., Mill, J., Schwartz, J., Vokonas, P., Wang, C., Williams, B.S., & Moffitt, T.E. (2022) DunedinPACE, a DNA methylation biomarker of the pace of aging, *eLife*, **11**, e73420. <https://doi.org/10.7554/eLife.73420>.
80. Levine, M.E., Lu, A.T., Quach, A., Chen, B.H., Assimes, T.L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A.A., Stewart, J.D., Li, Y., Whitsel, E.A., Wilson, J.G., Reiner, A.P., Aviv, A., Lohman, K., Liu, Y., Ferrucci, L., & Horvath, S. (2018) An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan, *Aging*, **10**(4), 573–591. <https://doi.org/10.18632/aging.101414>.
81. Lu, A.T., Quach, A., Wilson, J.G., Reiner, A.P., Aviv, A., Raj, K., Hou, L., Baccarelli, A.A., Li, Y., Stewart, J.D., Whitsel, E.A., Assimes, T.L., Ferrucci, L., & Horvath, S. (2019) DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan, *Aging*, **11**(2), 303–327. <https://doi.org/10.18632/aging.101684>.
82. Ying, K., Liu, H., Tarkhov, A.E., Sadler, M.C., Lu, A.T., Moqri, M., Horvath, S., Kutalik, Z., Shen, X., & Gladyshev, V. N. (2024) Causality-enriched epigenetic age uncouples damage and adaptation, *Nature aging*, **4**(2), 231–246. <https://doi.org/10.1038/s43587-023-00557-0>.
83. Belsky, D.W., Caspi, A., Houts, R., Cohen, H.J., Corcoran, D.L., Danese, A., Harrington, H., Israel, S., Levine, M.E., Schaefer, J.D., Sugden, K., Williams, B., Yashin, A.I., Poulton, R., & Moffitt, T.E. (2015) Quantification of biological aging in young adults, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**(30), E4104–E4110. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506264112>.
84. Moqri, M., Herzog, C., Poganik, J.R., Ying, K., Justice, J.N., Belsky, D.W., Higgins-Chen, A.T., Chen, B.H., Cohen, A.A., Fuellen, G., Hägg, S., Marioni, R.E., Widschwendter, M., Fortney, K., Fedichev, P.O., Zhavoronkov, A., Barzilai, N., Lasky-Su, J., Kiel, D.P., Kennedy, B.K., ... Ferrucci, L. (2024) Validation of biomarkers of aging, *Nature medicine*, **30**(2), 360–372. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02784-9>.
85. Horvath, S., & Ritz, B.R. (2015) Increased epigenetic age and granulocyte counts in the blood of Parkinson's disease patients, *Aging*, **7**(12), 1130–1142. <https://doi.org/10.18632/aging.100859>.

86. Grodstein, F., Lemos, B., Yu, L., Klein, H.U., Iatrou, A., Buchman, A.S., Shireby, G.L., Mill, J., Schneider, J.A., De Jager, P.L., & Bennett, D.A. (2021) The association of epigenetic clocks in brain tissue with brain pathologies and common aging phenotypes, *Neurobiology of disease*, **157**, 105428. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105428>.
87. Sommerer, Y., Dobricic, V., Schilling, M., Ohlei, O., Sabet, S.S., Wesse, T., Fuß, J., Franzenburg, S., Franke, A., Parkkinen, L., Lill, C.M., & Bertram, L. (2023) Entorhinal cortex epigenome-wide association study highlights four novel loci showing differential methylation in Alzheimer's disease, *Alzheimer's research & therapy*, **15**(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s13195-023-01232-7>.
88. Picillo, M., Lizarraga, K.J., Friesen, E.L., Chau, H., Zhang, M., Sato, C., Rooke, G., Munhoz, R.P., Rogaeva, E., Fraser, P.E., Kalia, S.K., & Kalia, L. V. (2018) Parkinsonism due to A53E  $\alpha$ -synuclein gene mutation: Clinical, genetic, epigenetic, and biochemical features, *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **33**(12), 1950–1955. <https://doi.org/10.1002/mds.27506>.
89. Tang, X., Gonzalez-Latapi, P., Marras, C., Visanji, N.P., Yang, W., Sato, C., Lang, A.E., Rogaeva, E., & Zhang, M. (2022) Epigenetic Clock Acceleration Is Linked to Age at Onset of Parkinson's Disease, *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **37**(9), 1831–1840. <https://doi.org/10.1002/mds.29157>.
90. Klose, D., Needhamsen, M., Ringh, M.V., Hagemann-Jensen, M., Jagodic, M., & Kular, L. (2023) Smoking affects epigenetic ageing of lung bronchoalveolar lavage cells in Multiple Sclerosis, *Multiple sclerosis and related disorders*, **79**, 104991. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2023.104991>.
91. Kular, L., Klose, D., Urdánnoz-Casado, A., Ewing, E., Planell, N., Gomez-Cabrero, D., Needhamsen, M., & Jagodic, M. (2022) Epigenetic clock indicates accelerated aging in glial cells of progressive multiple sclerosis patients, *Frontiers in aging neuroscience*, **14**, 926468. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.926468>.
92. Theodoropoulou, E., Alfredsson, L., Piehl, F., Marabita, F., & Jagodic, M. (2019) Different epigenetic clocks reflect distinct pathophysiological features of multiple sclerosis, *Epigenomics*, **11**(12), 1429–1439. <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0102>.
93. Mukherjee, N., & Harrison, T.C. (2024) Epigenetic Aging and Rheumatoid Arthritis, *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, **79**(1), glad213. <https://doi.org/10.1093/gerona/glad213>.
94. Cortez, B.N., Pan, H., Hinthorn, S., Sun, H., Neretti, N., Gloyn, A.L., & Aguayo-Mazzucato, C. (2024) Heterogeneity of increased biological age in type 2 diabetes correlates with differential tissue DNA methylation, biological variables, and pharmacological treatments, *GeroScience*, **46**(2), 2441–2461. <https://doi.org/10.1007/s11357-023-01009-8>.
95. Fraszczyk, E., Thio, C.H.L., Wackers, P., Dollé, M.E.T., Bloks, V.W., Hodemaekers, H., Picaudet, H. S., Stynenbosch, M., Verschuren, W. M. M., Snieder, H., Spijkerman, A. M. W., & Luijten, M. (2022) DNA methylation trajectories and accelerated epigenetic aging in incident type 2 diabetes, *GeroScience*, **44**(6), 2671–2684. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00626-z>.
96. Miao, K., Hong, X., Cao, W., Lv, J., Yu, C., Huang, T., Sun, D., Liao, C., Pang, Y., Hu, R., Pang, Z., Yu, M., Wang, H., Wu, X., Liu, Y., Gao, W., & Li, L. (2024) Association between epigenetic age and type 2 diabetes mellitus or glycemic traits: A longitudinal twin study, *Aging cell*, e14175. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/accel.14175>.
97. Lind, L., Ingelsson, E., Sundström, J., Siegbahn, A., & Lampa, E. (2018) Methylation-based estimated biological age and cardiovascular disease, *European journal of clinical investigation*, **48**(2), 10.1111/eci.12872. <https://doi.org/10.1111/eci.12872>.

98. Pottinger, T.D., Khan, S.S., Zheng, Y., Zhang, W., Tindle, H.A., Allison, M., Wells, G., Shadyab, A.H., Nassir, R., Martin, L.W., Manson, J.E., Lloyd-Jones, D.M., Greenland, P., Baccarelli, A.A., Whitsel, E.A., & Hou, L. (2021) Association of cardiovascular health and epigenetic age acceleration, *Clinical epigenetics*, **13**(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01028-2>.
99. Lo, Y.H., & Lin, W.Y. (2022) Cardiovascular health and four epigenetic clocks, *Clinical epigenetics*, **14**(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01295-7>.
100. Diez Benavente, E., Hartman, R.J.G., Sakkars, T.R., Wesseling, M., Sloots, Y., Slenders, L., Boltjes, A., Mol, B.M., de Borst, G.J., de Kleijn, D.P.V., Prange, K.H.M., de Winther, M.P.J., Kuiper, J., Civelek, M., van der Laan, S. W., Horvath, S., Onland-Moret, N.C., Mokry, M., Pasterkamp, G., & den Ruijter, H.M. (2024) Atherosclerotic Plaque Epigenetic Age Acceleration Predicts a Poor Prognosis and Is Associated With Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Humans, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **44**(6), 1419–1431. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.123.320692>.
101. Pan, W., Huang, Q., Zhou, L., Lin, J., Du, X., Qian, X., Jiang, T., & Chen, W. (2024) Epigenetic age acceleration and risk of aortic valve stenosis: a bidirectional Mendelian randomization study, *Clinical epigenetics*, **16**(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s13148-024-01647-5>.
102. Lemke, E., Vetter, V.M., Berger, N., Banszerus, V.L., König, M., & Demuth, I. (2022) Cardiovascular health is associated with the epigenetic clock in the Berlin Aging Study II (BASE-II), *Mechanisms of ageing and development*, **201**, 111616. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111616>.
103. Perna, L., Zhang, Y., Mons, U., Holleczeck, B., Saum, K.U., & Brenner, H. (2016) Epigenetic age acceleration predicts cancer, cardiovascular, and all-cause mortality in a German case cohort, *Clinical epigenetics*, **8**, 64. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0228-z>.
104. Kresovich, J.K., Xu, Z., O'Brien, K.M., Weinberg, C.R., Sandler, D.P., & Taylor, J.A. (2019) Methylation-Based Biological Age and Breast Cancer Risk, *Journal of the National Cancer Institute*, **111**(10), 1051–1058. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz020>.
105. Zheng, Y., Joyce, B. T., Colicino, E., Liu, L., Zhang, W., Dai, Q., Shrubsole, M.J., Kibbe, W.A., Gao, T., Zhang, Z., Jafari, N., Vokonas, P., Schwartz, J., Baccarelli, A.A., & Hou, L. (2016) Blood Epigenetic Age may Predict Cancer Incidence and Mortality, *EBioMedicine*, **5**, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.02.008>.
106. Hong, C., Yang, S., Wang, Q., Zhang, S., Wu, W., Chen, J., Zhong, D., Li, M., Li, L., Li, J., Yu, H., Chen, H., Zeng, Q., & Zhang, C. (2021) Epigenetic Age Acceleration of Stomach Adenocarcinoma Associated With Tumor Stemness Features, Immunoactivation, and Favorable Prognosis, *Frontiers in genetics*, **12**, 563051. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.563051>.
107. Zheng, C., Berger, N. A., Li, L., & Xu, R. (2020) Epigenetic age acceleration and clinical outcomes in gliomas, *PloS one*, **15**(7), e0236045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236045>.
108. Zhou, Y.J., Lu, X.F., Meng, J.L., Wang, Q.W., Chen, J.N., Zhang, Q.W., Zheng, K.I., Rocha, C.S., Martins, C.B., Yan, F.R., & Li, X.B. (2021) Specific epigenetic age acceleration patterns among four molecular subtypes of gastric cancer and their prognostic value, *Epigenomics*, **13**(10), 767–778. <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0290>.
109. Pérez, R.F., Tejedor, J.R., Fernández, A.F., & Fraga, M.F. (2022) Aging and cancer epigenetics: Where do the paths fork?, *Ageing cell*, **21**(10), e13709. <https://doi.org/10.1111/acel.13709>.
110. Yang, Z., Wong, A., Kuh, D., Paul, D.S., Rakyán, V.K., Leslie, R.D., Zheng, S.C., Widschwendter, M., Beck, S., & Teschendorff, A.E. (2016) Correlation of an epigenetic mito-

- tic clock with cancer risk, *Genome biology*, **17**(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1064-3>.
111. Youn, A., & Wang, S. (2018) The MiAge Calculator: a DNA methylation-based mitotic age calculator of human tissue types, *Epigenetics*, **13**(2), 192–206. <https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1389361>.
112. Teschendorff A.E. (2020) A comparison of epigenetic mitotic-like clocks for cancer risk prediction, *Genome medicine*, **12**(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00752-3>.
113. Karetnikov, D.I., Romanov, S.E., Baklaushev, V.P., & Laktionov, P.P. (2024) Age prediction using DNA methylation heterogeneity metrics, *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, 4967. <https://doi.org/10.3390/ijms25094967>.