**2. Tikslai ir rezultatai. Santrauka**

Straipsnyje yra nagrinėjami įvairūs skrodimo metu paimtų audinių mėginių amžiaus nustatymo modeliai, kurie remiasi DNR metilinimo procesu. Tyrimas buvo atliktas su 180 audinių mėginiais, kurie buvo paimti iš 20 korėjiečių kūnų. Šie modeliai buvo naudojami devyniems skirtingiems audinių tipams, kad būtų galima kuo tiksliau nustatyti amžių. Tyrimu buvo siekta pagerinti biologinio amžiaus įvertinimą teismo medicinos srityje. Rezultatai parodė, kad *pan-audinių* laikrodis ir epigenetinis laikrodis pasižymėjo vidutinišku/aukštu tikslumu ir stipria koreliacija su tikruoju kraujo mėginių amžiumi, o tai rodo potencialą epigenetinių laikrodžių naudojimui teisėsaugoje, ypač amžiaus nustatymui iš biologinių mėginių. Tyrimas pabrėžė audinio tipo, DNR kokybės ir naudojamo specifinio epigenetinio laikrodžio svarbą amžiaus įvertinimui teismo medicinos srityje.

**3. Atlikite bent vieną kokybės kontrolės patikrinimą**

**Duomenų paruošimas**:

Tikrinome duomenų kokybę su tankio diagrama. Tam, kad sudarytume diagramą, suskaičiavome kiekvieno stulpelio vidurkį ir surūšiavome pagal cpg regionus.

A graph of values and values

Description automatically generated with medium confidence

**Rezultatų interpretacija:**

Kaip matome, cpg „salų“ žemesnis, negu „shelf, shore openSea“. Tai rodo, kad duomenys atitiko kokybės kontrolės normas ir mes galime pereiti prie duomenų analizės.

**4. Sugrupuokite mėginius naudodami hierarchinį klasterizavimą**

**Duomenų paruošimas**:

Mes pradėjome nuo to, kad sudarėme 3 grupes:

1. Pagal lytį;
2. Pagal audinių tipą;
3. Pagal potencialią depresiją, t.y. jeigu žmogaus mirties priežastis buvo savižudybė, laikėme, kad tas žmogus serga depresija. Kita vertus, svarbu pažymėti, kad depresija žmonėms nebuvo diagnozuota arba nebuvo formaliai įrašyta kaip liga lentelėje.

A diagram of a cluster

Description automatically generated**Dendrograma:**

**Group Colors**

1. Men – light blue
2. Women – pink

**Depressed Colors**

1. Depressed – grey
2. Non depressed - yellow

**Tissue colors:**

1. Blood - red
2. Brain - black
3. Dermis - green
4. Epidermis - blue
5. Heart – light green
6. Kidney - grey
7. Liver - coral
8. Lung - white
9. Muscle – yellow

**Rezultatų interpretacija:**

Matome, kad mėginiai klasterizavosi pagal audinių tipus. Galime teigti, kad labai didelio skirtumo tarp mėginių nėra, nors ir galime pastebėti nežymius skirtumus tarp moterų, turinčių depresiją. Vis dėlto, didelio skirtumo tarp „Non-depressed” ir „ Depressed” žmonių nėra.

5. Atvaizduokite dalį duomenų "heatmap" pavidalu

**Duomenų paruošimas**:

Mes pradėjome nuo to, kad atrinkome žmones, kurie sirgo ateroskleroze. Po to paėmėme tik tokius duomenis, kurie atitinka šį šabloną: „Žmogus sirgo ateroskleroze, paimtas audinys yra „heart“ (širdis), citozinas yra X chromosomoje ir priklauso „Opensea“ regionui.   
(Coronary atherosclerosis && heart && chrX && OpenSea). Po duomenų rūšiavimo, atrinkome top 10 kintamiausių pozicijų.

A red and white squares with black text

Description automatically generated

**Heatmap:**   
X-ašis: Citozino pozicijoms X chromosomoje. Pavadinimus dekoduoti galima pagal viršuje pateiktą lentelę.   
Y-ašis: Donorų id. Dekoduoti galima pagal tokį šabloną: Sample\_id\_DonorAge\_Sex\_TissueType

**Rezultatų interpretacija:**

Kaip matome, bendra tendencija tikrai yra. Visi stulpeliai yra labai panašūs, žinoma, yra ir ribinių rezultatų, pvz. kaip CG1 x 2020\_8\_66\_M\_heart, kuriuos norėtųsi aptarti žemiau:

**CG1 x 2020\_8\_66\_M\_heart:**

Sunku pasakyti, ar šitas regionas gali kažkaip daryti įtaką aterosklerozės formavimuisi, nes neturime informacijos, ar jis susietas su kažkokiu genu. Taip pat tai nėra transkripcijos faktoriaus prisijungimo vieta. Galbūt tai yra „Junk“-DNR sritis.

**CG2 x 2020\_16\_77\_M\_heart:**

CG2 asocijuojamas su TAZ genu, kuris koduoja baltymą – Tafazziną (Tafazzin). Šio geno ekspresija yra ganėtinai didelė būtent širdies ir raumenų ląstelėse. Baltymo mutacijos yra asocijuotos su širdies ligomis, pvz.: kardiomiopatija, hipertonija ir pan. Todėl, galime daryti prielaidą, kodėl 77\_M donoras sugebėjo pragyventi taip ilgai. Tai ypač ryškiai matosi jeigu palyginsime 77\_M ir 56\_M donorų rezultatus: Skaičiai yra itin panašūs ir vienintelis skirtumas – CG2 metilinimas, o gyvenimo trukmės ilgis skiriasi ~21 m.

**CG3 x 2020\_127\_38\_M\_heart:**

CG3 asocijuojamas su MAGEA1 genu, koduojančiu baltymą “Melanoma-Associated Antigen 1”. Suprantama, kad genas susijęs su melanoma (odos vėžiu), tačiau sunku pasakyti, kodėl šitoje pozicijoje citozinas nėra modifikuotas. Donoras neturėjo jokių įrašų apie kokias nors vėžines ligas. Dėl šios priežasties sunku pasakyti kaip MAGEA1 genas susietas su širdies ligomis, tačiau akivaizdu, kad šio geno ekspresija širdies ląstelėse gali mažinti gyvenimo trukmę.

**CG4:**

CG4 susijęs su CLCN4 genu, koduojančiu baltymą – “Chloride Voltage-Gated Channel 4 ”. Šio geno ekspresiją sunku būtų kažkaip susieti su širdies ligomis, nes, kaip matome, geno ekspressijos populiacinis kintamumas (jeigu 9 žmones galime vadinti populiacija) sąlyginai yra gan didelis.

**CG5 x 2020\_93\_74\_M\_heart:**

CG5 turi sąryšį su CD99L2 genu, koduojančiu baltymą – “CD99 Antigen-Like Protein 2”. Baltymas yra glaudžiai susijęs su imuniteto veikla. Sąryšio tarp širdies ligų ir šio geno ekspresijos nelabai matyti.

**CG6 x 2020\_127\_38\_M\_heart:**

CG6 asocijuojamas su TSIX genu. Genas koduoja nekoduojančią RNR. Šios RNR funkcija yra inaktyvuoti antrąją X chromosomą moterų ląstelėse. Sąryšių tarp širdies ligų ir šio geno ekspresijos vėlgi nematyti. Galime daryti prielaidą, kad padidinta MAGEA1 ir TSIX ekspresija tai yra kažkoks genetinis sutrikimas 127-ojo donoro organizme.

**CG8 x 2020\_17\_78\_M\_heart:**

CG8 turi sąryšį su JADE3 genu, koduojančiu baltymą – “jade family PHD finger 3”. Nors duomenys iš NCBI rodo, kad šio geno ekspresija širdies ląstelėse dažniausiai nėra labai didelė, bet galime spėti, kad padidinta šio geno ekspresija gali turėti ryšį su ilga gyvenimo trukme.

**CG10 x 2020\_93\_74\_M\_heart:**

CG10 asocijuojamas su LINC01285 genu, koduojančiu m-RNR. Pagal NCBI LINC01285 ekspresija yra ganėtinai maža, išskyrus smegenis, tačiau pasakyti, ar tai „gerai“, ar „blogai“ būtų sudėtinga, nes m-RNR, kaip klasė, dar nėra labai plačiai ištirta.

**Išvados:**

Nors ir neišėjo atrasti daug genų, kurie yra turėtų asociacijų su širdies ligomis ir ateroskleroze, tačiau įdomu tai, kad tendencijos yra, dažniausiai, labai panašios. Žinoma, tobulesnei analizei reikėtų palyginti „sveikos“ ir „aterosklerozės” grupės rezultatus, bet donorų sąrašas yra mažas, todėl to kokybiškai padaryti, tikriausiai, neįmanoma.

**6. Atlikite apžvalginę ("exploratory") analizę.**

**Mėginių koreliacijos atvaizdavimas**

A screenshot of a graph

Description automatically generated

Norėjome pažiūrėti mėginių koreliacijas pagal audinio tipus, tačiau kažkokių išskirtinių atvejų neatradome, visur korelicija yra >0.96.

**Moterų box plot**

A graph with different colored rectangles

Description automatically generated

Kadangi 3\4 moterų potencialiai serga depresija, norėjome pažiūrėti, ar būtų įmanoma patikrinti, jog galimai yra kažkokių skirtumų “smegenų” mėginiuose. Kažkokio didelio skirtumo nepastebėjome, tačiau įdomu būtų išanalizuoti 41\_F ir 47\_F mėginius. 41\_F serga depresija, o 47\_F - ne. Matome, kad kvadratai atrodo beveik identiškai, mediana taip pat labai panaši. Žinome, kad senstant žmogaus „epigenetika” irgi keičiasi, todėl galime iškelti hipotezę, kad depresija gali daryti įtaką žmogaus senėjimui epigenetikos lygmenyje.

**6.2 Trumpa apžvalga:**

**Epigenetinio laikrodžio tikslumas visuose audiniuose:**

Skirtingi audiniai rodo skirtingą tikslumo lygį numatant amžių naudojant epigenetinius laikrodžius, o kraujas paprastai rodo didžiausią tikslumą dėl jo dinaminio pobūdžio ir aiškių metilinimo modelio pokyčių, susijusių su senėjimu.

**Audiniams būdingi metilinimo būdai:**

Audiniai, veikiami išorinės aplinkos, pavyzdžiui, oda ar plaučiai, pasižymi didesniu metilinimo modelių kintamumu, palyginti su viduje apsaugotais audiniais, tokiais kaip smegenys, galimai dėl aplinkos toksinų poveikio ar gyvenimo būdo veiksnių.

**Senėjimo įtaka metilinimui įvairiuose audiniuose:**

Chronologinio senėjimo įtaka DNR metilinimo modeliams labai skiriasi įvairiuose audinių tipuose, o tai rodo, kad kiekvienas audinys gali senti unikaliu molekuliniu greičiu.

**Metilinimo koreliacija su biologiniu ir chronologiniu amžiumi:**

DNR metilinimo lygiai audiniuose, tokiuose kaip kraujas ir smegenys, glaudžiai koreliuoja su biologiniu ir chronologiniu amžiumi, o tai pabrėžia jų galimą naudą nustatant individo amžių teismo medicinos ekspertizės metu.

**Metilinimo skirtumų pritaikymas teismo medicinos srityje:**

Reikšmingi DNR metilinimo modelių skirtumai audiniuose gali sustiprinti teismo medicinos ekspertizės metodikas, ypač tais atvejais, kai reikia nustatyti audinio kilmę iš biologinių mėginių.

**Metilinimo vaidmuo jautrumui ligoms visuose audiniuose:**

DNR metilinimo lygių skirtumai skirtinguose audiniuose gali rodyti skirtingą jautrumą ligoms, susijusioms su amžiumi, o tai yra potencialus *biomarkeris* ankstyvai diagnozei.

References:

**Application of array-based age prediction models to post-mortem tissue samples**  
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497323001151

**TAFAZZIN tafazzin, phospholipid-lysophospholipid transacylase [ Homo sapiens (human) ]**<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6901>

**MAGEA1 MAGE family member A1 [ *Homo sapiens* (human) ]**<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4100#summary>

**CLCN4 chloride voltage-gated channel 4**<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1183#summary>

**CD99L2 CD99 molecule like 2 [ *Homo sapiens* (human) ]**  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/83692#summary>

Tsix<https://en.wikipedia.org/wiki/Tsix>

**JADE3 jade family PHD finger 3 [ *Homo sapiens* (human) ]**https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9767#summary