

Ассоциация относительной длины теломер и генетического варианта гена *SIRT1* с возрастной макулярной дегенерацией

Л.К. Мошетьова¹, О.П. Дмитренко², О.И. Абрамова¹, Н.С. Карпова²,
К.И. Туркина¹, И.Н. Сабурина^{2,3}

¹ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, Россия

²ФГБНУ «НИИОПП», Москва, Россия

³НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Одним из наиболее значимых факторов, предрасполагающих к развитию возрастной макулярной дегенерации (ВМД), считается старение, в процессе которого ключевую роль играют теломеры. Теломеры имеют большое значение в поддержании стабильности генома. **Цель:** выявление ассоциации относительной длины теломер клеток буккального эпителия и генетического варианта rs12778366 гена *SIRT1* с поздней стадией ВМД.

Материал и методы: в исследовании приняли участие 100 пациентов (200 глаз), 50 пациентов с ВМД (категория 4 AREDS) и 50 пациентов без ВМД. В исследовании использовалась геномная ДНК, выделенная из образцов буккального эпителия методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфного локуса rs12778366 гена *SIRT1* проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием технологии конкурирующих TaqMan-зондов. Анализ длины теломер выполняли методом ПЦР в реальном времени по взятому из литературы оригинальному протоколу (Cawthon, 2002) с использованием специфических праймеров. Относительную длину теломер оценивали по показателю T/S, который рассчитывали как отношение числа копий теломерных повторов к числу копий референсного гена.

Результаты: частота встречаемости аллеля C в основной группе составила 25,0%, тогда как в группе контроля — 14,0% ($p=0,049$). Частота встречаемости гетерозиготного генотипа TC в 2 раза выше в основной группе по сравнению с группой контроля ($p=0,045$). Гетерозиготный генотип TC в общей и доминантной моделях наследования является генетическим фактором предрасположенности к данному заболеванию, увеличивая риск его развития в 2,048 и 2,425 раза соответственно. Выявлено, что у пациентов с поздней стадией ВМД больше коротких теломер: 64,0% против 48% в группе контроля ($p=0,0002$).

Заключение: полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения полиморфного локуса гена *SIRT1* в ассоциации с длиной теломер на большей выборке пациентов, что в дальнейшем может позволить использовать эти молекулярные маркеры для оценки индивидуального прогноза развития ВМД и проведения профилактических мероприятий.

Ключевые слова: возрастная макулярная дегенерация, относительная длина теломер, rs12778366, ген *SIRT1*, возраст-ассоциированные заболевания, буккальный эпителий, генетическое исследование.

Для цитирования: Мошетьова Л.К., Дмитренко О.П., Абрамова О.И. и др. Ассоциация относительной длины теломер и генетического варианта гена *SIRT1* с возрастной макулярной дегенерацией. Клиническая офтальмология. 2021;21(3):143–146. DOI: 10.32364/2311-7729-2021-21-3-143-146.

Association between relative telomere length and a genetic variant of *SIRT1* gene and age-related macular degeneration

L.K. Moshetova¹, O.P. Dmitrenko², O.I. Abramova¹, N.S. Karpova², K.I. Turkina¹, I.N. Saburina^{2,3}

¹Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

²Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

³Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

One of the most important factors predisposing to the development of age-related macular degeneration (AMD) is aging. Telomeres are important for aging by maintaining genome stability.

Aim: to identify the association between relative telomere length of buccal epithelial cells and *SIRT1* rs12778366 genetic variation and late AMD.

Patients and Methods: 100 patients (200 eyes) were enrolled, i.e., 50 patients with AMD (AREDS category 4) and 50 patients without AMD. Genomic DNA isolated from buccal epithelial cells by phenol-chloroform extraction was used. Genotyping of *SIRT1* rs12778366 polymorphic locus was performed by TaqMan® real-time PCR. Telomere length was measured by real-time PCR as described earlier [Cawthon, 2002] using specific primers. Relative telomere length was assessed by the relative telomere to single-copy gene (T/S) ratio.

Results: the rate of allele C was 25% in the study group and 14% in the control group ($p=0.049$). The rate of heterozygotic TC genotype was twice higher in the study group compared to the control group ($p=0.045$). In heterozygotic carriers of the allele C of the *SIRT1* rs12778366 gene, the risk of AMD is 2.048- and 2.425-times higher in codominant and dominant inheritance pattern, respectively. In patients with late AMD, there are more short telomeres (64% vs. 48% in the control group, $p=0.0002$).

Conclusions: further studies of a polymorphic *SIRT1* gene locus in the association with telomere length in a larger sample are required. In the future, these molecular markers can be applied to predict the individual course of AMD and to implement preventive measures.

Keywords: age-related macular degeneration, relative telomere length, rs12778366, *SIRT1* gene, age-related diseases, buccal epithelium, genetic testing.

For citation: Moshetova L.K., Dmitrenko O.P., Abramova O.I. et al. Association between relative telomere length and a genetic variant of *SIRT1* gene and age-related macular degeneration. *Russian Journal of Clinical Ophthalmology*. 2021;21(3):143–146 (in Russ.). DOI: 10.32364/2311-7729-2021-21-3-143-146.

ВВЕДЕНИЕ

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — сложное многофакторное состояние, включающее в себя множество генетических, экологических и конституциональных факторов и характеризующееся поражением макулярной зоны сетчатки [1]. Согласно прогнозу W.L. Wong et al., опубликованному в 2014 г., это число будет расти по мере старения населения мира и к 2040 г. достигнет 288 млн человек [2].

Одним из наиболее значимых факторов, предрасполагающих к развитию ВМД, считается старение, в процессе которого на клеточном уровне ключевую роль играют теломеры. Их укорочение с возрастом рассматривается как существенный вклад в старение организма [3, 4]. Теломеры — это нуклеопротеиновые структуры, локализующиеся на концах эукариотических хромосом [5]. Хорошо известно, что теломеры постепенно укорачиваются при каждом делении клетки. Кроме того, причиной укорочения теломер может быть их повреждение в результате воздействия нуклеаз и других деструктивных факторов (активные формы кислорода, свободные радикалы) [6].

За последнее десятилетие ряд исследований продемонстрировали связь между геномной стабильностью, заболеваниями, ассоциированными с возрастом, и старением, которые опосредуются уровнем активности НАД⁺-зависимых ферментов, в том числе и *SIRT1* [7, 8]. *SIRT1* относится к семейству гистоновых деацетилаз III класса и обеспечивает гомеостаз теломер, индуцируя экспрессию белков теломеразы и шелтерина и регулируя образование гетерохроматина теломер [9]. Снижение НАД⁺ в процессе старения способствует инактивации *SIRT1*, что приводит к укорочению теломер и генетической нестабильности клеток [10]. В свою очередь, дисфункция теломер приводит к подавлению экспрессии *SIRT1* [11]. На функцию фермента *SIRT1* влияет экспрессия гена *SIRT1*, расположенного в 10-й хромосоме в области q21.3 [12]. Длина теломер, признанная многими исследователями биомаркером старения и ассоциированных с возрастом заболеваний, имеет значительные различия у разных людей и варьирует в разных популяциях [13, 14]. На сегодняшний день выявлено лишь несколько однонуклеотидных полиморфизмов, которые могут быть вовлечены в регуляцию длины теломер [15].

ВМД является распространенным полигенным заболеванием, при котором влияние генетических факторов объясняет до 71% варибельности заболевания [16]. По данным международного консорциума генома ВМД (The International AMD Genomics Consortium), на сегодняшний день идентифицировано 52 генетических варианта, локализованных в 34 локусах, ассоциированных с риском развития ВМД [17].

Мы предположили, что полиморфизм rs12778366 гена *SIRT1* может быть важной детерминантой развития ВМД и может участвовать в регуляции длины теломер.

Цель исследования: выявить ассоциацию относительной длины теломер клеток буккального эпителия и генетического варианта rs12778366 гена *SIRT1* с поздней стадией ВМД.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 100 пациентов (200 глаз), прошедших диагностическое обследование в офтальмологическом отделении ГБУЗ ГКБ им С.П. Боткина ДЗМ на клинической базе кафедры офтальмологии РМАНПО. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» и соответствовало рекомендациям STREGA (Strengthening the reporting of genetic association studies) [16].

Критерии включения в основную группу: наличие диагноза «ВМД поздней стадии («сухой» или «влажной» формы)» и возраст старше 45 лет. **Критерии включения в контрольную группу:** отсутствие диагноза в анамнезе в аналогичном возрасте. **Критерием исключения** для обеих групп было наличие острых и хронических заболеваний в стадии обострения органов зрения, глаукомы, увеита различной этиологии, полной осложненной катаракты, отслойки сетчатки, рубцеоза радужки. Также в исследование не включались пациенты с аутоиммунными и онкологическими процессами любой локализации.

В исследовании использовалась геномная ДНК, выделенная из образцов буккального эпителия методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфного локуса rs12778366 гена *SIRT1* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием технологии конкурирующих TaqMan-зондов в лаборатории регенерации репаративных процессов ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии». Анализ длины теломер проводился методом ПЦР в реальном времени по оригинальному протоколу (Cawthon, 2002), с использованием специфических праймеров. Относительную длину теломер (ОДТ) оценивали по показателю T/S, который рассчитывали как отношение числа копий теломерных повторов к числу копий референсного гена.

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета GNU PSPP version 1.2.0 (Free Software Foundation, USA) и Microsoft Office Excel 2016. Проверка нормальности распределения признаков проводилась с использованием теста Колмогорова — Смирнова. Количественные данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений ($M \pm SD$). При нормальном распределении параметров использовался однофакторный дисперсионный анализ (One Way ANOVA). Значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для непрерывных переменных и критерия χ^2 для категориальных переменных. Для сравнения непараметрических данных между двумя группами использовался критерий Манна — Уитни. Уровень значимости считался достоверным при $p < 0,05$. Частотные характеристики генотипов и аллелей представлены в абсолютных числах и процентах. Для определения достоверности между сравниваемыми группами по частотным характеристикам генотипов и аллелей исследуемого полиморфизма применяли тесты на соблюдение равновесия Харди — Вайнберга и выявление ассоциаций в программе DeFinetti. Сила

Таблица 1. Ассоциация полиморфизма rs12778366 в гене *SIRT1* с риском развития ВМД
Table 1. Association between rs12778366 polymorphism of *SIRT1* gene and the risk of AMD

Полиморфизм гена <i>SIRT1</i> <i>SIRT1</i> gene polymorphism	Модель наследования Inheritance pattern	Генотипы и аллели Genotypes and alleles	Основная группа Study group n (%)	Группа контроля Control group n (%)	ОШ OR	ДИ 95% 95% CI	P
rs12778366	Общая Codominant	ТТ	27 (54,0)	37 (74,0)	0,365	0,031–4,233	0,403
		ТС	21 (42,0)	12 (24,0)	2,398	1,009–5,699	0,045
		СС	2 (4,0)	1 (2,0)	2,741	0,236–31,79	0,403
		Т	75 (75,0)	86 (86,0)	0,488	0,237–1,007	0,049
		С	25 (25,0)	14 (14,0)	2,048	0,993–4,223	0,049
	Доминантная Dominant	ТТ/ТС+СС	27/23	37/13	2,425	1,045–5,626	0,037
	Рецессивная Recessive	ТТ+ТС/СС	48/2	49/1	0,490	0,043–5,582	0,558

ассоциации анализируемых признаков определялась с помощью величины отношения шансов (ОШ) с доверительным интервалом (ДИ) при 95% уровне значимости. Предполагаемый фактор риска считался значимым при значении показателя ОШ больше единицы с поправкой на ДИ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В основную группу вошли 50 пациентов с диагнозом «ВМД, поздняя стадия (категория 4 AREDS)», из них 37 женщин (74,0%) и 13 мужчин (26,0%) в возрасте от 47 до 82 лет (средний возраст 70,32±9,2 года). Контрольную группу составили 50 пациентов без ВМД — 38 женщин (76,0%) и 13 мужчин (24,0%) в возрасте от 46 до 85 лет (средний возраст 65,86±10,22 года).

Пациенты контрольной группы были моложе пациентов с ВМД ($p < 0,012$). По полу группы были сопоставимы ($p = 0,05$).

Проведенный анализ полиморфизма rs12778366 в гене *SIRT1* позволил оценить частоту встречаемости аллелей и генотипов полиморфного локуса исследуемого гена у пациентов с ВМД. Выявлено, что частота встречаемости аллеля С в основной группе составила 25,0%, тогда как в группе контроля — 14,0% ($p = 0,049$). Частота встречаемости гетерозиготного генотипа ТС в 2 раза выше в основной группе по сравнению с группой контроля ($p = 0,045$). При анализе ассоциаций установлена взаимосвязь полиморфизма rs12778366 гена *SIRT1* с ВМД. Так, гетерозиготный генотип ТС является генетическим фактором предрасположенности к данному заболеванию, увеличивая риск его развития в 2,048 в общей модели наследования и в 2,425 раза — в доминантной. Результаты представлены в таблице 1.

ОДТ клеток буккального эпителия у пациентов основной группы составила 0,75±0,06, в группе контроля — 0,84±0,14 ($p = 0,274$). Медиана относительной длины теломер в контрольной группе составила 0,814. Исходя из этого, пациенты с длиной теломер ниже этого показателя были отнесены к группе коротких теломер, в группу длинных теломер были включены те, у кого этот показатель превышал медианное значение.

Анализ распределения теломер по длине между основной и контрольной группами показал статистически значимые различия: пациентов с короткими теломера-



Рис. 1. Распределение теломер по длине у пациентов основной и контрольной групп

Fig. 1. Distribution of telomeres by length in the groups

ми было больше в основной группе (64,0%), чем в группе контроля (48,0%), $p = 0,0002$ (рис. 1).

Пациенты основной группы в зависимости от ОДТ были разделены на 2 подгруппы. В подгруппу I вошли пациенты с длинными теломерами, подгруппу II составили пациенты с короткими теломерами. Анализ частотного распределения генотипов и аллелей полиморфизма rs12778366 гена *SIRT1* в подгруппах показал, что частота встречаемости аллеля С выше в подгруппе II по сравнению с подгруппой I (26,8% и 1,7% соответственно, $p = 0,013$) (табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании проводился анализ ОДТ, изучались частотные характеристики генотипов и аллелей однонуклеотидного полиморфизма rs12778366 гена *SIRT1* у пациентов с поздней стадией ВМД в сравнении со здоровыми пациентами. Выбранный нами полиморфизм впервые изучался в ассоциации с длиной теломер в российской популяции. Проведенное исследование показало наличие ассоциации полиморфного локуса rs12778366 гена *SIRT1* с риском развития ВМД у гетерозиготных носителей аллеля С. Выявлено,

Таблица 2. Распределение генотипов и аллелей полиморфизма rs12778366 гена *SIRT1* у пациентов основной группы с длинными и короткими теломерами

Table 2. Distribution of genotypes and alleles of rs12778366 polymorphism of *SIRT1* gene in study group patients with long and short telomeres

Полиморфизм гена <i>SIRT1</i> <i>SIRT1</i> gene polymorphism	Генотипы и аллели Genotypes and alleles	Подгруппа I Subgroup I n (%)	Подгруппа II Subgroup II n (%)	P
rs12778366	TT	6 (66,7)	21 (51,2)	0,082
	TC	3 (33,3)	18 (43,9)	
	CC	0	2 (4,9)	
	T	15 (83,3)	60 (73,2)	0,013
	C	3 (1,7)	22 (26,8)	

что у пациентов с поздней стадией ВМД более короткие теломеры. Также установлено, что у носителей аллеля С теломеры короче, что может свидетельствовать о более раннем репликативном старении лиц, страдающих данной патологией.

Основным ограничением этого исследования является небольшой размер выборки. Тем не менее полученные нами данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения выбранного нами полиморфного локуса гена *SIRT1* в ассоциации с длиной теломер на большей выборке пациентов, что в дальнейшем может позволить использовать эти молекулярные маркеры в качестве критерия оценки индивидуального прогноза развития ВМД и для проведения эффективных профилактических мероприятий.

Литература/References

- Аветисов С.Э., Егоров Е.А., Мошетова Л.К. и др. Офтальмология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019. [Avetisov S.E., Egorov E.A., Moshetova L.K. et al. Ophthalmology. National Leadership. M.: GEOTAR-Media; 2019 (in Russ.).]
- Wong W.L., Su X, Li X. et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2014;2(2):e106-116. DOI: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.
- Victorelli S., Passos J.F. Telomeres and Cell Senescence — Size Matters Not. *EBioMedicine*. 2017;21:14-20. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.03.027.
- McHugh D., Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol*. 2018;217(1):65-77. DOI: 10.1083/jcb.201708092.
- Slawińska N., Krupa R. Molecular Aspects of Senescence and Organismal Ageing-DNA Damage Response, Telomeres, Inflammation and Chromatin. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):590. DOI: 10.3390/ijms22020590.
- Srinivas N., Rachakonda S., Kumar R. Telomeres and Telomere Length: A General Overview. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):558. DOI: 10.3390/cancers12030558.
- Sun C., Wang K., Stock A.J. et al. Re-equilibration of imbalanced NAD metabolism ameliorates the impact of telomere dysfunction. *EMBO J*. 2020;39(21):e103420. DOI: 10.15252/embj.2019103420.
- Chini C.C.S., Tarragó M.G., Chini E.N. NAD and the aging process: Role in life, death and everything in between. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;455:62-74. DOI: 10.1016/j.mce.2016.11.003.
- Osum M., Serakinci N. Impact of circadian disruption on health; SIRT1 and Telomeres. *DNA Repair (Amst)*. 2020;96:102993. DOI: 10.1016/j.dnarep.2020.102993.
- Lee S.H., Lee J.H., Lee H.Y., Min K.J. Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB Rep*. 2019;52(1):24-34. DOI: 10.5483/BMBRep.2019.52.1.290.
- Amano H., Chaudhury A., Rodriguez-Aguayo C. et al. Telomere Dysfunction Induces Sirtuin Repression that Drives Telomere-Dependent Disease. *Cell Metab*. 2019;29(6):1274-1290.e9. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.03.001.
- Chen Z., Zhai Y., Zhang W. et al. Single Nucleotide Polymorphisms of the Sirtuin 1 (*SIRT1*) Gene are Associated With age-Related Macular Degeneration in Chinese Han Individuals: A Case-Control Pilot Study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(49):e2238. DOI: 10.1097/MD.0000000000002238.
- Gorenjak V., Akbar S., Stathopoulou M.G., Visvikis-Siest S. The future of telomere length in personalized medicine. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018;23:1628-1654. DOI: 10.2741/4664.
- Fasching C.L. Telomere length measurement as a clinical biomarker of aging and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2018;55(7):443-465. DOI: 10.1080/10408363.2018.1504274.

- Protsenko E., Rehkopf D., Prather A.A. et al. Are long telomeres better than short? Relative contributions of genetically predicted telomere length to neoplastic and non-neoplastic disease risk and population health burden. *PLoS One*. 2020;15(10): e0240185. DOI: 10.1371/journal.pone.0240185.

Сведения об авторах:

¹Мошетова Лариса Константиновна — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующая кафедрой офтальмологии; ORCID iD 0000-0002-5899-2714.

²Дмитренко Ольга Павловна — мл. научный сотрудник; ORCID iD 0000-0002-2067-0971.

¹Абрамова Ольга Игоревна — аспирант кафедры офтальмологии; ORCID iD 0000-0002-6156-6126.

²Карпова Наталья Сергеевна — мл. научный сотрудник; ORCID iD 0000-0001-6391-4908.

¹Туркина Ксения Ивановна — к.м.н., доцент кафедры офтальмологии; ORCID iD 0000-0002-4989-7467.

^{2,3}Сабурина Ирина Николаевна — д.б.н., профессор; ORCID iD 0000-0003-2014-2535.

¹ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России. 123995, Россия, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1.

²ФГБНУ «НИИОПП». 125315, Россия, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

³НИИ молекулярной и персонализированной медицины, ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России. 125284, Россия, г. Москва, 2-й Боткинский пр-д, д. 7, корп. 2.

Контактная информация: Абрамова Ольга Игоревна, e-mail: abramovao2019@mail.ru.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует.

Статья поступила 11.05.2021.

About the authors:

¹Larisa K. Moshetova — D. Sc. (Med.), Professor, Full-Member of the Russian Academy of Sciences, Honored Doctor of Russian Federation, President of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Head of the Department of Ophthalmology; ORCID iD 0000-0001-5081-414X.

²Olga P. Dmitrenko — junior researcher; ORCID iD 0000-0002-2067-0971.

¹Olga I. Abramova — postgraduate student of the Department of Ophthalmology; ORCID iD 0000-0002-6156-6126.

²Natalya S. Karpova — junior researcher; ORCID iD 0000-0001-6391-4908.

¹Ksenia I. Turkina — C. Sc. (Med.), associate professor of the Department of Ophthalmology; ORCID iD 0000-0002-4989-7467.

^{2,3}Irina N. Saburina — D. Sc. (Biolog.), Professor; ORCID iD 0000-0003-2014-2535.

¹Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. 2/1, Barrikadnaya str., Moscow, 125993, Russian Federation.

²Research Institute of General Pathology and Pathophysiology. 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russian Federation.

³Research Institute of Molecular and Personalized Medicine. 7 Build, 2, 2nd Botkinskiy pass., Moscow, 125284, Russian Federation.

Contact information: Olga I. Abramova, e-mail: abramovao2019@mail.ru.

Financial Disclosure: no authors have a financial or property interest in any material or method mentioned.

There is no conflict of interests.

Received 11.05.2021.