

ГЕНДЕР-СПЕЦИФИЧНЫЕ ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ГЕНОВ

DOI: 10.17691/stm2021.13.3.03

УДК 577.21+616–053

Поступила 21.02.2021 г.



Е.В. Кондакова, ассистент кафедры общей и медицинской генетики Института биологии и биомедицины¹;

О.С. Вершинина, младший научный сотрудник кафедры прикладной математики

Института информационных технологий, математики и механики¹;

М.В. Лопатенко, студент Института биологии и биомедицины¹;

К. Франчески, MD, Professor Emeritus, главный научный сотрудник центра фотоники

Отдела фундаментальных и прикладных исследований¹; Mater Studiorum²;

М.В. Иванченко, д.ф.-м.н., зав. кафедрой прикладной математики Института информационных технологий, математики и механики¹;

М.В. Ведунова, д.б.н., зав. кафедрой общей и медицинской генетики Института биологии и биомедицины¹;
директор Института биологии и биомедицины¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
проспект Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950;

²University of Bologna, Via Zamboni, 33, Bologna, 40126, Italy

Цель исследования — функциональный анализ гендер-специфичных возраст-зависимых изменений уровня метилирования ДНК.

Материалы и методы. В исследовании использовали набор данных по метилированию GSE87571, полученный из ДНК крови 729 человек в возрасте от 14 до 94 лет с использованием чипа Illumina Infinium HumanMethylation450K BeadChip (США). Анализ генных онтологий был проведен для трех групп генов (у женщин, мужчин и у обоих полов — дубликатов) с помощью базы данных PANTHER. Анализ обогащения биологических путей выполнен с применением баз данных Gene Ontology (GO) и Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

Результаты. Исследования показали уникальные для мужчин и женщин изменения в уровне метилирования сайтов CpG, ассоциированные с определенными метаболическими процессами. Установлено, что большая часть CpG-сайтов, для которых выявлено изменение уровня метилирования с возрастом у обоих полов, ассоциирована с генами, ответственными за развитие и функционирование нервной системы. У мужчин уникальные возрастные изменения метилирования затрагивают сайты CpG, связанные с изменениями в иммунной системе и липидном обмене. У женщин большая часть CpG связана с изменениями, вовлеченными в процессы транскрипции и трансляции. Анализ биологических функций по KEGG выявил уникальный для мужчин процесс, связанный с возрастными изменениями метилирования глутаматергической системы. Для женщин уникальные биологические процессы, имеющие возраст-зависимые изменения, включают гены, ответственные за развитие сахарного диабета, и гены, связанные с сигнальными каскадами цАМФ (KEGG:04024).

Заключение. Выявлены фундаментальные особенности гендер-зависимых изменений уровня метилирования среди сайтов CpG с увеличением дисперсии, которые позволяют определить различия в возраст-зависимых изменениях.

Ключевые слова: метилирование ДНК; CpG-сайты; возраст-ассоциированные заболевания; гендер-специфичные изменения метилирования.

Как цитировать: Kondakova E.V., Vershinina O.S., Lopatenko M.V., Franceschi C., Ivanchenko M.V., Vedunova M.V. Sex-specific age-related changes in methylation of certain genes. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2021; 13(3): 26–32, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.3.03>

English

Sex-Specific Age-Related Changes in Methylation of Certain Genes

E.V. Kondakova, Assistant, Department of General and Medical Genetics, Institute of Biology and Biomedicine¹;

O.S. Vershinina, Junior Researcher, Department of Applied Mathematics, Institute of Information Technologies, Mathematics and Mechanics¹;

Для контактов: Кондакова Елена Владимировна, e-mail: elen_kondakova@list.ru

M.V. Lopatenko, Student, Institute of Biology and Biomedicine¹;
C. Franceschi, MD, Professor Emeritus, Senior Researcher, Photonics Center,
 Department of Fundamental and Applied Research¹; Mater Studiorum²;
M.V. Ivanchenko, DSc, Head of the Department of Applied Mathematics,
 Institute of Information Technologies, Mathematics, and Mechanics¹;
M.V. Vedunova, DSc, Head of the Department of General and Medical Genetics,
 Institute of Biology and Biomedicine¹; Director of the Institute of Biology and Biomedicine¹

¹National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina,
 Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²University of Bologna, 33 Via Zamboni, Bologna, 40126, Italy

The aim of the study was to conduct a functional analysis of sex-specific age-related changes in DNA methylation.

Materials and Methods. The study used a GSE87571 methylation dataset obtained from the blood DNA of 729 individuals aged 14 to 94 using the Illumina Infinium HumanMethylation450K BeadChip (USA). Gene ontology analysis was performed for 3 groups of genes (females, males, and duplicates) using the PANTHER database. The DAVID platform was used to perform KEGG metabolic pathway analysis.

Results. The studies revealed unique for males and females changes in methylation of CpG sites, associated with certain metabolic processes. It was demonstrated that most of the CpG sites, for which methylation changes with age were revealed in both sexes, are associated with the genes responsible for the development and functioning of the nervous system. In males, unique age-related methylation changes affect CpG sites associated with changes in the immune system and lipid metabolism. In females, most CpGs are associated with changes involved in transcription and translation processes. Analysis of biological functions by KEGG revealed that a unique process associated with age-related changes in methylation of the glutamatergic system is typical for males. In females, unique biological processes with age-related changes include genes responsible for the development of diabetes and genes associated with cAMP signaling cascades (KEGG:04024).

Conclusion. Our studies reveal fundamental features of sex-dependent changes in methylation of CpG sites with variance increasing, which may indicate differences in age-related changes.

Key words: DNA methylation; CpG sites; age-associated diseases; sex-specific changes.

Введение

На протяжении многих десятилетий нерешенным остается вопрос, каковы причины различий в продолжительности жизни мужчин и женщин. Лонгитюдные популяционные исследования в различных странах и в разные эпохи демонстрируют, что женщины живут дольше мужчин [1]. В настоящее время разница в продолжительности жизни мужчин и женщин варьирует в зависимости от региона проживания, достигая максимума в России — 9 лет. При этом отмечается интересный парадокс: низкая продолжительность жизни мужчин по сравнению с женщинами и при этом более высокий уровень заболеваемости у женщин, что до сих пор не имеет объяснения [2]. Недавние отчеты о распространении ковидной инфекции в разных странах также указывают на вариативность по гендерному признаку в показателях смертности, среди которых 60–70% случаев приходится на мужчин [3]. Гендерные различия фиксируются при анализе положения с сердечно-сосудистыми заболеваниями, раком и нейродегенеративными заболеваниями. В частности, у мужчин инфаркт миокарда встречается чаще, чем у женщин. Показатель смертности от гипертонии с поправкой на возраст в среднем увеличивается у мужчин больше, чем у женщин [4]. При этом некоторые авторы отмечают худшую диастолическую функцию левого желудочка у женщин [5]. Также имеются данные о том, что рак репродуктивных тканей у мужчин встречается с

более высокой частотой, а смертность в два раза превышает показатели у женщин [6].

Предложенные ранее гипотезы относительно половых различий в продолжительности жизни, включая устойчивость женщин к влиянию окислительного стресса, более активное функционирование у них иммунной системы, защитный эффект гормонов, в частности эстрогена, а также компенсаторные эффекты второй X-хромосомы, до сих пор не нашли убедительного подтверждения [7].

Большое значение при решении данной проблемы придается возрастным изменениям уровня метилирования ДНК [8–10]. В настоящее время существуют различные способы определения возраст-зависимых изменений метилирования ДНК, показана взаимосвязь этих показателей с прогнозируемой продолжительностью жизни. Установлено, что изменения метилирования участвуют в развитии множества возрастных заболеваний, включая нейродегенерацию и онкологию. В этом случае особый интерес представляет поиск возрастных маркеров старения и развития патологий. Кроме того, известно множество особенностей проявлений ряда патологий, которые не охарактеризованы по гендерному признаку и не являются гормонозависимыми. В связи с этим изучение эпигенетической регуляции экспрессии в возрастном аспекте для обоих полов имеет большое значение.

Принципиальной является дифференциальная оценка гипо- и гиперметилирования различных

СрG-сайтов. При этом особый интерес представляют гены с увеличением дисперсии, поскольку именно эти гены предположительно ассоциированы с замедлением или ускорением возраст-зависимых изменений. Выявление более ранних возрастных изменений метилирования сайтов СрG и изучение гендерных различий этих процессов имеет решающее значение для ранней профилактики патологий и достижения цели здорового старения.

Цель исследования — выявить гендер-специфичные возраст-зависимые изменения уровня метилирования ДНК и провести функциональный биоинформационный анализ данных изменений.

Материалы и методы

Набор данных по метилированию GSE87571 [11], полученный из ДНК крови с использованием чипа Illumina Infinium HumanMethylation450K BeadChip (Illumina, Inc. США), был загружен из базы данных Gene Expression Omnibus (GEO) [12]. Всего набор включал ДНК 729 человек, из которых 341 мужчина и 388 женщин в возрасте от 14 до 94 лет. ДНК-зонды, расположенные на половых хромосомах, перекрестно-реактивные зонды и зонды с SNP согласно списку [13] были исключены из набора данных. Поскольку во многих ранних исследованиях [14, 15] сообщается о гендерной специфичности метилирования, мы исследовали подмножества мужчин и женщин отдельно. Анализ генных онтологий был проведен для трех групп генов (женских, мужских и обоих полов — дубликатов) с использованием базы данных PANTHER [16]. Для каждого из полученных списков СрG мы выполнили анализ обогащения генов по базе данных Gene Ontology (GO). Анализ обогащения осуществляли с помощью функции methylglm, реализованной в пакете methylGSA [17]. Кроме того, для всех рассматриваемых СрG соответствующие символы генов из аннотации для массива метилирования Illumina 450K были преобразованы в официальные символы генов из библиотеки NCBI с использованием функции alias2SymbolUsingNCBI в пакете limma [18]. Условия обогащения по GO были разделены на два типа: MF (молекулярная функция) и BP (биологический процесс). Анализ метаболических путей Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) мы выполняли с использованием платформы DAVID [19]. Анализ обогащения путей был выполнен для 404 и 622 уникальных генов из группы Residuals (остатков линейной регрессии) с использованием набора данных GSE87571.

Статистическая обработка проводилась с использованием метода Бенджамини–Хохберга с учетом FDR. Результаты анализа по KEGG были статистически значимыми при $FDR < 0,05$.

Результаты

Прежде всего мы идентифицировали сайты СрG, у которых с возрастом наблюдаются значительные из-

менения метилирования. Мы построили для каждого зонда СрG модель линейной регрессии с целью оценки зависимости значений метилирования от возраста. В результате количество зондов СрG составило 3827 для мужчин и 3850 для женщин. Затем мы идентифицировали зонды СрG со значительной возрастной вариабельностью уровня метилирования. Таким образом мы получили 2075 зондов для мужчин и 2282 для женщин, у которых метилирование и вариабельность зависят от возраста. Для выбранных сайтов СрG были созданы списки соответствующих уникальных генов (1037 для мужчин и 1092 для женщин). Кроме того, по данным метилирования с помощью калькулятора Horvath оценивали количество клеток крови [20, 21]. Остаточные значения были рассчитаны на основе регрессионной модели зависимости бета-значений от количества CD8T и CD4 T-клеток, NK-клеток, В-клеток и гранулоцитов. Мы применили тот же анализ к группе остатков и идентифицировали 592 зонда для мужчин и 1008 для женщин, у которых метилирование и вариабельность существенно зависят от возраста (404 и 622 уникальных гена соответственно).

Известно, что возраст-зависимые изменения ДНК связаны с общим уменьшением уровня метилирования из-за снижения активности ферментов метилирования. Однако на фоне глобального гипометилирования наблюдается сайт-специфическое гиперметилирование [22, 23]. Анализ выбранных регионов гена показал, что среди СрG, которые изменяют уровень метилирования с возрастом, есть сайты, которые как увеличивают, так и уменьшают метилирование (рис. 1).

Мы разделили списки возраст-ассоциированных дифференциально и вариабельно метилированных позиций, полученных для остатков, на несколько категорий, различающихся по полу и направлению метилирования (увеличение или уменьшение с возрастом). Для этого использовали диаграмму рассеяния угловых коэффициентов линейной регрессии в зависимости от возраста и уровня метилирования. Условно было получено 6 групп, каждая из которых имеет определенные особенности: СрG-сайты с возрастающим и уменьшающимся метилированием только для женщин, только для мужчин и для обоих полов. Количество СрG-сайтов, полученных в конечных списках, представлено в таблице.

На первом этапе исследований были проанализированы СрG-сайты, у которых отмечено изменение уровня метилирования с возрастом для мужчин и женщин.

При анализе гендер-зависимых сайтов СрG было выявлено 8 уникальных биологических процессов, характерных для женщин ($p < 0,05$; $FDR < 0,05$). Эти биологические процессы ассоциированы с такими молекулярными механизмами, как стабилизация и поддержание местоположения белка (GO:0050821 — protein stabilization, GO:0045185 — maintenance of protein location), сборка рибонуклеопротеиново-

го и сплайсосомного комплекса (GO:0022618 — ribonucleoprotein complex assembly, GO:0000245 — spliceosomal complex assembly), связывание убиквитин-подобного белка (GO:0032182 — ubiquitin-like protein binding), а также включают уникальный клеточный компонент, связанный с клеточными микрочастицами (GO:0072562 — blood microparticle).

При анализе гендер-зависимых CpG у женщин установлено, что сайты CpG, показывающие уменьшение уровня метилирования с возрастом, ассоциированы с процессами регуляции локализации белка в ядре и процессами убиквитинирования белков. CpG-сайты, увеличивающие свое метилирование с возрастом у женщин, ассоциированы с процессами биосинтеза полисахаридов, сборкой сплайсосомального и рибонуклеопротеинового комплексов, а также с процессами регуляции стабильности и поддержания местоположения белков.

Для мужчин уникальные изменения метилирования вовлечены в 41 биологический процесс. Условно их можно разделить на несколько групп: процессы, связанные с созреванием и дифференцировкой клеток иммунной системы, процессы, связанные с посттрансляционной модификацией белков, процессы биосинтеза липидов и процессы, ассоциированные с клеточными компонентами и регуляцией рекомбинации и репарации ДНК.

CpG-сайты, для которых отмечено уменьшение уровня метилирования с возрастом у мужчин, ассоциированы с процессами биосинтеза жирных кислот и изменением лигазной активности (GO:1901568 — fatty acid derivative metabolic process, GO:1901570 — fatty acid derivative biosynthetic process, GO:0016874 — ligase activity; $p < 0,05$; $FDR < 0,05$).

CpG-сайты, для которых отмечается увеличение уровня метилирования с возрастом у мужчин, в основном относятся к процессам созревания и дифференцировки клеток иммунной системы, а также, что интересно, ассоциированы с процессами посттрансляционной модификации белков (алкилирование и метилирование) и активностью ферментов, вовлеченных в эти процессы.

Все возраст-зависимые гендер-специфичные гены, для которых показано изменение уровня метилирования с возрастом, были разделены на три группы:

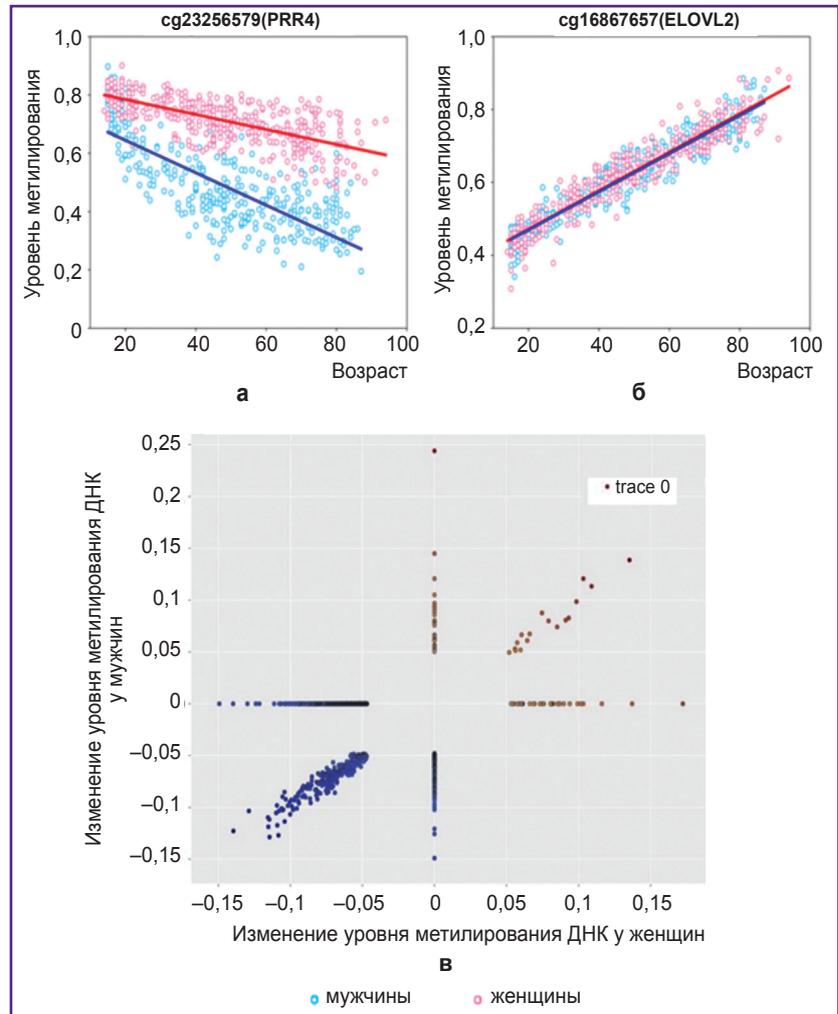


Рис. 1. Изменение уровня метилирования у различных полов: а, б, в — типичные примеры изменений метилирования сайта CpG с возрастом

Количество CpG-сайтов в полученных списках в зависимости от пола и направления (увеличение/уменьшение с возрастом) метилирования

| Мужчины | | Женщины | | | |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 592 | | 1008 | | | |
| Уникальные для мужчин | Дубликаты | Уникальные для женщин | | | |
| 257 | 335 | 673 | | | |
| Увеличение с возрастом | Уменьшение с возрастом | Увеличение с возрастом | Уменьшение с возрастом | Увеличение с возрастом | Уменьшение с возрастом |
| 217 | 40 | 311 | 24 | 622 | 51 |

у мужчин — 404, у женщин — 622 и для обоих полов (группа «дубликаты») — 278 (рис. 2).

Анализ по KEGG группы генов-дубликатов показал два наиболее значимых изменения ($p < 0,05$) в метаболических каскадах. У обоих полов обнаружено возраст-зависимое метилирование генов, ответственных за лиганд-зависимые взаимодействия в нервной системе — KEGG:04080 (neuroactive ligand-receptor interaction), и генов, относящихся к биологическому



Рис. 2. Основные биологические процессы, ассоциированные с изменением уровня метилирования CpG-сайтов в трех группах (по результатам KEGG-анализа)

пути кокаиновой зависимости, — KEGG:05030 (cocaine addiction).

Анализ биологических функций группы генов, возрастное метилирование которых характерно только для женщин, выявил пять важных ($p < 0,05$) метаболических каскадов. Уникальные биологические процессы с возраст-зависимыми изменениями у женщин включают гены, ответственные за развитие сахарного диабета — KEGG:04950 (maturity onset diabetes of the young — MODY), а также гены, связанные с сигнальными каскадами циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) — KEGG:04024, в частности ген *HTR4*, который является членом семейства рецепторов серотонина человека. Этот рецептор связан с G-белком, и они стимулируют выработку цАМФ в ответ на серотонин. Продукт этого гена функционирует как в периферической, так и в центральной нервной системе, модулируя высвобождение различных нейротрансмиттеров. Его стимуляция повышает продукцию цАМФ в клетке и играет роль в регуляции процессов памяти, аппетита, функций желудочно-кишечного тракта, настроения. Последние данные подтверждают роль рецепторов 5-HT₄ в патогенезе депрессии, а также в механизме действия антидепрессантов.

Метаболический каскад MODY содержит гены, которые имеют принципиальное значение для развития сахарного диабета, в частности ген глюкокиназы (*GCK*), дефекты которого являются причиной наступившего зрелого диабета 2-го типа у молодых людей. Мутации гена *GCK* приводят к хронической гипергликемии из-за снижения чувствительности бета-клеток поджелудочной железы к глюкозе, снижения общего накопления гликогена в печени и увеличения глюконеогенеза в печени.

Анализ биологических функций по KEGG показал, что для мужчин характерен уникальный процесс, связанный с возраст-зависимым изменением метилирования глутаматергической системы (KEGG:04724 — glutamatergic synapse). Известно, что глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером в центральной нервной системе. Пути глутаматергических синапсов, которые связаны со многими другими путями нейротрансмиттеров, играют решающую роль в выполнении большого количества нормальных физиологических функций, а дисфункция глутамата является ключевым фактором многих заболеваний нервной системы.

Обсуждение

Целью данного исследования явилось изучение эпигенетического статуса CpG-сайтов, гендер-специфично изменяющих уровень метилирования и дисперсию с возрастом. Несмотря на то, что с возрастом на-

блюдается глобальное гипометилирование, выявлено регион-специфичное гиперметилирование отдельных участков ДНК. В данной работе мы анализировали данные нескольких подгрупп, различающихся по полу и направлению значений метилирования, включая сайты как с увеличением, так и с уменьшением уровня метилирования. В анализ были включены только CpG-сайты, ассоциированные с внутригенными регионами, изменяющие и уровень метилирования, и уровень дисперсии с возрастом. Дифференциальные изменения в уровне метилирования CpG-сайтов, у которых возраст-зависимо увеличивается дисперсия, могут рассматриваться как молекулярные механизмы различий в продолжительности жизни между мужчинами и женщинами [24]. Ранее в исследовании I.I. Yusipov и соавт. [25] было показано глобальное увеличение дисперсии метилирования ДНК во время старения, а также обозначена тенденция к более высокой дисперсии у мужчин по сравнению с женщинами в возрастном аспекте. Это может обуславливать разницу в траекториях старения между полами.

Исследование показало уникальные для мужчин и женщин изменения в метилировании сайтов CpG, связанные с метаболическими процессами, которые могут определять гендер-зависимые возрастные изменения. Выявлено, что большая часть CpG-сайтов, для которых отмечено изменение метилирования с возрастом у обоих полов, ассоциирована с генами, ответственными за развитие и функционирование нервной системы. Полученные результаты подтверждаются литературными данными относительно различий между полами в отношении таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера [26]. В первом случае показатели смертности у мужчин

выше, чем у женщин в пожилом возрасте, в то время как риск возникновения болезни Альцгеймера и смертность от нее преобладают у женщин.

Установлено, что у мужчин возрастные изменения метилирования CpG-сайтов связаны с генами, ответственными за работу иммунной системы и липидного обмена. Изменение липидного метаболизма для мужчин намного более губительно, чем для женщин, так как даже незначительное увеличение общего холестерина и триглицеридов у мужчин рассматривается как фактор риска развития атеросклероза, в то время как у женщин такое изменение может носить нейтральный характер за счет увеличенного метаболизма эстрогенов [27].

Уникальным биологическим процессом, изменения в генах при котором характерны для мужчин, является функционирование глутаматергической системы. Уровень глутамата в крови значительно выше у мужчин, чем у женщин, а данная система служит ключевым регулятором поведения, связанного с наркозависимостью [28].

В уникальные биологические процессы, характеризующиеся возраст-зависимыми изменениями у женщин, вовлечены гены, участвующие в патогенезе депрессии. Подобные эпигенетические изменения могут быть причиной того, что возраст-ассоциированная депрессия чаще встречается у женщин, чем у мужчин [29].

Выявленные различия в метаболических каскадах, связанных с развитием диабета, представляют интерес в связи с имеющимися данными о связи между повышенным уровнем глюкозы, ожирением и раковыми заболеваниями непродуктивных тканей. Метаболизм глюкозы при раковых заболеваниях у мужчин и женщин может проходить через разные пути [6] и тем самым определять различный уровень онкологических заболеваний непродуктивной сферы между полами.

Таким образом, наши исследования выявляют фундаментальные особенности гендер-зависимых изменений уровня метилирования среди сайтов CpG с увеличением дисперсии, которые могут указывать на различия в возраст-зависимых изменениях.

Заключение

Установлены уникальные для мужчин и женщин изменения в уровне метилирования сайтов CpG, ассоциированные с определенными метаболическими процессами.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках проекта госзадания Министерства науки и высшего образования РФ №0729-2020-0061.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Luy M., Gast K. Do women live longer or do men die earlier? Reflections on the causes of sex differences in life

expectancy. *Gerontology* 2014; 60(2): 143–153, <https://doi.org/10.1159/000355310>.

2. Oksuzyan A., Shkolnikova M., Vaupel J.W., Christensen K., Shkolnikov V.M. Sex differences in health and mortality in Moscow and Denmark. *Eur J Epidemiol* 2014; 29(4): 243–252, <https://doi.org/10.1007/s10654-014-9893-4>.

3. Spagnolo P.A., Manson J.E., Joffe H. Sex and gender differences in health: what the COVID-19 pandemic can teach us. *Ann Intern Med* 2020; 173(5): 385–386, <https://doi.org/10.7326/m20-1941>.

4. Mendy V.L., Rowell-Cunsolo T., Bellerose M., Vargas R., Zhang L., Enkhmaa B. Temporal trends in hypertension death rate in Mississippi, 2000–2018. *Am J Hypertens* 2021; hpab068, <https://doi.org/10.1093/ajh/hpab068>.

5. Cai A., Zhou D., Liu L., Zhou Y., Tang S., Feng Y. Age-related alterations in cardiac and arterial structure and function in hypertensive women and men. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2021, <https://doi.org/10.1111/jch.14262>.

6. Haupt S., Caramia F., Klein S.L., Rubin J.B., Haupt Y. Sex disparities matter in cancer development and therapy. *Nat Rev Cancer* 2021, <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00348-y>.

7. Austad S.N. Why women live longer than men: sex differences in longevity. *Gen Med* 2006; 3(2): 79–92, [https://doi.org/10.1016/s1550-8579\(06\)80198-1](https://doi.org/10.1016/s1550-8579(06)80198-1).

8. Jung M., Pfeifer G. Aging and DNA methylation. *BMC Biol* 2015; 13: 7, <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0118-4>.

9. Horvath S., Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet* 2018; 19(6): 371–384, <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3>.

10. Field A.E., Robertson N.A., Wang T., Havas A., Ideker T., Adams P.D. DNA methylation clocks in aging: categories, causes, and consequences. *Mol Cell* 2018; 71(6): 882–895, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.008>.

11. Johansson A., Enroth S., Gyllenstein U. Continuous aging of the human DNA methylome throughout the human lifespan. *PLoS One* 2013; 8(6): e67378, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067378>.

12. Barrett T., Troup D.B., Wilhite S.E., Ledoux P., Rudnev D., Evangelista C., Kim I.F., Soboleva A., Tomashevsky M., Marshall K.A., Phillippy K.H., Sherman P.M., Muetter R.N., Edgar R. NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: D885–D890, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn764>.

13. Inoshita M., Numata S., Tajima A., Kinoshita M., Umehara H., Yamamori H., Hashimoto R., Imoto I., Ohmori T. Sex differences of leukocytes DNA methylation adjusted for estimated cellular proportions. *Biol Sex Differ* 2015; 6: 11, <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0029-7>.

14. Singmann P., Shem-Tov D., Wahl S., Grallert H., Fiorito G., Shin S.Y., Schramm K., Wolf P., Kunze S., Baran Y., Guarrera S., Vineis P., Krogh V., Panico S., Tumino R., Kretschmer A., Gieger C., Peters A., Prokisch H., Relton C.L., Matullo G., Illig T., Waldenberger M., Halperin E. Characterization of whole-genome autosomal differences of DNA methylation between men and women. *Epigenetics Chromatin* 2015; 8: 43, <https://doi.org/10.1186/s13072-015-0035-3>.

15. Pellegrini C., Pirazzini C., Sala C., Sambati L., Yusipov I., Kalyakulina A., Ravaioli F., Kwiatkowska K.M., Durso D.F., Ivanchenko M., Monti D., Lodi R., Franceschi C., Cortelli P., Garagnani P., Bacalini M.G. A meta-analysis of brain

- DNA methylation across sex, age, and Alzheimer's disease points for accelerated epigenetic aging in neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 2021; 13: 639428, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.639428>.
16. Mi H., Muruganujan A., Thomas P.D. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research* 2013; 41: D377–D386, <https://doi.org/10.1093/nar/gks1118>.
17. Ren X., Kuan P.F. MethylGSA: a Bioconductor package and Shiny app for DNA methylation data length bias adjustment in gene set testing. *Bioinformatics* 2019; 35(11): 1958–1959, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty892>.
18. Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research* 2015; 43(7): e47, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
19. Jiao X., Sherman B.T., Huang da W., Stephens R., Baseler M.W., Lane H.C., Lempicki R.A. DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics* 2012; 28(13): 1805–1806, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts251>.
20. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 2013; 14(10): R115, <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>.
21. DNA Methylation Age Calculator. URL: <https://dnamage.genetics.ucla.edu/home>.
22. Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012; 13(7): 484–492, <https://doi.org/10.1038/nrg3230>.
23. Xiao F.H., Wang H.T., Kong Q.P. Dynamic DNA methylation during aging: a “prophet” of age-related outcomes. *Front Genet* 2019; 10: 107, <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00107>.
24. Vershinina O., Bacalini M.G., Zaikin A., Franceschi C., Ivanchenko M. Disentangling age-dependent DNA methylation: deterministic, stochastic, and nonlinear. *Sci Rep* 2021; 11(1): 9201, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88504-0>.
25. Yusipov I.I., Bacalini M.G., Kalyakulina A.I., Krivonosov M., Pirazzini C., Gensous N., Ravaioli F., Milazzo M., Giuliani C., Vedunova M., Fiorito G., Gagliardi A., Polidoro S., Garagnani P., Ivanchenko M., Franceschi C. Age-related DNA methylation changes are sex-specific: a comprehensive assessment. *Aging (Albany NY)* 2020; 23(12): 24057–24080, <https://doi.org/10.18632/aging.202251>.
26. Austad S.N., Bartke A. Sex differences in longevity and in responses to anti-aging interventions: a mini-review. *Gerontology* 2015; 62(1): 40–46, <https://doi.org/10.1159/000381472>.
27. Palmisano B.T., Zhu L., Eckel R.H., Stafford J.M. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism. *Mol Metab* 2018; 15: 45–55, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.008>.
28. Giacometti L.L., Barker J.M. Sex differences in the glutamate system: implications for addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 2020; 113: 157–168, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.03.010>.
29. Hodes G.E., Epperson C.N. Sex differences in vulnerability and resilience to stress across the life span. *Biol Psychiatry* 2019; 86(6): 421–432, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.04.028>.