

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

KRISTĖ KAIKARYTĖ

***SIRT1* rs3758391 ir rs3818292 geno polimorfizmų sąsajos su amžinės geltonosios
dėmės pasireiškimu**

Genetikos magistrinių studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas LSMU NI
Oftalmologijos laboratorijoje

Darbo vadovė
Doc. dr. Rasa Liutkevičienė

Vilnius 2020

TURINYS

SANTRUMPOS.....	3
ĮVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1. Amžinė geltonosios dėmės degeneracija	6
1.2. Tinklainės pokyčiai, patogenezė.....	7
1.3. AGDD rizikos veiksniai.....	8
1.4. AGDD genetiniai veiksniai.....	9
1.5. SIRT baltymų šeima	11
1.6. SIRT1	11
1.7. SIRT1 ir akių ligos.....	12
1.8. SIRT1 sąsaja su AGDD	13
2. TYRIMO METODIKA.....	15
2.1. Tyrimo planavimas	15
2.2. Tyrimo objektas	15
2.3. Tiriamųjų atranka.....	15
2.4. Tyrimo metodai.....	16
2.4.1. Deoksiribonukleininės rūgšties išskyrimas	16
2.4.2. DNR koncentracijos matavimas spektrofotometru	19
2.4.3. VNP nustatymas tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu.....	20
2.5. Statistinė analizė	22
3. REZULTATAI.....	24
3.1. <i>SIRT1</i> rs3818292 ir rs3758391 įtaka pradinei ir eksudacinei AGDD pasireikšti.....	25
3.2. <i>SIRT1</i> rs3818292 ir rs3758391 įtaka pradinei ir eksudacinei AGDD pasireikšti pagal tiriamųjų lytį	28
3.3. <i>SIRT1</i> rs3818292 ir rs3758391 įtaka pradinei ir eksudacinei AGDD pasireikšti pagal amžiaus grupes	34
4. REZULTATŲ APTARIMAS	38
IŠVADOS	42
LITERATŪROS SĄRAŠAS	45
PRIEDAI.....	54
PUBLIKACIJOS.....	59

SANTRUMPOS

LSMU – Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

NI – Neuromokslų institutas

AGDD – amžinė geltonosios dėmės degeneracija

DNR – deoksiribonukleininė rūgštis

EDTA – etilendiamintetraacetatas

GWAS – (*angl. Genome Wide Association Study*) viso genomo sąsajų studija

TL-PGR – tikro laiko polimerazės grandininė reakcija

TPE – tinklainės pigmentinis epitelis

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas

AIK – (*angl. Akaike information criterion*) – Akaike informacijos kriterijus

GS – galimybių santykis

HVD – (*angl. Hardy-Weinberg equilibrium*) Hardžio-Veinbergo dėsnis

IVADAS

Amžinė geltonosios dėmės degeneracija (AGDD) – tai progresuojanti neurodegeneracinė akių liga, kuri pažeidžia tinklainėje esančią geltonosios dėmės sritį. Tai už centrinį matymą atsakinga dalis. Žmogui senstant geltonojoje dėmėje atsiranda pataloginių pokyčių. Ląstelės pradeda keistis ir nykti. Dėl šios priežasties suprastėja matomas vaizdas. Palaipsniui, ligai progresuojant, įvykę pažeidimai gali paskatinti visišką regos praradimą. AGDD yra viena iš pagrindinių aklumo atsiradimo priežasčių išsivysčiusiose šalyse tarp vyresnio amžiaus žmonių. Liga diagnozuojama 10 % žmonių, kurie yra vyresni nei 65 metai, taip pat daugiau nei 25 % žmonių, kuriems daugiau nei 75 metai. Globaliai dėl didėjančio populiacijos amžiaus spėjama, kad 2040 metais AGDD sergančių žmonių skaičius padidės iki 288 milijonų. AGDD ligos etiologija ir patofiziologija yra nulemta daugybės veiksnių, apimančių platų metabolinį, aplinkos ir genetinį spektrą. Tačiau šie mechanizmai nėra visiškai išstudijuoti, dėl to nėra sukurti optimalūs gydymo metodai (Wong et al. 2014). Vis naujesni tyrimai ir jų rezultatai praplečia mūsų suvokimą apie šią ligą bei jos procesus.

Pastaruoju metu didelis dėmesys kreipiamas į genetiką. Genetiniai tyrimai ir konsultavimas yra efektyvus įrankis modernioje medicinoje. Siekiant netolimoje ateityje tiksliai nuspėti AGDD ligos progresavimą, jo greitį bei atsakus į tam tikrus gydymo metodus, tobulinamos genetikos technologijos. Tai leidžia identifikuoti naujus su AGDD susijusių genų variantus ir vykdyti plačią naujų genų kandidatų analizę (Lambert et al. 2016).

SIRT1 genų šeima priklauso histonų deacetilazėms (*angl. HDAC*). Histonų deacetilazės – tai svarbūs epigenetiniai reguliatoriai, kurie pasižymi histonų ir nehistonų deacetiliniu. SIRT1 genas siejamas su metabolizmu, senėjimo, uždegiminiais ir vėžiniais procesais, mažai kaloringa dieta, genų transkripcijos nutildymu (*angl. transcriptional silencing*), chromosomų stabilumu, atsaku į stresą, ląstelių diferenciacija, apoptoze, DNR taisymu. Atlikti tyrimai pažymi SIRT1 sąsają tiek su akimis, tiek su pačia AGDD (Zhou, Luo and Zhang 2018, Longo and Kennedy 2006).

Šio darbo tikslas – nustatyti vieno nukleotido polimorfizmą (VNP) *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 sąsajas su amžinės geltonosios dėmės pasireiškimu.

Uždaviniai:

1. Nustatyti vieno nukleotido polimorfizmus *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 tiriamiesiems ir įvertinti jų įtaką pradinės ir eksudacinės AGDD pasireiškimui.
2. Įvertinti vieno nukleotido polimorfizmą *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 įtaką pradinės ir eksudacinės AGDD pasireiškimui pagal tiriamųjų lytį.

3. Įvertinti vieno nukleotido polimorfizmų *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 įtaką pradinės ir eksudacinės AGDD pasireiškimui pagal amžiaus grupes.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Amžinė geltonosios dėmės degeneracija

AGDD yra lėtinė progresuojanti akių liga, kada pažeidžiama centrinėje tinklainėje esanti geltonoji dėmė (makula). Tai pati jautriausia tinklainės dalis, esanti akies užpakalinėje dalyje (Al-Zamil and Yassin 2017, Taylor et al. 2016). Žmogaus makulą sudaro milijonai šviesai jautrių ląstelių. Šios ląstelės užtikrina centrinį matymą (Provis et al. 2005). Tinklainė paverčia šviesą į elektrinius signalus ir nusiunčia juos per optinį nervą į smegenis. Smegenyse elektriniai signalai paverčiami vaizdais, kuriuos mes regime. Dėl šios priežasties mes galime atlikti įvairius kasdienes darbus: skaityti, rašyti, atpažinti kitų žmonių veidus ir t. t. (Masland 2001). Mums senstant geltonojoje dėmėje įvyksta patologinių pokyčių. Už šviesą atsakingos ląstelės pradeda keistis ir degraduoti, kaupiasi jų irimo produktai. Dėl to pablogėja žmogaus centrinis matymas, jis pradeda matyti nelygias linijas, susiliejusius vaizdus, nerealaus bei nepastovaus dydžio objektus. Taip pat išryškėja pilkos arba juodos dėmės. Regos skirtumai sergant ir nesergant AGDD pavaizduoti 1.1 paveiksle. Šios tinklainės geltonosios dėmės funkcionavimo pažeidimas sukelia AGDD ligą (Hoon 2014, Boyer et al. 2017). Tai viena iš pagrindinių aklumo atsiradimo priežasčių vakarų šalyse. Pažengusios AGDD paplitimo dažnis populiacijoje yra 1,3 % (Wong et al. 2014).

Išskiriami įvairūs pradiniai AGDD patologiniai pokyčiai: drūzų formavimasis tinklainėje, tinklainės pigmentinio epitelio ir Bruchio membranos pažeidimai, naujadarių kraujagyslių atsiradimas (Crabb 2014, Cukras et al. 2010, Tikellis et al. 2007). Vėliau šios išraiškos progresuoja į centrinės duobutės geografinę atrofiją arba į gyslainės neovaskulizaciją (Finger et al. 2014, Joachim et al. 2013). Iki šiol šiai ligai nėra pritaikyta efektyvių gydymo metodų (Taylor et al. 2016).

Šio darbo tikslas – nustatyti galimas vieno nukleotido polimorfizmų (VNP) *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 sąsajas su amžinės geltonosios dėmės pasireiškimu Lietuvos populiacijoje. Siekiant praplėsti žinias apie AGDD ligos patogenezę, naudinga tirti vis daugiau VNP ir jų įtaką šiai ligai.



1.1 pav. Regos skirtumai nesergant ir sergant AGDD:

A – normali rega, B – AGDD pažeista rega

(<http://www.shinagawa.com.sg/en/services/age-related-macular-degeneration>).

1.2. Tinklainės pokyčiai, patogenezė

AGDD yra daugiaveiksni liga. Dėl šios priežasties negalime išskirti vieno pagrindinio patologinio pokyčio, kuris indikuotų šios ligos pasireiškimą. Tačiau žinoma, kad tiek ankstyvosios, tiek vėlyvosios ligos vystymesi yra svarbūs tinklainės pigmentinio epitelio (TPE) ir Brucho membranos pažeidimai, kurie daro įtaką drūzų atsiradimui (Al-Zamil and Yassin 2017, Taylor et al. 2016, Cukras et al. 2010, Tikellis et al. 2007).

TPE yra nesidalijanti ląstelė, kuri pasižymi keliomis fotoreceptorinių ląstelių palaikymo funkcinėmis reikšmėmis. TPE ląstelės ekspresuoja medžiagas, kurias natūraliai saugo gyslainėje esantis choriokapiliarinis sluoksnis (Sparrow et al. 2010). Organizmui senstant TPE ekspresuojamos medžiagos nesuardomos, todėl kaupiasi. Dėl šios priežasties pažeidžiamas Brucho membranos laidumas (Ao et al. 2018). Tokiu būdu tinklainėje tarp TPE ir Brucho membranos sluoksnių pradeda kauptis drūzos. Tai gelsvos baltyminės sudėties ir neląstelinės kilmės polimorfinių medžiagų sankaupos (Hoon 2014, Boyer et al. 2017).

Žinoma, kad jas sudaro iki 129 skirtingų baltymų (Al-Zamil and Yassin 2017). Geltonojoje dėmėje susiformavusios drūzos yra pagrindinis AGDD požymis (Crabb 2014, Kijlstra and Berendschot 2015, Curcio 2018, Klein 2015). Vėliau liga progresuoja, įvyksta TPE atšoka (Gass et al. 2003). Dėl to pradeda irti fotoreceptorinės ląstelės. Kiti patologiniai pokyčiai stebimi Brucho membranoje. Šioje vietoje pradeda formuotis nereikalingos gyslainės kraujagyslės. Jos yra plonos, todėl iš jų besisunkiantis skystis gali jas lengvai

praplėsti. Dėl šios priežasties akyje atsiranda kraujosruvų (Agarwal et al. 2015, Wang and Hartnett 2016).

Nėra išstudijuota ligos prieš tai išvardytų požymių patofiziologija. Išskiriamos kelios AGDD ligos formos: pradinė ir vėlyvoji. Pradinė AGDD forma dar papildomai klasifikuojama į pradinę lengvą ir pradinę vidutinę. Vėlyvoji AGDD yra klasifikuojama į du pagrindinius tipus: sausąją (atrofinę) ir šlapiąją (eksudacinę) (Al-Zamil and Yassin 2017, Taylor et al. 2016). Ši ligos klasifikacija paremta ligos simptomų ir požymių sunkumu. Vertinami drūzų skaičius ir dydis, hipo ar hiperpigmentiniai pakitimai ir gyslainės neovaskulizacija (Pennington and DeAngelis 2016).

Šiame darbe tiriamos dvi AGDD sergančių žmonių grupės: pradinė ir eksudacinė. Pradinė AGDD yra dažniausiai pasireiškianti forma. Ji diagnozuojama apie 90 % visų šios ligos atvejų. Jos metu susiformuoja geografinė atrofija ir prieš tai paminėti TPE pažeidimai. Suprastėja žmogaus centrinis matymas (Tikellis et al. 2007). Kita AGDD forma – šlapioji (eksudacinė), siejama su daug spartesniu ligos progresu, kuris veda prie apakimo. Ji pasireiškia rečiau už pradinę ligos formą (apie 10–20 %). Eksudacinės formos požymiai yra choriokapiliarinių kraujagyslių suaugimai iš gyslainės ir tinklainės pigmentinio epitelio atšokos (Agarwal et al. 2015, Wang and Hartnett 2016, Al-Zamil and Yassin 2017).

1.3. AGDD rizikos veiksniai

AGDD – daugiaveiksnės etiologijos liga. Nėra nustatyto vieno pagrindinio rizikos veiksnio, kodėl ji pasireiškia. AGDD išsivystymo rizikos spektras apima tiek aplinkos, tiek genetinius veiksnius (Bora et al. 2015, Heesterbeek et al. 2020, Lambert et al. 2016). Pagrindiniai AGDD rizikos veiksniai ir jų koreliacija su liga pateikti 1.1 lentelėje (Al-Zamil and Yassin 2017).

Vis dėlto teigiama, kad pažengusiai AGDD ligai pasireikšti didžiausią įtaką turi amžius. Taip yra dėl to, jog ilgėja žmonių gyvenimo trukmė. Neurodegeneracinės ligos tampa rimta problema sveikam senėjimui (Guarente 2011). Naujausia metaanalizė (*angl. meta-analysis*), pagrįsta keturiolikos populiacijų moksliniais darbais, parodė skirtingų AGDD formų paplitimą tarp europiečių, priklausomai nuo amžiaus. Pradinė AGDD pasireiškia 3,5 % pacientų, kuriems yra 55–59 metai, ir 17,6 %, kuriems yra daugiau nei 85 metai. Vėlyvosios AGDD paplitimo dažniai padidėja nuo 0,1 % iki 9,8 % atitinkamai (Colijn et al. 2017).

Kitas reikšmingos įtakos turintis rizikos veiksnys – rūkymas. Nustatyta, kad rūkantiems pacientams, kuriems daugiau nei 40 metų, yra 2–4 kartus didesnė rizika išsivystyti AGDD negu tiems, kurie nerūko (Al-Zamil and Yassin 2017). Papildomai yra atlikta daug nepriklausomų tyrimų, siejančių AGDD ligos pasireiškimą su padidėjusiu kraujo spaudimu, aspirino vartojimo, saulės šviesos įtaka, atlikta kataraktos operacija, moteriška lytimi (Klein et al. 2012, Khan and Gurunadh 2014, Saraf et al. 2015). Pažymėtina, kad moterys yra labiau linkusios sirgti AGDD nei vyrai (McGuinness et al. 2016).

1.3.1 lentelė. Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos rizikos veiksniai (Al-Zamil and Yassin 2017)

Rizikos faktoriai	Sąsaja su AGDD
Amžius	Labai stipri
Rūkymas	
Atlikta kataraktos operacija	
Teigiama šeiminė anamnezė	
Genetiniai veiksniai	
Kūno masės indeksas	Reguliuojama
Širdies ligų anamnezė	
Hipertenzija	
Lytis	Silpna
Etninė grupė	
Diabetas	

1.4. AGDD genetiniai veiksniai

Per pastarąjį dešimtmetį pastebimas reikšmingas genetinis ryšys su AGDD patogeniniu mechanizmu. Vis daugiau dėmesio skiriama naujų genetinių žymenų paieškai ir jų sąsajai su AGDD (Fritsche et al. 2014). Pirmieji genetikos tyrimai sergant AGDD plačiai aprašyti dar 1990 metais. Jie paremti dvynių tyrimais. Vykdyti darbai parodė, kad monozygotiniai dvyniai pasižymi didesne tikimybe susirgti AGDD nei dizigotiniai dvyniai. Taip pat teigiama, kad paciento šeiminė anamnezė daro didelę įtaką AGDD pasireikšti. Palyginti su bendra populiacija, sergančių individų giminės yra linkusios nuo 3 iki 6 kartų dažniau susirgti AGDD (Klein et al. 1994, Meyers et al. 1995). Taigi, pirmieji atlikti

moksliniai darbai pateikė statistiškai reikšmingų įrodymų, kad genetiniai veiksniai turi įtakos AGDD ligai pasireikšti. Vėlesni tyrimai identifikavo daugybinius lokusus, siejamus su AGDD. Šie lokusai yra pabirę per visą žmogaus genomą. Siekiant nustatyti kuo daugiau genų, buvo tobulinamos genotipavimo technologijos. Šiuo metu vykdomi visuotinio genomo tyrimai – GWAS (*angl. genome-wide association study*), tai yra galinga laboratorinė technologija, kuri leidžia tirti daug susijusių genetinių variantų skirtingiems individams. Tiriant dideles pacientų populiacijas ir naudojant GWAS įrodyta, kad kompleksinėse ligose, tokiose kaip AGDD, veikia daugiau nei vienas jautrus lokusas. Ši technologija, paremta stipriomis statistinėmis metodologijomis, leido identifikuoti tikslius genetinius intervalus, esančius chromosomose ir suteikiančius daugiau informacijos apie molekulinės genetikos aspektus sergant AGDD (Yan et al. 2018). Didžiausias su AGDD siejamas genetinio proveržio tyrimas atliktas 2005 metais. Jis išryškino AGDD ligos sąsajas su komplemento sistema. Komplemento kelias yra pradinė fermentinė eskada, susidedanti iš įvairių baltymų, svarbių sustiprinti įgimtą bei įgytą imunitetą ir veikti kaip imuninių atsakų mediatoriai (Edwards et al. 2005). Prieš tai minėta, kad pagrindiniu AGDD požymiu laikomos drūzos, sudarytos iš baltymų (Crabb 2014, Kijlstra and Berendschot 2015, Curcio 2018). Šis faktas paskatino tirti komplemento sistemą. Nustatyta, kad AGDD siejama su keliais komplemento faktoriaus H *CFH* geno variantais. Šiuo metu *CFH* yra daugiausia ištirtas genas. Jis yra glikoproteino serumas, daugiausia produkuojamas kepenyse. Jis slopina alternatyvių komplemento kelių aktyvaciją. Dideli komplemento faktoriaus H kiekiai buvo nustatyti TPE su susiformavusiomis drūzomis. Dėl šios priežasties jis siejamas su padidėjusia rizika AGDD ligai pasireikšti (Edwards et al. 2005, Chou et al. 2016). Kiti tyrimai atskleidė AGDD ligos sąsajas su *ARMS2* (*angl. age-related maculopathy susceptibility 2*) ir *CFB/C2* genais, esančiais atitinkamai 10q26 ir 6p21.3 (Chakravarthy et al. 2013, Sun et al. 2012). Dar vieni genetiniai variantai stipriai susiję su AGDD yra *LIPC* geno, dalyvaujančio didelio tankio lipoproteinų cholesterolio metabolizme, polimorfizmas, *toll-like 3* receptoriuose *TLR3* įvykęs vieno nukleotido polimorfizmas VNP rs3775291 ir metalloproteinazės 3 audinių inhibitoriai *TIMP3* (*angl. the tissue inhibitor of metalloproteinase 3*) (Reynolds et al. 2010, Ma et al. 2016, Ardeljan et al. 2013). Kiti genai, įtraukti į komplemento kaskadą, taip pat tyrinėjami. Šiuo metu identifiukuoti 34 genetiniai lokusai, įskaitant 52 genų variantus, kurie susiję su AGDD. Atlikus viso genomo tyrimą, nustatyti keli genų variantų rinkiniai, esantys skirtingose chromosomose, įskaitant 1, 6 ir 10 chromosomas. Šie genai reguliuoja ekstraląstelinę matriksą, dalyvauja lipidų apykaitoje ir komplemento sistemoje (Fritsche et al. 2016).

Išanalizavus mokslinę literatūrą, nebuvo rasta jokių tyrimų, susijusių su *SIRT1* geno rs3818292 ir rs3758391 polimorfizmų įtaka sirgti AGDD. Žinoma, kad rs3818292 yra *SIRT1* introno variante. Tai reiškia, kad šis polimorfizmas gali keisti geno splaisingo procesus, dėl to turėti įtakos genų ekspresijos raiškai (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3818292>). Kitas *SIRT1* polimorfizmas rs3758391 yra promotoriuje. Polimorfizmai, kurių randama šioje genų srityje, yra atsakingi už genų raiškos reguliavimą. Tai yra – ją slopinti arba aktyvinti (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3758391>).

1.5. SIRT baltymų šeima

Sirtuinai (SIRT) priklauso histonų deacetilazėms (*angl. HDAC*). Histonų deacetilazės – svarbūs epigenetiniai reguliatoriai, kurie pasižymi histonų ir nehistonų deacetilinimu. Šie baltymai yra evoliuciškai konservatyvūs: identifikuojami nuo bakterijų iki žmogaus.

Žmonių deacetilazės, pagal priklausomybę nuo tam tikrų kofaktorių, skirstomos į keturias klases. SIRT priklauso III klasei. Tai konservatyvi, nuo nikotinamido adenino dinukleotido (NAD⁺) priklausoma Sir2 deacetilazių šeima. NAD⁺ kofaktorius reikalingas šių baltymų fermentiniam aktyvumui. Priklausomybė nuo NAD⁺ parodo, kad SIRT aktyviai dalyvauja senėjimo procesų metabolizme. Tai jie daro įvairiais būdais: slopina nuo amžiaus priklausomus telomerų trumpėjimo procesus, palaiko genomo vientisumą ir aktyvina DNR pataisos mechanizmus. Papildomai SIRT dalyvauja molekuliniuose gyvenimo trukmės reguliaciniuose keliuose, įskaitant insulino/IGF-1 signoliniame kelyje, AMP aktyvuotą baltymų kinazę ir FOXO (*angl. forkhead box protein O*) baltymus (Lee et al. 2019).

Pirmi šių deacetilazių tyrimai buvo atlikti su mielėmis. Nustatyta, kad Sir2, kitaip žinomas kaip tylusis informacijos reguliatorius (*angl. silent information regulator*), prailgina gyvenimo trukmę *Saccharomyces cerevisiae* mielių rūšyje. Nuo to laiko pradėti tirti kiti Sir2 homologai. Šiandien yra žinomi septyni žinduolių sirtuinų nariai – *SIRT1-7*. Iš visų homologų sirutinas 1 (SIRT1) yra daugiausia ištirta žmogaus izoforma (Gray and Ekström 2001).

1.6. SIRT1

Žmogaus SIRT1 baltymas susideda iš 747 aminorūgščių (Autiero et al. 2008). Teigiama, kad šis baltymas yra didžiausias iš visų homologų. SIRT1 pasižymi lanksčia

nepastovia struktūra ir prailgintomis N- ir C- terminalinėmis sekomis. Šios savybės suteikia daugiau vietų vykti įvairiai moduliacijai. Tokioms kaip: transkriptinės ir potranskriptinės modifikacijos, aktyvios sąryšos su baltymais ir ligandais (Davenport et al. 2014).

SIRT1 atsakingas už įvairius fiziologinius ir patologinius organizmo procesus. Šis baltymas kontroliuoja daugelį transkripcijos faktorių ir kofaktorių, kurie daro įtaką genų ekspresijai (Huhtiniemi et al. 2006). Taip pat sumažina oksidacinio streso ir su juo susijusios žalos poveikį. SIRT1 papildomai siejamas su metabolizmo, senėjimo, uždegiminiais ir vėžiniais procesais, mažai kaloringa dieta, genų transkripcijos nutildymu (*angl. transcriptional silencing*), chromosomų stabilumu, atsaku į stresą, ląstelių diferenciacija, apoptoze, DNR pažaidų taisymu (Zhou et al. 2018, Longo, V. D., Kennedy, B. K. 2006).

1.7. SIRT1 ir akių ligos

Naujausi moksliniai darbai parodė svarbų SIRT1 vaidmenį tinklainės ir akies struktūrų senėjime (Balaiya et al. 2017). Žinoma, kad visi sirutiniai, išskyrus SIRT5, aptinkami tinklainėje (Sidorova-Darmos et al. 2014). Šis faktas paskatino gilintis į SIRT1 ir akių ligų patogenezės sąsajas. Vienas tokių – geno pašalinimo (*angl. gene knockout*) analizės, panaudojant modelinius organizmus. 2003 metais atlikti tyrimai parodė, kad pelės, turinčios nulinį *SIRT1* alelį (kitaip žinomą kaip SIRT2a), pasižymėjo specifinėmis patologijomis. Šie modeliniai gyvūnai išsiskyrė jiems nebūdingu mažu kūno sudėjimu. Taip pat buvo matuojamas aukštas mirtingumo dažnis iš karto po gimimo. Vėliau kryžminant šiuos mutantus pastebėta, kad palikuoniai išgyvena iki suaugusio amžiaus, tačiau yra sterilūs. Be to, visi *SIRT1* nuliniai palikuoniai išsiskyrė bendru brožu. Tai – akies vokų neatsivėrimas. Pelės negalėjo atmerkti vienos ar abiejų akių. Ši patologija siejama su ragenos, akies lęšiuko ir tinklainės anomalijomis. Taip pat šie mutantai pasižymi mažesnėmis akimis su nenormaliai užsidariusiu voko plyšiu (*angl. optic fissure*). Be to, pastebimi labai suplonėję tinklainės ląstelių sluoksniai, kaip ir netvarkingi vidiniai ir išoriniai branduolio sluoksniai. Papildomai yra sunku identifikuoti vidinius ir išorinius fotoreceptorinių ląstelių segmentus. Šie akių defektai pasireiškia ankstyvose embriono stadijose. Tai reiškia, kad SIRT1 atlieka svarbų vaidmenį akies morfogenezėje ir tinklainės vystymesi (SMcBurney et al. 2003, Kamel et al. 2006, Cheng et al. 2003).

SIRT1 randamas tiek pelių, tiek žmonių akies ragenoje, akies lęšiuke, krumplėje (*angl. ciliary body*), tinklainės pigmentiniame epitelėje, neuroretininiame sluoksnyje ir

žmogaus akies junginėje. SIRT1 yra lokalizuotas akies ląstelių branduoliuose, įskaitant ragenos epitelines ląsteles, krumplyno ir epitelinės ląstelės, lęšiuko epitelinės ir skaidulinės ląstelės, tinklainės pigmentinio epitelio ląstelės ir melanocituose. Jis yra išorinio ir vidinio branduolio sluoksnio bei ganglinio sluoksnio ląstelių branduoliuose. Pabrėžtina, kad SIRT1 nėra šių ląstelių citoplazmoje. Jaliffa ir bendraautoriai nustatė, kad SIRT1 galima rasti ragenos epitelinių ląstelių ir gyslainės kraujagyslinių endotelinių ląstelių citoplazmoje. Nustatyta, kad SIRT1 daugiausia buvo ekspresuojamas ganglinio sluoksnio, vidinio ir išorinio pleksiforminio sluoksnio bei vidinių fotoreceptorinių segmentų citoplazmoje. Papildomai buvo nustatyta, kad SIRT1 yra ekspresuojamas tik pelių tinklainės užuomazginių ląstelių (RPC) citoplazmoje (Jaliffa et al. 2009). Žmoguje SIRT1 kiekiai yra aptinkami ir citoplazmoje, ir branduoliuose. Šie turimi duomenys apie SIRT1 baltymo kiekio pasiskirstymą skirtingų rūšių nevienoduose ląstelių tipuose parodo, kad SIRT1 ekspresija gali varijuoti vykstant įvairiems tinklainės vystymosi etapams ir ląstelių diferenciacijai. Skirtinga SIRT1 lokalizacija iškelia prielaidą, kad padidėjusi šio baltymo raiška gali turėti apsauginį poveikį prieš oksidacinio streso sukeltus akių pažeidimus. Tokius kaip: katarakta, regos nervo neuritas, glaukoma, AGDD (Alves et al. 2012, Maloney et al. 2012).

1.8. SIRT1 sąsaja su AGDD

SIRT1 baltymą koduojamas genas yra 10q21.3 chromosomoje. Šis genas dėl savo biologinių funkcijų dar vadinamas ilgaamžiškumo genu. Atliktas tyrimas parodė, kad tam tikri *SIRT1* geno polimorfizmai siejami su AGDD pasireiškimu. Reikšmingiausias iki šiol šia tema atliktas tyrimas studijavo Kinijos Han individų populiaciją. *Kilic* ir kiti nustatė, kad *SIRT1* geno promotoriaus regiono rs12778366 polimorfizmas yra statistiškai reikšmingai susijęs su AGDD recesyviniu ir kodominantiniu genetiniais modeliais (Kilic et al. 2015). Sąsajos tarp *SIRT1* ir AGDD yra nustatomos dėl kelių priežasčių.

Žinoma, kad SIRT1 baltymas siejamas su tinklainės pigmentinio epitelio (TPE) ląstelių disfunkcija. SIRT1 ir transkripcijos faktoriaus Oct-4 padidėjusi ekspresija senosiose TPE ląstelėse skatina ląstelių diferenciaciją į tinklainės ląsteles – pradininkes. Jis sukelia šių ląstelių fermentinį antioksidacinį biologinį aktyvumą. Atliktos studijos parodė, kad tiek jaunose, tiek senose TPE ląstelėse pastebima padidėjusi transkripcijos faktoriaus p53 ekspresija. SIRT1 inhibitorius sirtinolis padidina p53 acetilinimą ir fosforilinimą, tačiau pasižymi tik nedideliu poveikiu p53 ekspresijai ir padidėjusiai kaspazės-3 (*angl. caspase-3*)

aktyvacijai. Šie veiksniai prisideda prie TPE ląstelių apoptozės procesų (Peng et al. 2011, Bhattacharya et al. 2012).

SIRT1 funkcinė reguliacija yra susijusi su oksidaciniu stresu. Organizmui senstant homeostazės sistemoje įvyksta klaidų. Didžiausią poveikį turi mitochondrinės pažaidos. Jos padidina nevisiškai redukuotų deguonies formų gamybą. Dėl to vystosi oksidacinis stresas, kuris paspartina AGDD ligos progresą. SIRT1 deacetilina nehistoninius baltymus. Tokiu būdu apsaugo TPE ląsteles nuo oksidacinio streso ir senėjimo. Ši teorija buvo patikrinta pašalinant arba prislopinant SIRT1 veikimą. Pastebėta, kad SIRT1 išstūmimas (*angl. knockdown*) arba SIRT1 baltymo inhibitorių panaudojimas (įskaitant nikotinamidą ir sirtinolį) sukelia H₂O₂ toksiškumą. Dėl šios priežasties TPE ląstelės tampa labai jautrios oksidaciniam stresui (Salminen et al. 2013).

Be to, SIRT1 mRNR, kaip ir visų kitų sirtuinų, ekspresija tinklainėje parodo reikšmingus kasdienes pakitimus esant tamsos ir šviesos fazei. Buvo nustatytas visų sirtuinų, išskyrus SIRT6, mRNR kiekių pakilimas tamsos fazėje. Kaip jau minėta, visi sirtuinai, išskyrus SIRT5, yra ekspresuojami tinklainėje (Ban et al. 2013). Žmogaus tinklainė yra fotoreceptinis audinys, kurio energijos sunaudojimas keičiasi priklausomai nuo šviesos ir tamsos fazių (t. y. šviesos buvimo). Tinklainės ląstelės sueikvoja daugiau energijos esant tamsos fazėje. Tai vyksta, nes šios ląstelės šios fazės metu suvartoja daugiau deguonies ir pagamina daugiau pieno rūgšties (Morgan et al. 1996). Taigi, tinklainės sirtuinų ekspresija yra nepastovi. Tai išryškina tinklainėje esančių sirtuinų reguliacinius mechanizmus. Žinant, kad tinklainės ląstelės suvartoja daugiau energijos tamsoje, SIRT1 baltymo reguliacija siejama su atsaku į šviesos stimuliaciją ir metaboline disfunkcija nuo amžiaus priklausančiose ligose (įskaitant AGDD) (Luo et al. 2017).

SIRT1 dalyvauja angiogenezeje. Gyslainės neovaskulizacijos (GNV) formavimasis yra tipiškas eksudacinės AGDD formos bruožas. Sąsaja tarp SIRT1 ir angiogenezės proceso pirmiausia buvo pastebėta *in vitro* darbuose tiriant zebrines danijas (*angl. zebrafish*) ir peles. Šis tyrimas parodė didesnius SIRT1 baltymo kiekius pelių kraujagyslėse per angiogenezės procesą. Nustatyta, kad šiame procese SIRT1 kontroliuoja endotelinių ląstelių angiogeninį aktyvumą. Pašalinus SIRT1 baltymo funkcinį aktyvumą, pastebėtas žmogaus endotelinių ląstelių angiogenezės ir besiplečiančios morfogenezės procesų blokavimas. Taip pat ir genų, atsakingų už kraujagyslių augimą ir pertvarkymą, reguliacija. SIRT1 baltymo ekspresijos sutrikdymas tiek žuvų, tiek pelių organizmuose turėjo įtakos pažeistų kraujagyslių augimui ir ischemijos indukuotoje neovaskulizacijoje (Potente et al. 2007). Manoma, kad neovaskulizacijos grandinės blokavimas slopina AGDD išsivystymą (Ferrara et al. 2006).

2. TYRIMO METODIKA

2.1. Tyrimo planavimas

Magistro baigiamojo darbo tyrimai atlikti LSMU Neuromokslų instituto oftalmologijos laboratorijoje.

Pirmasis magistro baigiamojo darbo tyrimo etapas – problemos aktualumo analizė ir reikalingos informacijos rinkimas. Buvo studijuojami ankstesni įvairių autorių tyrimai apie AGDD, jos patogenezę. Taip pat buvo analizuojama jau tirtų genetinių faktorių svarba ligai pasireikšti. Atlikus išsamią paiešką duomenų bazėse, nebuvo rasta jokios informacijos apie AGDD sąsajas su *SIRT1* rs3758391 ir rs3818292 geno polimorfizmais. Dėl šios priežasties buvo nuspręsta pasirinkti šiuos polimorfizmus ir nustatyti jų reikšmę AGDD pasireikšti.

Antrasis magistro baigiamojo darbo tyrimo etapas – laboratorinių techninių galimybių įvertinimas, reikalingų reagentų užsakymas. Turint galiojantį bioetikos leidimą, suorganizavus darbo eigą ir gavus reikalingų reagentų, buvo pradėti vykdyti magistro baigiamojo darbo tyrimai (1 priedas).

2.2. Tyrimo objektas

Vykdamas magistro baigiamojo darbo tyrimus, buvo tiriami *SIRT1* rs3758391 ir rs3818292 geno polimorfizmai pacientams, sergantiems AGDD, ir kontrolinei grupei, sudarytai iš oftalmologiškai sveikų asmenų.

2.3. Tiriamųjų atranka

Visi tiriami asmenys, dalyvavę moksliniame tyrime, pasirašė informuoto asmens sutikimo formą (2 priedas). Tyrimo eigoje suformuotos dvi tiriamųjų grupės.

I grupė: pacientai, sergantys amžine geltonosios dėmės degeneracija AGDD (n=746), kurių amžius buvo nuo 58 iki 94 metų. Grupę sudarė 499 (66,9 proc.) moterys ir 247 (33,1 proc.) vyrai.

II grupė: oftalmologiškai sveiki asmenys (n=323), kurių amžius buvo nuo 42 iki 95 metų. Grupę sudarė 194 (61,1 proc.) moterys ir 129 (39,9 proc.) vyrai.

2.4. Tyrimo metodai

2.4.1. Deoksiribonukleininės rūgšties išskyrimas

Deoksiribonukleininei rūgščiai (DNR) išskirti kraujas buvo surinktas į vakuuminius mėgintuvėlius su antikoaguliantu EDTA. Šis antikoaguliantas naudojamas norint apsaugoti mėginį nuo mikrokrešulių susidarymo. Siekiant gauti gerus tyrimo rezultatus, DNR buvo išskirta iš periferinio kraujo baltųjų kraujo ląstelių – leukocitų. Žinoma, kad apie 250 µg DNR išskirti reikalinga 3 ml kraujo. Šis DNR kiekis yra optimalus atliekant daugelį tyrimų, tarp jų – ir TL-PGR.

Pirmuosiuose DNR išskyrimo etapuose labai svarbu inaktyvinti nukleazes. Tai fermentai, ardantys DNR arba RNR. Jų inaktyvacija vykdoma naudojant skirtingus buferius, siekiant apsaugoti DNR nuo suardymo.

Pažymėtina, kad visi DNR išskyrimo etapai būtų vykdomi žemoje temperatūroje, apie 0 °C. Išskirtą DNR rekomenduojama laikyti –70 °C temperatūroje, prieš naudojimą atšildyti.

DNR skyrimas iš periferinio veninio kraujo leukocitų druskų nusodinimo metodu (*angl. DNA salting-out*)

Druskų nusodinimo metodas yra paremtas ląstelių surinkimu centrifuguojant, jų suspendavimu buferiniame tirpale, ląstelių membranų suardymu detergentais, baltymų hidrolize proteinaze K, deproteinizacija chloroformu ir DNR išsodinimu etanoliu.

Naudoti reagentai:

1. 155 mM amonio chloridas (NH₄Cl) „Roti stoch“ (Carl Roth GmbH + Co, Vokietija)
2. 10 mM kalio bikarbonatas (KHCO₃) (Sigma-ALORICH Chemie GmbH, Vokietija)
3. 1 mM ir 2 mM etilendiamino tetraacetatas (EDTA) (Carl Roth GmbH + Co, Vokietija)
4. 10 mM tris – vandenilio chloridas (Tris HCl) (Carl Roth GmbH + Co, Vokietija)
5. 400 mM natriochloridas (NaCl) (Merck KGaA, Vokietija)
6. SDS – natrio laurilsulfatas (AppliChem, Vokietija)
7. Chloroformas stabilizuotas su 155 ppm anilenu (Scharlau Chemie S.A., Ispanija)
8. Proteinazė K (Thermo Fisher Scientific, Lietuva)
9. 96 ° ir 70 ° etilo alkoholis (AB „Stumbras“, Lietuva)
10. NaCl (Merck KGaA, Vokietija)
11. TE buferis „Roti Stoch“ (Carl Roth GmbH + Co, Vokietija)

Reikalingos techninės priemonės:

1. Automatinės pipetės „Eppendorf Research“ 1 – 1000 µl (Eppendorf AG, Vokietija)
2. Antgaliai 1 – 1000 µl
3. Centrifuga „Fisher Accuspin Micro 17R“ (ThermoFisher Scientific, Vokietija)
4. Mikrocentrifuga „Eppendorf Centrifuge“ (Eppendorf AG, Vokietija)
5. Plastikiniai 50 ml talpos centrifuginiai mėgintuvėliai
6. Eppendorf tipo 2 ml talpos mėgintuvėliai (Eppendorf AG, Vokietija)
7. Termomaišyklė „Thermo-Shaker TS-100“ (Biosan, Latvija)
8. Magnetinė maišyklė „BioSan Bio Magnetic Stirrer MMS-3000“ (Biosan, Latvija)
9. Elektroninės svarstyklės „KERN 440 – 35N“ (KERN, Vokietija)
10. PH metras „Mettler Toledo Five Easy FE 20“ (Mettler Toledo, Šveicarija)
11. Traukos spinta „Airstream Class II biohazard Safety Cabinet“ (ESCO, Singapūras)

Lizės I buferio paruošimas:

1. Reagentai, reikalingi lizės I tirpalui gaminti: 155 mM amonio chloridas (NH₄Cl), 10 mM kalio bikarbonatas (KHCO₃) ir 1 mM etilendiamino tetraacetatas (EDTA). Vienam litrui tirpalo reikia: 8,29 g amonio chlorido (NH₄Cl), 1 g kalio bikarbonato (KHCO₃), 292,20 mg etilendiamino tetraacetato (EDTA).
2. Visi reagentai pasverti ir supilti į 1 l talpos kolbą. Užpilti distiliuotu H₂O iki 1 litro žymos kolboje.
3. Tirpalas maišytas magnetine maišykle, kol visiškai ištirpo visi reagentai.
4. PH metru išmatuotas buferio pH. Naudojantis NaOH / HCl tirpalais pasiekama reikiama buferio pH 7,4.
5. Tirpalas atšaldomas iki 4 °C temperatūroje. Laikomas šaldytuve.

Lizės II buferio paruošimas:

1. Reagentai, reikalingi lizės II tirpalui paruošti: 10 mM tris – vandenilio chloridas (Tris HCl), 400 mM natriochloridas (NaCl), 2 mM etilendiamino tetraacetatas (EDTA). Vienam litrui tirpalo reikia: 1,576 g tris – vandenilio chlorido (Tris HCl), 23,37 g natriochlorido (NaCl), 584,40 mg etilendiamino tetraacetato (EDTA).
2. Visi reagentai pasverti ir supilti į 1 litro talpos kolbą. Užpilti distiliuotu H₂O iki 1 litro žymos kolboje.

3. Tirpalas maišytas magnetine maišykle, kol visiškai ištirpo visi reagentai.
4. PH metru išmatuotas buferio pH. Naudojantis NaOH / HCl tirpalais pasiekama reikiama buferio pH 8,2.
5. Tirpalas laikytas kambario temperatūroje.

10 % natrio duodecilsulfato (SDS) tirpalo paruošimas:

1. Norint paruošti 500 ml 10 % natrio duodecilsulfato (SDS) tirpalo, reikėjo 50 g natrio duodecilsulfato (SDS) miltelių, kurie suberti į graduotą indą, į kurį iki 500 ml žymos buvo pripilta distiliuoto H₂O.
2. Tirpalas maišytas magnetine maišykle, kol nuosėdos visiškai ištirpo, ir laikomas kambario temperatūroje.

6 M NaCl tirpalo paruošimas:

1. Norint paruošti 500 ml 6 M natrio chlorido (NaCl) tirpalą, reikia 175,38 g natrio chlorido (NaCl) miltelių, kurie buvo suberti į graduotą indą, į kurį iki 500 ml žymos buvo pripilta distiliuoto H₂O.
2. Tirpalas buvo maišytas magnetine maišykle, tačiau nuosėdos visiškai neištirpo, nes tirpalas yra persotintas. Tirpalas buvo laikomas kambario temperatūroje.

Metodo eiga:

1. Atšildytas kraujas iš vakuuminių mėgintuvėlių su EDTA perpilti į 50 ml centrifuginius mėgintuvėlius.
2. Vykdoma eritrocitų hemolizė užpylus 20–25 ml šalto lizės I buferio. Laikoma 30 min. šaldytuve, paskui centrifuguojama 15 min. 2 500–3 000 aps. 4 °C.
3. Supernatantas nupilamas iki nuosėdų (nusėdusių ant mėgintuvėlio dugno leukocitų). Daromi 3–4 tokie patys plovimai.
4. Ant leukocitų užpilama 6 ml lizės II buferio, 400 µl 10 proc. SDS (SDS – Natrio dodecil sulfatas) ir 30 µl proteinazės K ir išmaišoma. Inkubuojama per naktį (apie 16 valandų) 37 °C temperatūroje, paskui 1 valandą 55 °C temperatūroje. Lizės II buferis suardo ląstelių sienes, SDS veikia kaip detergentas, suardantis ląstelių ir branduolių lipidines membranas, o proteinazė K hidrolizuoja baltymus.

5. Po inkubacijos pridedama 2 ml NaCl (6 M) ir išmaišoma. Tuo metu denatūruojami baltymai, tirpinami likę lipidai, cholesterolis.
6. Traukos spintoje įpilama chloroformo ir uždengus išmaišoma.
7. Centrifuguojama 20 min. 3 200 aps. 16 °C. Susidaro dvifazis tirpalas: apatinė organizė fazė – tai likę baltymai, o viršutinė – vandeninė fazė, kurioje yra DNR ir druskų. Fazės skiria denatūruotų baltymų plėvelė.
8. Pipete su steriliu antgaliu nusiurbiamas supernatantas į naujus mėgintuvėlius.
9. DNR precipitacija, arba išsodinimas, vyksta paveikus šaltu 96 ° etanoliu ar izopropanoliu (izopropilo alkoholiu), jo pilame santykiu 1:1. Kadangi DNR netirpsta alkoholyje, ji iškrenta į nuosėdas – pavarčius mėgintuvėlį susidaro DNR „siūlai“.
10. Su steriliu antgaliu DNR siūlai nusiurbiami į ependorfinius mėgintuvėlius su 70 ° etanoliu ir centrifuguojami 1–2 min. 14 680 aps.
11. Atsargiai nupilamas etanolis, paliekama tik DNR. Mėgintuvėliai dedami į termomaišyklę ir laikomi 37 °C temperatūroje, kad išgaruotų likęs etanolis ir DNR išdžiūtų.
12. Įpilama 500 µl TE buferio ir paliekama kambario temperatūroje arba dedama į vandens vonelės, kad ištirptų DNR (ilgiau tirpsta, jei yra likusių baltymų priemaišų, kurias reikia išvalyti).
13. Kitą dieną spektrofotometru išmatuojamos DNR koncentracijos ir mėgintuvėliai su DNR neribotam laikui dedami į –20 °C temperatūrą.

2.4.2. DNR koncentracijos matavimas spektrofotometru

Prieš atliekant tikro laiko polimerazės grandininę reakciją (TL-PGR), būtina išmatuoti išskirtos DNR koncentraciją. Šis procesas atliekamas su „Agilent Technologies, Cary 60 UV – Vis“ spektrofotometru. DNR, RNR, oligonukleotidų ir mononukleotidų kiekis nustatomas vandeniniuose tirpaluose. Vietoj gryno vandens dažnai naudojami buferiniai tirpalai. Matuojant tirpalo absorbciją (optinį tankį) tam tikrame ultravioletinių (UV) bangų ilgyje, kartu su DNR koncentracija buvo nustatomas ir DNR švarumas. Tai – likusių baltymų kiekis. Nukleino rūgštys (DNR ir RNR) absorbuoja 260 nm ilgio UV šviesos bangas. Baltymai – 280 nm ilgio UV šviesos bangas. Santykis tarp DNR absorbcijos ir baltymų absorbcijos (260/280) turėtų būti apie 1,8. Nukrypimai nuo šių rodyklių gali paveikti tolimesnių tyrimų rezultatus.

Dėl šios priežasties reikalinga kuo grynesnė DNR. Po šio etapo paruošiami darbinės koncentracijos mėginiai (20 µg/ml) tolimesniam darbui.

2.4.3. VNP nustatymas tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu

SIRT1 rs3758391 ir rs3818292 geno polimorfizmų tyrimai buvo atlikti TL-PGR metodu.

PGR etapai

PGR sudaro trys cikliškai pasikartojantys etapai:

I etapas – 94–95 °C temperatūroje vykdoma DNR denatūracija. Šioje temperatūroje nutrūksta vandenilinės jungtys tarp azotinių bazių ir DNR grandinės atsiskiria viena nuo kitos. Šis etapas vykdomas 15 sek.

II etapas – 40–60 °C temperatūroje vykdoma pradmenų hibridizacija. Šio etapo metu pradmenys vandenilinėmis jungtimis jungiasi prie jiems komplementarių dauginamos DNR atkarpų. Šis etapas vykdomas 1 min.

III etapas – 72 °C temperatūroje vykdoma elongacija. Šią reakciją katalizuoja fermentas Taq polimerazė. Ji sintetina komplementarią tiriamųjų DNR grandinę. Šį procesą Taq polimerazė atlieka prijungdama PGR mišinyje esančius mononukleotidus.

Cikliškas šių etapų kartojimas lemia eksponentišką DNR kiekio didėjimą.

PGR principas

1069 tiriamųjų mėginiai buvo genotipuoti TL-PGR gausintuvu „StepOne Plus“ („Applied Biosystems“).

Genotipuoti skirti pradmenys ir molekuliniai žymenys buvo sukurti kompanijos „Applied Biosystems“. PGR mišinio sudėtis pateikiama 2.4.3.1 lentelėje. Kiekvienai reakcijai buvo naudojama 1 µl genomines tiriamųjų DNR ir 9 µl PGR reakcijos mišinio. PGR reakcijos sąlygos pateikiamos 2.4.3.2 lentelėje.

2.4.3.1. lentelė. TL - PGR mišinio sudėtis

Reagentai	1 pvz., µl	96 pvz., µl
TaqMan Universal Master Mix II („Applied Biosystems“ By Thermo Fisher scientific, Lietuva)	5 µl	480 µl
Genotyping Assays („Applied Biosystems“ By Thermo Fisher scientific, Pleasanton, CA, JAV) (pradmenys su žymenimis)	0,5 µl	48 µl
Sterilus H ₂ O („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva)	3,5 µl	350 µl
Iš viso (PGR mišinio)	9 µl	
DNR	1 µl	
Iš viso	10 µl	

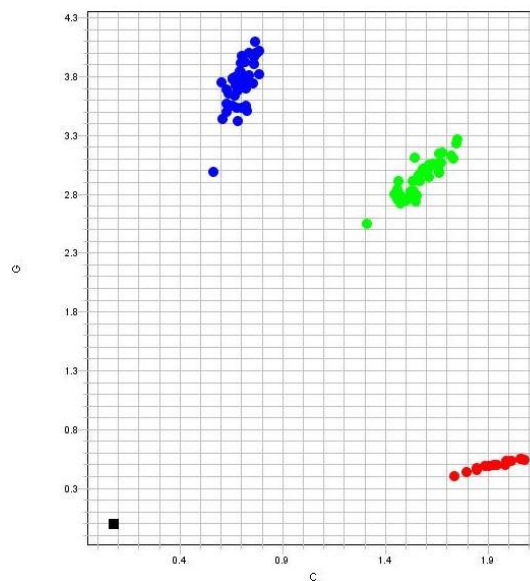
2.4.3.2. lentelė. Optimalios TL-PGR programos genotipavimo sąlygos naudojamos SIRT1 rs3758391 ir rs3818292 polimorfizmams nustatyti

Polimorfizmas	Genotipavimo rinkinys	PGR sąlygų protokolai	
SIRT1 rs3758391	„Applied Biosystem“ patentas.	95 °C 10 min.	45 ciklai: 92 °C 15 sek. 60 °C 60 sek.
SIRT1 rs3818292	„Applied Biosystem“ patentas.	95 °C 10 min.	45 ciklai: 92 °C 15 sek. 60 °C 60 sek.

PGR metodas

1. Paruošiamas PGR mišinys 96 mėginiams.
2. PGR mišinys išpilstomas po 9 µl į visus 96 plokštelės šulinėlius.
3. Į 95 šulinėlius įpilama po 1 µl tiriamųjų DNR. Paskutiniame šulinėlyje įpilamas sterilus vanduo. Tai – neigiama kontrolė.
4. Plokštelė užklijuojama specialia optine plėvele ir centrifuguojama.

5. Nustatoma programa polimorfizmui nustatyti. Naudota „Genotipavimo“ programa (*angl. Genotyping*).
6. Gauti genotipavimo rezultatai, kaip pavyzdys pateikiamas 2.4.3.1 paveikslas. Pagal skirtingų detektorių fluorescencijos intensyvumo santykį programa nustato individų genotipus. X ašyje VIC fluorescensiniais dažais, arba Yakima Yellow, žymėtas molekulinis žymuo, o Y ašyje FAM fluorescensiniais dažais žymėtas molekulinis žymuo. Gauti genotipavimo rezultatai naudojami statistiniams skaičiavimams.



2.4.3.1 pav. Genotipavimo programos rezultatai.

Įvairių spalvų taškai reiškia skirtingus genotipus: mėlynos ir raudonos spalvos taškai – homozigotai, žalios spalvos taškai – heterozigotai.

2.5. Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant kompiuterinę programą „IBM SPSS Statistics 20.0“. Duomenys pateikiami realiaisiais skaičiais (procentais), mediana, mažiausia ir didžiausia (min. ir max.) vertėmis. Dviejų nepriklausomų grupių skirtumams nustatyti naudotas Mann Whitney U testas. Genų polimorfizmų genotipų pasiskirstymas sergantiems AGDD ir kontrolinėje grupėse vertintas pagal Hardžio-Veinbergo dėsnį (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). Polimorfizmų genotipų pasiskirstymo homogeniškumo tarp sergančių AGDD ir kontrolinės grupės palyginimui taikytas χ^2 ir Fisher vienpusio bei dvipusio kriterijų skaičiavimas. Atlikus dvinarę logistinę regresinę analizę,

įvertintas galimybių santykis (GS) AGDD pasireikšti, atsižvelgiant į genetinius paveldėjimo modelius. Genetiniai modeliai (kodominantinis: heterozigotai vs. laukinio tipo homozigotai ir homozigotai vs. laukinio tipo homozigotai; dominantinis: homozigotai su retesniu aleliu ir heterozigotai vs. laukinio tipo homozigotai; recesyvinis: homozigotai su retesniu aleliu vs. laukinio tipo homozigotai ir heterozigotai; viršdominantinis: heterozigotai vs. laukinio tipo homozigotai ir homozigotai su retesniu aleliu; adityvinis modelis buvo naudojamas kiekvieno retesnio alelio įtaką AGDD išsivystymui). Ši analizė atlikta sergančių AGDD grupei nurodant GS su 95 proc. patikimumo intervalu (PI). Pasirenkant geriausią paveldėjimo modelį buvo vertinamas Akaike informacinis kriterijus (AIC), kurio mažiausia vertė nurodo tinkamiausią modelį. Skirtumai vertinti kaip statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI

Atliktame atvejo ir kontrolės tyrime dalyvavo 1 069 asmenys, kurie buvo suskirstyti į tris grupes: kontrolinė grupė (n=323) bei pradinė AGDD (n=330) ir eksudacinė AGDD (n=416) sergančių asmenų grupės. Demografiniai tiriamųjų duomenys pateikti 3.1 lentelėje. Lyginant moterų ir vyrų pasiskirstymą visose trijose grupėse statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta (p=0,053). Taip pat nenustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų lyginant kontrolinės ir pradinės AGDD grupių amžių (p=0,055). Tačiau kontrolinės ir eksudacinės AGDD grupių amžius skyrėsi statistiškai reikšmingai (p=<0,000).

3.1 lentelė. Demografinių rodiklių duomenys

	Kontrolinė grupė n=323	Pradinė AGDD n=330	Eksudacinė AGDD n=416	p reikšmė
Moterys, n (proc.)	194 (60,1)	228 (69,1)	271 (65,1)	1,000
Vyrai, n (proc.)	129 (39,9)	102 (30,9)	145 (34,9)	1,000
Amžius, mediana/min./max.	71/58/94	73/42/94	77/49/95	**1 – 0,055 **2 – <0,000

*Pearson Chi-Square; **Mann Whitney U testas lyginant dvi grupes: 1 – kontrolinę grupę su pradine AGDD, 2 – kontrolinę grupę su eksudacine AGDD; min. – mažiausia reikšmė; max. – didžiausia reikšmė.

Įvertinus tirtų polimorfizmų genotipų dažnius pagal Hardžio-Veinbergo pusiausvyros dėsnį kontrolinėje grupėje, rezultatai parodė, jog tirtų polimorfizmų genotipų pasiskirstymai nenukrypsta nuo Hardžio-Veinbergo pusiausvyros dėsnio (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Genotipų pasiskirstymo analizė pagal Hardžio-Veinbergo dėsnį

VNP	Grupė	Alelių dažniai		Genotipų pasiskirstymas	HWE p reikšmė
SIRT1 rs3818292	Kontrolinė	A (0,952)	G (0,048)	1/29/293	0,755
SIRT1 rs3758391	Kontrolinė	C (0,755)	T (0,245)	16/126/181	0,317

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; HWE – Hardžio-Veinbergo dėsnis.

3.1. *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 įtaka pradinei ir eksudacinei AGDD pasireikšti

Pirmasis baigiamojo magistro darbo uždavinys – nustatyti vieno nukleotido polimorfizmus (rs3818292 ir rs3758391) tiriamiesiems ir įvertinti jų įtaką pradinei ir eksudacinei AGDD pasireikšti (3.1.1 – 3.1.4 lentelės).

Atlikus *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 genotipų bei alelių dažnių analizę nustatyta, kad rs3818292 G alelis yra statistiškai reikšmingai retesnis kontrolinėje grupėje, palyginti su pradine AGDD grupe (4,8 proc. vs. 7,6 proc., $p=0,037$) (3.1.1 lentelė).

Eksudacine AGDD sergančių žmonių grupės analizė parodė, jog *SIRT1* rs3818292 AA genotipas yra statistiškai reikšmingai retesnis eksudacine AGDD sergančių žmonių grupėje, palyginti su kontroline grupe (82 proc. vs. 90,7 proc., $p=0,001$), o AG genotipas yra statistiškai reikšmingai dažnesnis eksudacine AGDD sergančių žmonių grupėje, palyginti su kontroline grupe (17,3 proc. vs. 9 proc., $p=0,001$). *SIRT1* rs3758391 T alelis yra statistiškai reikšmingai dažnesnis eksudacine AGDD sergančių žmonių grupėje, palyginti su kontroline grupe (29,2 proc. vs. 24,5 proc., $p=0,042$) (3.1.2 lentelė).

Dvinarė logistinė regresija atskleidė, jog *SIRT1* rs3818292 AG genotipas, palyginti su GG genotipu, 1,6 karto didina galimybę susirgti pradine AGDD (GS=1,642; 95 proc. PI: 1,003–2,688; $p=0,001$), o palyginti su AA ir GG genotipais, šią galimybę didina 1,6 karto (GS=1,642; 95 proc. PI: 1,003–2,687; $p=0,001$) (3.1.3 lentelė). Taip pat *SIRT1* rs3818292 AG genotipas, palyginti su GG genotipu, 2,1 karto didina galimybę susirgti eksudacine AGDD (GS=2,132; 95 proc. PI: 1,348–3,373; $p=0,001$), o palyginti su AA ir GG genotipais, šią galimybę didina 2,1 karto (GS=2,122; 95 proc. PI: 1,342–3,356; $p=0,001$). Taip pat AG ir GG genotipai kartu, palyginti su AA genotipu, 2,1 karto didina galimybę susirgti eksudacine AGDD (GS=2,106; 95 proc. PI: 1,348–3,289; $p=0,001$). Kiekvienas G alelis 1,9 karto didina galimybę susirgti eksudacine AGDD (GS=1,916; 95 proc. PI: 1,257–1,916; $p=0,002$). *SIRT1* rs3758391 kiekvienas T alelis 1,2 karto didina galimybę susirgti eksudacine AGDD (GS=1,292; 95 proc. PI: 1,015–1,643; $p=0,037$) (3.1.4 lentelė).

3.1.1 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmų *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 genotipų ir alelių dažniai sergančių pradine AGDD ir kontrolinėje grupėse

VNP	Genotipai/ aleliai	Grupė		p reikšmė
		Kontrolinė n (proc.) (n=323)	Pradinė AGDD n (proc.) (n=330)	
<i>SIRT1</i> rs3818292	AA	293 (90,7)	282 (85,5)	0,115
	AG	29 (9)	46 (13,9)	
	GG	1 (0,3)	2 (0,6)	
	A	615 (95,2)	610 (92,4)	0,037
	G	31 (4,8)	50 (7,6)	
<i>SIRT1</i> rs3758391	CC	181 (56,0)	175 (53,0)	0,740
	CT	126 (39,0)	138 (41,8)	
	TT	16 (5,0)	17 (5,2)	
	C	488 (75,5)	488 (73,9)	0,183
	T	158 (24,5)	172 (26,1)	

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; AGDD – amžinė geltonosios dėmės degeneracija.

3.1.2 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmų *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 genotipų ir alelių dažniai sergančių eksudacine AGDD ir kontrolinėje grupėse

VNP	Genotipai/ aleliai	Grupė		p reikšmė
		Kontrolinė n (proc.) (n=323)	Eksudacinė AGDD n (proc.) (n=416)	
<i>SIRT1</i> rs3818292	AA	293 (90,7) ¹	341 (82,0) ¹	0,003
	AG	29 (9,0) ²	72 (17,3) ²	
	GG	1 (0,3)	3 (0,7)	
	A	615 (95,2)	754 (90,6)	0,001
	G	31 (4,8)	78 (9,4)	

SIRT1 rs3758391	CC	181 (56,0)	204 (49,0)	0,112
	CT	126 (39,0)	181 (43,5)	
	TT	16 (5,0)	31 (7,5)	
	C	488 (75,5)	589 (70,8)	0,042
	T	158 (24,5)	243 (29,2)	

¹p=0,001; ²p=0,001; VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; AGDD – amžinė geltonosios dėmės degeneracija.

3.1.3 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmų SIRT1 rs3818292 ir rs3758391 dvinarės logistinės regresijos analizė sergančių pradine AGDD ir kontrolinėje grupėse

Modelis	Genotipas/alelis	GS (95 proc. PI)	p reikšmė	AIC
SIRT1 rs3818292				
Kodominantinis	A/A	1	0,048	905,189
	A/G	1,642 (1,003–2,688)		
	G/G	1,035 (0,145–7,401)		
Dominantinis	A/G+G/G vs. A/A	1,603 (0,992–2,592)	0,054	903,389
Recesyvinis	G/G vs. A/G+A/A	1,963 (0,177–21,760)	0,582	906,855
Viršdominantinis	A/G vs. A/A+G/G	1,642 (1,003–2,687)	0,048	903,190
Adityvinis	G	1,503 (0,960–2,354)	0,075	903,919
SIRT1 rs3758391				
Kodominantinis	C/C	1	0,443	908,573
	C/T	1,133 (0,824–1,558)		
	T/T	1,099 (0,538–2,243)		
Dominantinis	C/T+T/T vs. C/C	1,115 (0,819–1,517)	0,489	906,696
Recesyvinis	T/T vs. C/T+C/C	1,042 (0,517–2,100)	0,908	907,162
Viršdominantinis	C/T vs. T/T+C/C	1,124 (0,822–1,536)	0,465	906,640
Adityvinis	T	1,096 (0,845–1,420)	0,490	906,697

GS – galimybių santykis; PI – pasikliautinumo intervalas; AIC – Akaike informacijos kriterijus.

3.1.4 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmų *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 dvinarės logistinės regresijos analizė sergančių eksudacine AGDD ir kontrolinėje grupėse

Modelis	Genotipas/alelis	GS (95 proc. PI)	p reikšmė	AIC
<i>SIRT1</i> rs3818292				
Kodominantinis	A/A	1		1004,330
	A/G	2,132 (1,348–3,373)	0,001	
	G/G	1,288 (1,348–3,373)	0,782	
Dominantinis	A/G+G/G vs. A/A	2,106 (1,348–3,289)	0,001	1003,296
Recesyvinis	G/G vs. A/G+A/A	2,339 (0,242–22,591)	0,463	1014,129
Viršdominantinis	A/G vs. A/A+G/G	2,122 (1,342–3,356)	0,001	1003,645
Adityvinis	G	1,916 (1,257–1,916)	0,002	1003,745
<i>SIRT1</i> rs3758391				
Kodominantinis	C/C	1		1012,318
	C/T	1,275 (0,941–1,726)	0,117	
	T/T	1,719 (0,910–3,246)	0,095	
Dominantinis	C/T+T/T vs. C/C	1,308 (0,977–1,751)	0,071	1011,474
Recesyvinis	T/T vs. C/T+C/C	1,545 (0,830–2,877)	0,170	1012,789
Viršdominantinis	C/T vs. T/T+C/C	-	-	-
Adityvinis	T	1,292 (1,015–1,643)	0,037	1010,338

GS – galimybių santykis; PI – pasikliautinumo intervalas; AIC – Akaike informacijos kriterijus.

3.2. *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 įtaka pradinei ir eksudacinei AGDD pasireikšti pagal tiriamųjų lytį

Antrasis baigiamojo magistro darbo uždavinys buvo įvertinti vieno nukleotido polimorfizmų (rs3818292 ir rs3758391) įtaką pradinei ir eksudacinei AGDD pasireikšti pagal tiriamųjų lytį (3.2.1 – 3.2.4 lentelės).

Atlikus *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 genotipų ir alelių dažnių analizę nustatyta, kad rs3818292 AA genotipas sergantiems pradine AGDD vyrams yra nustatomas rečiau nei sveikiems vyrams (78,4 proc. vs. 93,8 proc., p=0,001), AG genotipas nustatomas dažniau nei sveikiems vyrams (20,6 proc. vs. 6,2 proc., p=0,001). Taip pat G alelis sergantiems pradine

AGDD vyrams yra nustatomas dažniau nei sveikiems vyrams (11,3 proc. vs. 3,1 proc., $p=0,001$) (3.2.1 lentelė).

Eksudacine AGDD sergančių žmonių grupės analizė parodė, kad *SIRT1* rs3818292 AA genotipas sergantiems pradine AGDD vyrams yra nustatomas rečiau nei sveikiems vyrams (79,3 proc. vs. 93,8 proc., $p=0,001$), AG genotipas nustatomas dažniau nei sveikiems vyrams (20,7 proc. vs. 6,2 proc., $p=0,001$). Taip pat G alelis sergantiems pradine AGDD vyrams yra nustatomas dažniau nei sveikiems vyrams (10,3 proc. vs. 3,1 proc., $p=0,001$) (3.2.2 lentelė).

Dvinarė logistinė regresija atskleidė, kad *SIRT1* rs3818292 AG genotipas, palyginti su AA genotipu, galimybę susirgti pradine AGDD vyrams didina 4 kartus (GS=3,970; 95 proc. PI: 1,677–9,400; $p=0,002$), o palyginti su AA ir GG genotipais, šią galimybę didina 3,9 karto (GS=3,921; 95 proc. PI: 1,657–9,281; $p=0,002$). Taip pat AG ir GG genotipai kartu, palyginti su AA genotipu, galimybę susirgti pradine AGDD vyrams didina 4,2 karto (GS=4,159; 95 proc. PI: 1,765–9,800; $p=0,001$). Kiekvienas G alelis šią galimybę didina 4 kartus (GS=4,093; 95 proc. PI: 1,759–9,527; $p=0,001$) (3.2.3 lentelė). Galimybę susirgti eksudacine AGDD vyrams *SIRT1* rs3818292 AG genotipas didina tiek lyginant su AA genotipu (GS=3,946; 95 proc. PI: 1,737–8,964; $p=0,001$), tiek su AA ir GG genotipais kartu (GS=3,946; 95 proc. PI: 1,737–8,964; $p=0,001$). AG ir GG genotipai kartu, palyginti su AA genotipu, galimybę susirgti eksudacine AGDD vyrams didina 3,9 karto (GS=3,946; 95 proc. PI: 1,737–8,964; $p=0,001$). Kiekvienas G alelis šią galimybę taip pat didina 3,9 karto (GS=3,946; 95 proc. PI: 1,737–8,964; $p=0,001$) (3.2.4 lentelė).

3.2.1 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmų *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 genotipų ir alelių dažniai sergančių pradine AGDD ir kontrolinėje grupėse pagal lytį

VNP	Genotipai/ aleliai	Vyrai		p reikšmė	Moterys		p reikšmė
		Kontrolinė n (proc.) (n=129)	Pradinė AGDD n (proc.) (n=102)		Kontrolinė n (proc.) (n=194)	Pradinė AGDD n (proc.) (n=228)	
<i>SIRT1</i> rs3818292	AA	121 (93,8) ¹	80 (78,4) ¹	0,002	171 (88,1)	202 (88,6 %)	0,522
	AG	8 (6,2) ²	21 (20,6) ²		21 (10,8)	25 (11,0 %)	
	GG	0 (0,0)	1 (1,0)		2 (1,0)	1 (0,4 %)	
	A	250 (96,9)	181 (88,7)	0,001	363 (93,6)	429 (94,1)	0,753
	G	8 (3,1)	23 (11,3)		25 (6,4)	27 (5,9)	

SIRT1 rs3758391	CC	77 (59,7)	52 (51,0)	0,176	104 (53,6)	123 (53,9)	0,563
	CT	48 (37,2)	42 (41,2)		78 (40,2)	96 (42,1)	
	TT	4 (3,1)	8 (7,8)		12 (6,2)	9 (3,9)	
	C	202 (78,3)	146 (71,6)	0,096	286 (73,7)	342 (75)	0,669
	T	56 (21,7)	58 (28,4)		102 (26,3)	114 (25)	

¹p=0,001; ²p=0,001; VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; AGDD – amžinė geltonosios dėmės degeneracija.

3.2.2 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmų SIRT1 rs3818292 ir rs3758391 genotipų ir alelių dažniai sergančių eksudacine AGDD ir kontrolinėje grupėse pagal lytį

VNP	Genotipai / aleliai	Vyrai		p reikšmė	Moterys		p reikšmė	
		Kontrolinė n (proc.) (n=129)	Eksudacinė AGDD n (proc.) (n=145)		Kontrolinė n (proc.) (n=194)	Eksudacinė AGDD n (proc.) (n=271)		
SIRT1 rs3818292	AA	121 (93,8) ¹	115 (79,3) ¹	0,001	171 (88,1)	226 (83,4)	0,345	
	AG	8 (6,2) ²	30 (20,7) ²		21 (10,8)	42 (15,5)		
	GG	0 (0,0)	0 (0,0)		2 (1,0)	3 (1,1)		
	A	250 (96,9)	260 (89,7)	0,001	363 (93,6)	494 (91,1)	0,177	
	G	8 (3,1)	30 (10,3)		25 (6,4)	48 (8,9)		
SIRT1 rs3758391	CC	77 (59,7)	74 (51,0)	0,287	104 (53,6)	130 (48,0)	0,405	
	CT	48 (37,2)	63 (43,4)		78 (40,2)	118 (43,5)		
	TT	4 (3,1)	8 (8,8)		12 (6,2)	23 (8,5)		
		C	202 (78,3)	211 (72,8)	0,133	286 (73,7)	378 (69,7)	0,187
		T	56 (21,7)	79 (27,2)		102 (26,3)	164 (30,3)	

¹p=0,001; ²p=0,001; VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; AGDD – amžinė geltonosios dėmės degeneracija.

3.2.3 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmų *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 dvinarės logistinės regresijos analizė sergančių pradine AGDD ir kontrolinėje grupėse pagal lytį

Modelis	Genotipas/alelis	GS (95 proc. PI)	p reikšmė	AIC
Vyrai				
<i>SIRT1</i> rs3818292				
Kodominantinis	A/A	1		308,385
	A/G	3,970 (1,677–9,400)	0,002	
	G/G	-	-	
Dominantinis	A/G+G/G vs. A/A	4,159 (1,765–9,800)	0,001	307,018
Recesyvusis	G/G vs. A/G+A/A	-	-	-
Viršdominantinis	A/G vs. A/A+G/G	3,921 (1,657–9,281)	0,002	308,220
Adityvinis	G	4,093 (1,759–9,527)	0,001	306,563
<i>SIRT1</i> rs3758391				
Kodominantinis	C/C	1		317,599
	C/T	1,296 (0,753–2,231)	0,350	
	T/T	2,962 (0,848–10,344)	0,089	
Dominantinis	C/T+T/T vs. C/C	1,424 (0,843–2,404)	0,186	317,319
Recesyvusis	T/T vs. C/T+C/C	2,660 (0,778–9,096)	0,119	316,472
Viršdominantinis	C/T vs. T/T+C/C	1,181 (0,694–2,011)	0,539	318,694
Adityvinis	T	1,463 (0,963–2,270)	0,090	316,161
Moterys				
<i>SIRT1</i> rs3818292				
Kodominantinis	A/A	1		585,749
	A/G	1,008 (0,545–1,864)	0,980	
	G/G	0,423 (0,038–4,708)	0,484	
Dominantinis	A/G+G/G vs. A/A	0,957 (0,527–1,738)	0,885	584,253

Recesyvinius	G/G vs. A/G+A/A	0,850 (0,053–13,683)	0,909	583,261
Viršdominantinis	A/G vs. A/A+G/G	1,015 (0,549–1,876)	0,963	584,272
Adityvinis	G	0,918 (0,532–1,586)	0,760	584,181
SIRT1 rs3758391				
Kodominantinis	C/C	1		
	C/T	1,041 (0,700–1,547)	0,844	585,129
	T/T	0,634 (0,257–1,564)	0,323	
Dominantinis	C/T+T/T vs. C/C	0,966 (0,658–1,418)	0,861	584,243
Recesyvinius	T/T vs. C/T+C/C	0,623 (0,257–1,512)	0,296	583,167
Viršdominantinis	C/T vs. T/T+C/C	1,082 (0,733–1,596)	0,693	584,118
Adityvinis	T	0,929 (0,672–1,284)	0,655	584,075

GS – galimybių santykis; PI – pasikliautinumo intervalas; AIC – Akaike informacijos kriterijus.

3.2.4 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmų SIRT1 rs3818292 ir rs3758391 dvinarės logistinės regresijos analizė sergančių eksudacine AGDD ir kontrolinėje grupėse pagal lytį

Modelis	Genotipas/alelis	GS (95 proc. PI)	p reikšmė	AIC
Vyrai				
SIRT1 rs3818292				
Kodominantinis	A/A	1		
	A/G	3,946 (1,737–8,964)	0,001	370,127
	G/G	-	-	
Dominantinis	A/G+G/G vs. A/A	3,946 (1,737–8,964)	0,001	368,127
Recesyvinius	G/G vs. A/G+A/A	-	-	
Viršdominantinis	A/G vs. A/A+G/G	3,946 (1,737–8,964)	0,001	368,127
Adityvinis	G	3,946 (1,737–8,964)	0,001	368,127

SIRT1 rs3758391				
Kodominantinis	C/C	1		
	C/T	1,366 (0,834–2,235)	0,215	380,393
	T/T	2,081 (0,601–7,205)	0,247	
Dominantinis	C/T+T/T vs. C/C	1,421 (0,880–2,295)	0,151	378,838
Recesyvinis	T/T vs. C/T+C/C	1,825 (0,536–6,209)	0,336	379,936
Viršdominantinis	C/T vs. T/T+C/C	-	-	-
Adityvinis	T	1,393 (0,921–2,109)	0,117	378,415
Moterys				
SIRT1 rs3818292				
Kodominantinis	A/A	1		
	A/G	1,520 (0,868–2,662)	0,143	632,517
	G/G	1,140 (0,188–6,898)	0,887	
Dominantinis	A/G+G/G vs. A/A	1,520 (0,887–2,605)	0,128	631,425
Recesyvinis	G/G vs. A/G+A/A	2,160 (0,223–20,927)	0,506	633,324
Viršdominantinis	A/G vs. A/A+G/G	1,511 (0,863–2,645)	0,148	631,665
Adityvinis	G	1,389 (0,852–2,267)	1,888	630,945
SIRT1 rs3758391				
Kodominantinis	C/C	1		
	C/T	1,210 (0,823–1,779)	0,331	633,995
	T/T	1,533 (0,729–3,227)	0,260	
Dominantinis	C/T+T/T vs. C/C	1,228 (0,849–1,776)	0,276	632,630
Recesyvinis	T/T vs. C/T+C/C	1,407 (0,682–2,900)	0,356	632,940
Viršdominantinis	C/T vs. T/T+C/C	-	-	-
Adityvinis	T	1,225 (0,911–1,648)	0,180	632,004

GS – galimybių santykis; PI – pasikliautinumo intervalas; AIC – Akaike informacijos kriterijus.

3.3. *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 įtaka pradinei ir eksudacinei AGDD pasireikšti pagal amžiaus grupes

Trečiasis baigiamojo magistro darbo uždavinys buvo įvertinti polimorfizmą (rs3818292 ir rs3758391) įtaką pradinei ir eksudacinei AGDD pasireikšti pagal amžiaus grupes. Tiriamieji buvo suskirstyti į dvi grupes: jaunesni nei 70 metų amžiaus ir 70 metų ir vyresni (Colijn et al. 2017). Rezultatai pateikti 3.3.1 – 3.3.2 lentelėse.

Atlikus *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 genotipų ir alelių dažnių analizę, jaunesniems nei 70 metų amžiaus asmenims bei 70 metų ir vyresniems asmenims statistiškai reikšmingų rezultatų nenustatyta, palyginti pradine AGDD sergančių žmonių grupę su kontroline grupe (3 priedas, 1 lentelė). Palyginti eksudacine AGDD sergančių žmonių grupę su kontroline grupe, statistiškai reikšmingi skirtumai nustatyti tiek jaunesnių, tiek vyresnių asmenų grupėse. Jaunesnių nei 70 metų amžiaus tiriamųjų, sergančių eksudacine AGDD, grupėje *SIRT1* rs3758391 T alelis nustatytas statistiškai reikšmingai dažniau nei kontrolinėje grupėje (36,1 proc. vs. 25,8 proc., $p=0,025$) (3.3.1 lentelė). Vyresnių tiriamųjų, sergančių eksudacine AGDD, grupėje *SIRT1* rs3818292 AA genotipas statistiškai reikšmingai retesnis nei vyresnių žmonių kontrolinėje grupėje (85,6 proc. vs. 90,6 proc., $p=0,001$), o AG genotipas statistiškai reikšmingai dažnesnis nei vyresnių žmonių kontrolinėje grupėje (13,5 proc. vs. 9,4 proc., $p=0,011$). Taip pat G alelis statistiškai reikšmingai dažnesnis vyresnių tiriamųjų, sergančių eksudacine AGDD, nei vyresnių žmonių kontrolinėje grupėje (9,6 proc. vs. 4,7 proc., $p=0,004$) (3.3.1 lentelė).

Galimybę susirgti eksudacine AGDD jaunesniame amžiuje *SIRT1* rs3758391 TT genotipas, palyginti su CC genotipu, didina 2,8 karto (GS=2,812; 95 proc. PI: 0,334–0,971; $p=0,047$), o kiekvienas T alelis šią galimybę didina 1,6 karto (GS=1,647; 95 proc. PI: 1,064–2,549; $p=0,025$) (3.3.2 lentelė).

Galimybę susirgti eksudacine AGDD vyresniame amžiuje *SIRT1* rs3818292 AG genotipas didina tiek palyginti su AA genotipu (GS=2,210; 95 proc. PI: 1,266–3,858; $p=0,011$), tiek su AA ir GG genotipais kartu (GS=2,040; 95 proc. PI: 1,164–3,574; $p=0,013$). Galimybę susirgti eksudacine AGDD vyresniame amžiuje AG ir GG genotipai kartu, palyginti su AA genotipu, didina 2,2 karto (GS=2,210; 95 proc. PI: 1,266–3,858; $p=0,005$). Taip pat nustatyta, kad kiekvienas G alelis šią galimybę didina 2,2 karto (GS=2,186; 95 proc. PI: 1,270–3,765; $p=0,005$) (3.3.2 lentelė).

3.3.1 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmų *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 genotipų ir alelių dažniai sergančių eksudacine AGDD ir kontrolinėje grupėse pagal amžių

VNP	Genotipai / aleliai	<70 m.		p reikšmė	≥70 m.		p reikšmė
		Kontrolinė n (proc.) (n=132)	Eksudacinė AGDD n (proc.) (n=79)		Kontrolinė n (proc.) (n=191)	Eksudacinė AGDD n (proc.) (n=337)	
<i>SIRT1</i> rs3818292	AA	119 (90,2)	66 (83,5)	0,116	173 (90,6) ¹	275 (81,6) ¹	0,016
	AG	11 (8,3)	13 (16,5)		18 (9,4) ²	59 (17,5) ²	
	GG	186 (1,5)	0 (0,0)		0 (0,0)	186 (0,9)	
	A	249 (94,3)	145 (91,8)	0,309	364 (95,3)	609 (90,4)	0,004
	G	15 (5,7)	13 (8,2)		18 (4,7)	65 (9,6)	
<i>SIRT1</i> rs3758391	CC	72 (54,5)	32 (40,5)	0,076	109 (57,1)	172 (51,0)	0,328
	CT	52 (39,4)	37 (46,8)		74 (38,7)	144 (42,7)	
	TT	8 (6,1)	10 (12,7)		8 (4,2)	21 (6,2)	
	C	196 (74,2)	101 (63,9)	0,025	292 (76,4)	488 (72,4)	0,151
	T	68 (25,8)	57 (36,1)		90 (23,6)	186 (27,6)	

¹p=0,001; ²p=0,011; VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; AGDD – amžinė geltonosios dėmės degeneracija.

3.3.2 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmų *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 dvinarės logistinės regresijos analizė sergančių eksudacine AGDD ir kontrolinėje grupėse pagal amžių

Modelis	Genotipas/alelis	GS (95 proc. PI)	p reikšmė	AIC
<70 m.				
<i>SIRT1</i> rs3818292				
Kodominantinis	A/A	1		278,170
	A/G	2,131 (0,904–5,023)	0,084	
	G/G	-	0,999	
Dominantinis	A/G+G/G vs. A/A	1,803 (0,790–4,116)	0,162	279,109
Recesyvinis	G/G vs. A/G+A/A	-	-	-
Viršdominantinis	A/G vs. A/A+G/G	2,167 (0,919–5,106)	0,077	277,923
Adityvinis	G	1,445 (0,687–3,039)	0,332	280,118
<i>SIRT1</i> rs3758391				
Kodominantinis	C/C	1		277,957
	C/T	1,601 (0,885–2,895)	0,120	
	T/T	2,812 (1,016–7,789)	0,047	
Dominantinis	C/T+T/T vs. C/C	1,710 (0,972–3,007)	0,063	277,546
Recesyvinis	T/T vs. C/T+C/C	2,246 (0,827–5,957)	0,104	278,393
Viršdominantinis	C/T vs. T/T+C/C	-	-	-
Adityvinis	T	1,647 (1,064–2,549)	0,025	275,976
≥70 m.				
<i>SIRT1</i> rs3818292				
Kodominantinis	A/A	1		684,398
	A/G	2,070 (1,181–3,627)	0,011	
	G/G	-	-	

Dominantinis	A/G+G/G vs. A/A	2,210 (1,266–3,858)	0,005	682,467
Recesyvinis	G/G vs. A/G+A/A	-	-	-
Viršdominantinis	A/G vs. A/A+G/G	2,040 (1,164–3,574)	0,013	686,291
Adityvinis	G	2,186 (1,270–3,765)	0,005	683,182
SIRT1 rs3758391				
Kodominantinis	C/C	1		
	C/T	1,233 (0,853–1,784)	0,266	692,798
	T/T	1,664 (0,712–3,888)	0,240	
Dominantinis	C/T+T/T vs. C/C	1,275 (0,892–1,823)	0,182	691,277
Recesyvinis	T/T vs. C/T+C/C	1,520 (0,660–3,502)	0,325	692,042
Viršdominantinis	C/T vs. T/T+C/C	-	-	-
Adityvinis	T	1,257 (0,929–1,699)	0,138	690,828

GS – galimybių santykis; PI – pasikliautinumo intervalas; AIC – Akaike informacijos kriterijus.

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Buvo ištirti *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 vieno nukleotido polimorfizmai. 330 sergančių pradine AGDD, 416 eksudacine AGDD ir 323 sveikiems tiriamiesiems. Atlikta *SIRT1* rs3758391 genotipų ir alelių analizė parodė, kad T alelis yra dažnesnis eksudacine AGDD sergantiems pacientams nei sveikiems žmonėms (29,2 proc. vs. 24,5 proc., $p=0,042$). Taip pat kiekvienas T alelis 1,2 karto didina galimybę susirgti eksudacine AGDD ($p=0,037$). Siekiant nustatyti, kaip pasiskirsto rs3758391 polimorfizmo dažnis pacientų ir kontrolinėje grupėje, atsižvelgiant į tiriamųjų lytį, statistiškai reikšmingų rezultatų nenustatyta. Tačiau atsižvelgiant į tiriamųjų amžių gauta, kad pas jaunesnius nei 70 metų asmenis rs3758391 T alelis didina galimybę susirgti AGDD ($p=0,025$). Be to, jaunesniame amžiuje rs3758391 TT genotipas, palyginti su CC genotipu, didina 2,8 karto ($p=0,047$), o kiekvienas T alelis šią galimybę didina 1,6 karto ($p=0,025$).

Iki šiol mokslinėje literatūroje nėra duomenų, kurie analizuotų AGDD patogenezę ir jos sąsają su šiuo polimorfizmu. *SIRT1* rs3758391 polimorfizmas plačiai tiriamas Kinijos Han populiacijoje, siekiant nustatyti sąsajas su skirtingomis ligomis. Pavyzdžiui, Tang su bendraautoriais 2018 metais studijavo rs3758391 ryšį su depresija. Nustatyta, kad rs3758391 C alelis dažniau pasireiškia sergančių žmonių nei kontrolinėje grupėje ($p=0,01$) (Tang et al. 2018). Kitas atliktas darbas parodo, kad rs3758391 polimorfizmas atlieka svarbų vaidmenį difuzinėje didelių B ląstelių limfomos pasireiškimu. Nustatyta, kad rs3758391 TT genotipo ir T alelio pasikartojimo dažnis yra reikšmingai didesnis sergančių žmonių nei kontrolinėje grupėje ($p=0,02$ ir $p=0,01$, atitinkamai) (Kan et al. 2018). Reche-Sainz ir bendraautorių 2007 metais paskelbtoje publikacijoje teigiama, kad B ląstelių limfoma sukelia bilateralinę tinklainės atsoką (*angl. bilateral serous macular detachment*). Žinoma, kad ši patologija stipriai siejama su AGDD pasireiškimu (Reche-Sainz et al. 2007). Zhang ir bendraautoriai nustatė ryšį tarp rs3758391 ir sveiko senėjimo, vieno iš svarbiausių rizikos veiksnių AGDD pasireiškimu. Tarp senyvo amžiaus žmonių (60–91 m.) rs3758391 C alelis dažnesnis už T alelį ($p=0,026$), o CC genotipas dažnesnis už CT ($p=0,027$) (Zhang et al. 2010). Nors *SIRT1* ir laikomas ilgaamžiškumo genu, bet tiriant kitą Kinijos populiaciją, esančią Hainan regione, nebuvo nustatyta sąsajų tarp rs3758391 ir jos ilgaamžiškumo fenomeno (Huang et al. 2013). 2018 metais Peng su bendraautoriais parodė rs3758391 sąsają su viena iš diabeto sukeltų komplikacijų – diabetine pėda. Tačiau statistiškai reikšmingi rezultatai nenustatyti (Peng et al. 2018). rs3758391 polimorfizmo ryšys su diabetu taip pat buvo tirtas kitose populiacijose. 2010 metais atliktas mokslinis darbas tarp meksikiečių, sergančių antrojo tipo diabetu, ir

rs3758391 neparodė jokios sąsajos (Cruz et al. 2010). Tačiau naujausias 2020 metų tyrimas parodo, kad rs3758391 yra siejamas su vykstančiomis SIRT1 geno ekspresijos modifikacijomis sergant antrojo tipo diabetu (Ramírez et al. 2020). Žinoma, kad diabetas yra vienas iš AGDD pasireiškimo veiksnių (Clemons et al. 2005). Literatūroje taip pat galima rasti rs3758391 polimorfizmo tyrimų su autoimuninėmis ligomis. Consiglio su bendraautoriais nustatė, kad rs3758391 turi įtakos sisteminės raudonosios vilkligės sergamumui. rs3758391 T alelis yra rizikos veiksnys nefritui išsivystyti ir aukštesniam sisteminės raudonosios vilkligės aktyvumo rodikliui pasireikšti (Consiglio et al. 2014). Kitas Sarumaru su bendraautoriais 2016 metais paskelbtas tyrimas parodė rs3758391 sąsajas su autoimuninėmis skydliaukės ligomis. Nustatyta, kad C alelio (TC+CC genotipų) turėtojai, sergantys Greivso ir Hashimoto tiroidito ligomis, pasižymėjo didesniais antikūnų prieš skydliaukės peroksidazę kiekiais (anti-TPO) nei TT genotipo turėtojai. Žinoma, kad komplemento sistemos baltymai dalyvauja tiek imuninėse reakcijose, tiek AGDD pasireiškime. Dėl šios priežasties AGDD liga siejama su autoimuninėmis ligomis (Sarumaru et al. 2016). *SIRT1* rs3758391 polimorfizmas taip pat plačiai tiriamas įvairių navikinių formų pasireiškime. Pirmasis tyrimas šia tema atliktas 2016 metais Egipte. Jis parodė, kad pas sergančius krūties vėžiu pacientus yra padidėję SIRT1 serumo kiekiai. Nustatyta, kad rs3758391 TT genotipas pasireiškė dažniau nei CC ir CT, todėl yra siejamas su šiuo navikiniu procesu (Rizk et al. 2016). 2017 metais mokslininkų atliktas tyrimas kinų populiacijoje nenustatė jokių reikšmingų sąsajų tarp rs3758391 ir plaučių naviko (Lv et al. 2017). 2019 metų mokslinis darbas parodė, kad rs3758391 TC genotipas gali būti siejamas su padidėjusia šlapimo pūslės naviko išsivystymo rizika Irano populiacijoje (Rizk et al. 2016). Nustatyta, kad navikiniai procesai ir AGDD dalijasi kai kuriais bendrais rizikos veiksniais ir patogeniniais pasireiškimo mechanizmais (Cheung et al. 2007). Kitas žinomas AGDD veiksnys, dalyvaujantis ligos patogenezėje, – angiogenezės sutrikimai (Thomas et al. 2015). Šia tema taip pat galima rasti atliktų mokslinių darbų su rs3758391 polimorfizmu. Hu ir bendraautorių tyrime nustatyta, kad *SIRT1* genas atlieka svarbų vaidmenį apsaugant nuo ūminio koronarinio sindromo. rs3758391 siejamas su mRNA ekspresija sveikuose asmenyse (Hu et al. 2014). Kuningas ir bendraautoriai moksliniame darbe teigia, kad rs3758391 polimorfizmo nešiotojai pasižymi sumažėjusiu mirtingumu, kurį sukelia širdies ir kraujagyslių ligos (Kuningas et al. 2007). Ištirta rs3758391 polimorfizmo sąsaja su bisfosfonatų sukelta žandikaulių osteonekroze. Nustatyta, kad šie vaistai taip pat turi įtakos eksudacinei AGDD formai išsivystyti (Yang et al. 2018).

Remiantis mūsų tyrimo duomenimis galime teigti, kad *SIRT1* rs3818292 polimorfizmo AG genotipas, palyginti su AA genotipu, 1,6 karto didina galimybę susirgti pradine AGDD ($p=0,001$), o palyginti su AA ir GG genotipais, šią galimybę didina 1,6 karto ($p=0,001$). Taip pat AG genotipas, palyginti su AA genotipu, 2,1 karto didina galimybę susirgti eksudacine AGDD ($p=0,001$), o palyginti su AA ir GG genotipais, šią galimybę didina 1,6 karto ($p=0,001$). Papildomai AG ir GG genotipai kartu, palyginti su AA genotipu, 2,1 karto didina galimybę susirgti eksudacine AGDD ($p=0,001$). Kiekvienas G alelis siejamas su 1,9 karto padidėjusia galimybe susirgti eksudacine AGDD ($p=0,002$).

Analizuojant, kaip pasiskirsto rs3818292 polimorfizmo dažniai tarp skirtingų lyčių, statistiškai reikšmingi rezultatai gauti tik tarp vyriškos lyties atstovų. Atlikta dvinarė logistinė regresija parodė, kad AG genotipas, palyginti su AA genotipu, galimybę susirgti pradine AGDD vyrams didina 4 kartus ($p=0,002$), o palyginti su AA ir GG genotipais, šią galimybę didina 3,9 karto ($p=0,002$). Taip pat AG ir GG genotipai kartu, palyginti su AA genotipu, galimybę susirgti pradine AGDD vyrams didina 4,2 karto ($p=0,001$). Kiekvienas G alelis šią galimybę didina 4 kartus ($p=0,001$). Tiriant galimybes susirgti eksudacine AGDD vyresniems vyrams rs3818292 AG genotipas vienodai 3,9 karto didina tiek palyginti su AA genotipu ($p=0,001$), tiek su AA ir GG genotipais kartu ($p=0,001$). Tokią pat galimybę sirgti eksudacine AGDD pasižymi AG ir GG genotipai kartu, palyginti su AA genotipu ($p=0,001$). Kiekvienas G alelis šią galimybę didina 3,9 karto ($p=0,001$).

Suskirsčius tiriamuosius pagal amžių ir išanalizavus rezultatus gauta, kad vyresniems asmenims AG genotipas apie 2 kartus didina galimybę susirgti eksudacine AGDD tiek palyginti su AA genotipu ($p=0,011$), tiek su AA ir GG genotipais kartu ($p=0,013$). Tokią pat galimybę AG ir GG genotipai kartu, palyginti su AA genotipu, didina 2,2 karto ($p=0,005$). Taip pat nustatyta, kad kiekvienas G alelis šią galimybę didina 2,2 karto ($p=0,005$).

Daugiausia tyrimų su rs3818292 polimorfizmu atlikta siekiant nustatyti jo sąsajas su įvairiomis akmenligės formomis. Žinoma, kad AGDD ligos pasireiškimas taip pat siejasi su šiuo patologiniu procesu (Chen et al. 2017). Pavyzdžiui, diabeto sukelta akmenligė. 2011 metais Maeda ir bendraautoriai nustatė, kad rs3818292 yra siejamas su keliais šios ligos ($p=0,040$) fenotipais: inkstų nepakankamumu ir proteinurija tarp Japonijos populiacijos (Maeda et al. 2011). Kita studija, priešingai – statistiškai reikšmingų rezultatų nenustatė (Yue et al. 2018). Tokie kontrastingi rezultatai gali būti dėl etninių priežasčių. rs3818292 sąsaja su akmenlige taip pat tirta ir Rytų Kinijos populiacijoje. Statistiškai reikšmingų rezultatų nenustatyta (Hou et al. 2019). Cheng ir bendraautoriai tyrė rs3818292 ryšį su miokardo infarkto pasireiškimu kinų Han populiacijoje. Tačiau statistiškai reikšmingų rezultatų nebuvo

nustatyta (Cheng et al. 2015). Žinoma, kad ankstyvosios AGDD formos pasireiškimas tarp miokardu sergančių žmonių yra didesnis nei tarp sveikų (Liutkeviciene et al. 2012).

Kaip minėta, vienas iš AGDD rizikos veiksnių – antsvoris (Zhang et al. 2016). Peeters su bendraautorais nustatė sąsajas tarp rs3818292 ir visceralinių riebalų kaupimosi Belgijos populiacijos vyrų grupėje. Dėl šios priežasties galima teigti, kad *SIRT1* genetiniai pokyčiai didina nutukimo riziką (Peeters et al. 2008). Liguori ir bendraautorių atliktas mokslinis darbas tarp italų nenustatė jokios rs3818292 koreliacijos su antsvorio sutrikimais (Liguori et al. 2014).

Šiuo metu nėra mokslinėje literatūroje paskelbtų analogiškų tyrimų rezultatų, kurie tiesiogiai sietų *SIRT* rs3758391 ir rs3818292 polimorfizmus su AGDD liga. Tačiau, išanalizavus kitų mokslininkų atliktus tyrimus, galima išvelgti netiesioginę abiejų polimorfizmų sąsają su šia liga.

IŠVADOS

1. *SIRT1* rs3818292 AG ir GG genotipai bei kiekvienas G alelis didina galimybę susirgti eksudacine AGDD. Papildomai AG genotipas didina galimybę susirgti pradine AGDD. Galimybę susirgti eksudacine AGDD taip pat didina kiekvienas *SIRT1* rs3758391 T alelis.
2. *SIRT1* rs3818292 AG ir GG genotipai bei kiekvienas G alelis didina galimybę susirgti pradine ir eksudacine AGDD vyrams. Tačiau moterims reikšmingų sąsajų nenustatyta.
3. *SIRT1* rs3818292 AG ir GG genotipai bei kiekvienas G alelis didina galimybę susirgti eksudacine AGDD vyresniems nei 70 metų žmonėms. *SIRT1* rs3758391 TT genotipas ir kiekvienas T alelis didina galimybę susirgti eksudacine AGDD jaunesniems nei 70 metų žmonėms.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

KRISTĖ KAIKARYTĖ

SIRT1 rs3758391 ir rs3818292 genų polimorfizmų sąsajos su amžinės geltonosios dėmės pasireiškimu

Genetikos magistrinių studijų baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Amžinė geltonosios dėmės degeneracija (AGDD) - tai progresuojanti neurodegeneracinė akių liga, pažeidžianti tinklainėje esančią geltonąją dėmę, kuri atsakinga už centrinį matymą. AGDD yra viena iš pagrindinių aklumo atsiradimo priežasčių išsivysčiusiose šalyse. Per pastarąjį dešimtmetį vis daugiau dėmesio skiriama naujų genetinių žymenų paieškai ir jų sąsajoms su AGDD.

Šio darbo tikslas - nustatyti galimas vieno nukleotido polimorfizmų *SIRT1* rs3818292 ir rs3758391 sąsajas su AGDD pasireiškimu Lietuvos populiacijoje.

Ištirti 746 amžine geltonosios dėmės degeneracija sergantys asmenys ir 323 sveiki tiriamieji. DNR skyrimas buvo vykdomas iš veninio kraujo leukocitų druskų nusodinimo metodu (*angl. DNA salting-out*). Genotipavimas atliktas naudojant realaus laiko polimerazės grandinės reakcijos metodą. Rezultatai vertinti "IBM SPSS Statistics" kompiuterine programa.

Išvados. *SIRT1* rs3818292 AG ir GG genotipai bei kiekvienas G alelis didina galimybę susirgti eksudacine AGDD. Papildomai, AG genotipas didina galimybę susirgti pradine AGDD. Taip pat, AG ir GG genotipai bei kiekvienas G alelis didina galimybę susirgti ir eksudacine, ir pradine AGDD vyresniame amžiuje, tačiau tik vyrams. Moterims nenustatyta statistiškai reikšmingų rezultatų. *SIRT1* rs3758391 kiekvienas T alelis didina galimybę susirgti eksudacine AGDD. TT genotipas ir kiekvienas T alelis didina galimybę susirgti eksudacine AGDD jaunesniems nei 70 metų amžiaus žmonėms.

VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

Institute of Biosciences

KRISTĖ KAIKARYTĖ

Associations Between *SIRT1* rs3758391 and rs3818292 Genes Polymorphisms and Age-related Macular Degeneration

Master Thesis

SUMMARY

Age-related macular degeneration (AMD) is a progressive neurodegenerative eye disease which damages the macula in the retina. The macula is responsible for central vision. AMD is one of the main causes of vision loss especially in developed countries. Many genetic variants have been consistently assessed to contribute with AMD over the last decade.

The goal of this study is to determine the correlation between *SIRT1* rs3758391 and rs3818292 gene polymorphisms and the occurrence of age-related macular degeneration. 756 patients with AMD and 323 healthy control group subjects were examined. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using DNA salting-out method. Genotyping was carried out using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method. Statistical analysis was performed with „SPSS version 20.0“.

Conclusions. AG and GG genotypes and each allele A at *SIRT1* rs3818292 are associated with increased odds of exudative AMD. Moreover, AG genotype is associated with increased risk of early AMD. AG and GG genotypes and each allele G at *SIRT1* rs3818292 are associated with increased risk of early and exudative AMD in males and in older age. However, in females no statistically results were found. *SIRT1* rs3758391 each allele C is associated with increased risk of exudative AMD. Additionally, CC genotype and each allele C is associated with increased risk of exudative AMD in younger age.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Agarwal, A., Rhoades, W. R., Hanout, M., Soliman, M. K., Sarwar, S., Sadiq, M. A., Sepah, Y. J., Do, D. V., Nguyen, Q. D. (2015). Management of neovascular age-related macular degeneration: current state-of-the-art care for optimizing visual outcomes and therapies in development. *Clin Ophthalmol* 9:1001–1015.
2. Alves, L. F., Fernandes, B. F., Burnier, J. V., Mansure, J. J., Maloney, S., Odashiro, A. N., Anteck, E. De Souza, D. F., Burnier, M. N. (2012). Expression of SIRT1 in ocular surface squamous neoplasia. *Cornea* 31(7):817-819.
3. Al-Zamil, W. M., Yassin, S. A. (2017). Recent developments in age-related macular degeneration: a review. Al-Zamil WM, Yassin SA. Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clin Interv Aging* 12:1313–1330.
4. Autiero, I., Costantini, S., Colonna, G. (2008). Human sirt-1: molecular modeling and structure-function relationships of an unordered protein. *PLoS one* 4(10):e7350.
5. Ao, J., Wood, J.P., Chidlow, G., Gillies, M.C., Casson, R.J. (2018). Retinal pigment epithelium in the pathogenesis of age-related macular degeneration and photobiomodulation as a potential therapy?. *Clin Exp Ophthalmol* 46(6):670-686.
6. Ardeljan, D., Meyerle, C. B., Agron, E., Wang, J. J., Mitchell, P. et al. (2013). Influence of TIMP3/SYN3 polymorphisms on the phenotypic presentation of age-related macular degeneration. *Eur J Hum Genet* 21(10):1152-1157.
7. Balaiya, S., Abu-Amero, K. K., Kondkar, A. A., Chalam, K. V. (2017). Sirtuins expression and their role in retinal diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2017:3187594.
8. Ban, N., Ozawa, Y., Inaba, T., Miyake, S., Watanabe, M., et al. (2013). Light–dark condition regulates sirtuin mRNA levels in the retina. *Exp Gerontol* 48(11):1212-1217.
9. Bhattacharya, S., Chaum, E., Johnson, D. A., Johnson, L. R. (2012). Age-related susceptibility to apoptosis in human retinal pigment epithelial cells is triggered by disruption of p53-Mdm2 association. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(13):8350–8366.
10. Boyer, D. S., Schmidt-Erfurth, U., van Lookeren Campagne, M., Henry, E. C., Brittain, C. (2017). THE PATHOPHYSIOLOGY OF GEOGRAPHIC ATROPHY SECONDARY TO AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION AND THE COMPLEMENT PATHWAY AS A THERAPEUTIC TARGET. *Retina* 37(5):819–835.

11. Bora, N. S., Matta, B., Lyzogubov, V. V., Bora, P. S. (2015). Relationship between the complement system, risk factors and prediction models in age-related macular degeneration. *Mol Immunol* 63(2):176-183.)
12. Chakravarthy, U., McKay, G. J., de Jong, P. T., Rahu, M., Seland, J. et al. (2013). ARMS2 increases the risk of early and late age-related macular degeneration in the European Eye Study. *Ophthalmology* 120(2), 342-348.
13. Chen, C. Y., Dai, C. S., Lee, C. C., Shyu, Y. C., Huang, T. S. et al. (2017). Association between macular degeneration and mild to moderate chronic kidney disease: A nationwide population-based study. *Medicine* 96(11):e6405.
14. Cheng, H. L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J. P., Gu, Y., et al. (2003). Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19):10794–10799.
15. Cheng, J., Cho, M., Cen, J. M., Cai, M. Y., Xu, S. et al. (2015). A TagSNP in SIRT1 gene confers susceptibility to myocardial infarction in a Chinese Han population. *PloS one* 10(2):e0115339.
16. Cheung, N., Shankar, A., Klein, R., Folsom, A. R., Couper, D. J., Wong, T. Y. (2007). Age-related macular degeneration and cancer mortality in the atherosclerosis risk in communities study. *Arch Ophthalmol* 125(9):1241-1247.
17. Chou, R., Dana, T., Bougatsos, C., Grusing, S., Blazina, I. (2016). Screening for impaired visual acuity in older adults: updated evidence report and systematic review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA* 315(9):915-933.
18. Clemons, T. E., Milton, R. C., Klein, R., Seddon, J. M., Ferris, F. L. et al. (2005). Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology* 112(4):533–539.
19. Colijn, J. M., Buitendijk, G., Prokofyeva, E., Alves, D., Cachulo, M. L., Khawaja, A. P., Cougnard-Gregoire, A., Merle, B., Korb, C., Erke, M. G., Bron, A., Anastasopoulos, E., Meester-Smoor, M. A., Segato, T., Piermarocchi, S., de Jong, P., Vingerling, J. R., Topouzis, F., Creuzot-Garcher, C., Bertelsen, G., European Eye Epidemiology (E3) consortium. (2017). Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. *Ophthalmology*, 124(12):1753–1763.

20. Consiglio, C. R., Da Silveira, S. J., Monticciolo, O. A., Xavier, R. M., Brenol, J. C. T., Chies, J. A. B. (2014). SIRT1 promoter polymorphisms as clinical modifiers on systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* 41(7):4233-4239.
21. Crabb, J. W. (2014). The proteomics of drusen. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4(7):a017194.
22. Cruz, M., Valladares-Salgado, A., Garcia-Mena, J., Ross, K., Edwards, M. et al. (2010). Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metab Res Rev* 26(4):261-270.
23. Cukras, C., Agrón, E., Klein, M. L., Ferris III, F. L., Chew, E. Y. et al. (2010). Natural history of drusenoid pigment epithelial detachment in age-related macular degeneration: Age-Related Eye Disease Study Report No. 28. *Ophthalmology* 117(3):489-499.
24. Curcio, C. A. (2018). Soft Drusen in Age-Related Macular Degeneration: Biology and Targeting Via the Oil Spill Strategies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59(4):AMD160–AMD181.
25. Davenport, A. M., Huber, F. M., Hoelz, A. (2014). Structural and functional analysis of human SIRT1. *J Mol Biol* 426(3):526–541.
26. Edwards, A. O., Ritter, R., Abel, K. J., Manning, A., Panhuysen, C., Farrer, L. A. (2005). Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308(5720):421-424.
27. Ferrara, N., Damico, L., Shams, N., Lowman, H., Kim, R. (2006). Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 26(8):859-870.
28. Finger, R. P., Wu, Z., Luu, C. D., Kearney, F., Ayton, L. N., et al. (2014). Reticular pseudodrusen: a risk factor for geographic atrophy in fellow eyes of individuals with unilateral choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 121(6):1252-1256.
29. Fritsche, L. G., Fariss, R. N., Stambolian, D., Abecasis, G. R., Curcio, C. A., Swaroop, A. (2014). Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 15:151–171.
30. Fritsche, L. G., Igl, W., Bailey, J. N. C., Grassmann, F., Sengupta, S. et al. (2016). A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat Genet* 48(2):134-143.

31. Gass, J. D. M., Agarwal, A., Lavina, A. M., Tawansy, K. A. (2003). Focal inner retinal hemorrhages in patients with drusen: an early sign of occult choroidal neovascularization and chorioretinal anastomosis. *Retina* 23(6), 741-751.
32. Gray, S. G., Ekström, T. J. (2001). The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 262(2):75-83.
33. Guarente, L. (2011). Sirtuins, aging, and medicine. *N Engl J Med* 364(23):2235-2244. Top of Form
34. Heesterbeek, T. J., Lorés-Motta, L., Hoyng, C. B., Lechanteur, Y., den Hollander, A. I. (2020). Risk factors for progression of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Physiol Opt* 40(2):140–170.
35. Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L., Wong, R. O. (2014). Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog Retin Eye Res* 42:44-84.
36. Hou, J., Ding, J., Li, L., Peng, Y., Gao, X., Guo, Z. (2019). Association of sirtuin 1 gene polymorphisms with nephrolithiasis in Eastern chinese population. *Ren Fail* 41(1):34–41.
37. Hu, Y., Wang, L., Chen, S., Liu, X., Li, H. et al. (2014). Association between the SIRT1 mRNA expression and acute coronary syndrome. *J Atheroscler Thromb* 24:844.
38. Huang, J., Sun, L., Liu, M., Zhou, L., Lv, Z. P. et al. (2013). Association between SIRT1 gene polymorphisms and longevity of populations from Yongfu region of Guangxi. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 30(1):55-59.
39. Huhtiniemi, T., Wittekindt, C., Laitinen, T., Leppänen, J., Salminen, A., Poso, A., Lahtela-Kakkonen, M. (2006). Comparative and pharmacophore model for deacetylase SIRT1. *J Comput Aided Mol Des* 20(9):589-599.
40. Jaliffa, C., Ameqrane, I., Dansault, A., Leemput, J., Vieira, V. et al. (2009). Sirt1 involvement in rd10 mouse retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(8):3562-3572.
41. Joachim, N., Mitchell, P., Kifley, A., Rochtchina, E., Hong, T., Wang, J. J. (2013). Incidence and progression of geographic atrophy: observations from a population-based cohort. *Ophthalmology* 120(10):2042-2050.
42. Kamel, C., Abrol, M., Jardine, K., He, X., McBurney, M. W. (2006). SirT1 fails to affect p53-mediated biological functions. *Aging cell* 5(1):81-88.

43. Kan, Y., Ge, P., Wang, X., Xiao, G., Zhao, H. (2018). SIRT1 rs3758391 polymorphism and risk of diffuse large B cell lymphoma in a Chinese population. *Cancer Cell In* 18:163.
44. Khan, M. A., Gurunadh, V. S. (2014). Is sunlight exposure a risk factor for age related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis. *Med J Armed Forces India* 70(1):47.
45. Kijlstra, A. and Berendschot, T. T. (2015). Age-related macular degeneration: a complementopathy? *Ophthalmic Res* 54(2):64-73.
46. Kilic, U., Gok, O., Erenberk, U., Dundaroz, M. R., Torun, E. et al. (2015). A remarkable age-related increase in SIRT1 protein expression against oxidative stress in elderly: SIRT1 gene variants and longevity in human. *PloS one* 10(3):e0117954.
47. Klein, B. E., Howard, K. P., Gangnon, R. E., Dreyer, J. O., Lee, K. E., Klein, R. (2012). Long-term use of aspirin and age-related macular degeneration. *JAMA* 308(23):2469-2478.
48. Klein, M. L., Mauldin, W. M., Stoumbos, V. D. (1994). Heredity and age-related macular degeneration: observations in monozygotic twins. *Arch Ophthalmol* 112(7):932-937.
49. Klein, R., Myers, C. E., Lee, K. E., Gangnon, R. E., Sivakumaran, et al. (2015). Small Drusen and Age-Related Macular Degeneration: The Beaver Dam Eye Study. *J Clin Med* 4(3):424-440.
50. Kuningas, M., Putters, M., Westendorp, R. G., Slagboom, P. E., Van Heemst, D. (2007). SIRT1 gene, age-related diseases, and mortality: the Leiden 85-plus study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62(9):960-965.
51. Lambert, N. G., ElShelmani, H., Singh, M. K., Mansergh, F. C., Wride, M. A. et al. (2016). Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 54:64-102.
52. Lee, S. H., Lee, J. H., Lee, H. Y., Min, K. J. (2019). Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB reports* 52(1):24.
53. Liguori, R., Labruna, G., Alfieri, A., Martone, D., Farinaro, E. et al. (2014). The FTO gene polymorphism (rs9939609) is associated with metabolic syndrome in morbidly obese subjects from southern Italy. *Mol Cell Probes* 28(4):195-199.
54. Liutkeviciene R, Lesauskaite V, Zaliuniene D, et al. (2012). Early age-related macular degeneration in patients with myocardial infarction. *Curr Eye Res* 37(2):94-100.

55. Longo, V. D., Kennedy, B. K. (2006). Sirtuins in aging and age-related disease. *Cell* 126(2):257-268.
56. Luo, H., Zhou, M., Ji, K., Zhuang, J., Dang, W., Fu, S., Sun, T., Zhang, X. (2017). Expression of Sirtuins in the Retinal Neurons of Mice, Rats, and Humans. *Front Aging Neurosci* 9:366.
57. Lv, Y., Lin, S., Peng, F. (2017). SIRT1 gene polymorphisms and risk of lung cancer. *Cancer Manag Res* 9:381–386.
58. Ma, L., Tang, F. Y., Chu, W. K., Young, A. L., Brelen, M. E. et al. (2016). Association of toll-like receptor 3 polymorphism rs3775291 with age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 6:19718.
59. Maeda, S., Koya, D., Araki, S. I., Babazono, T., Umezono, T. et al. (2011). Association between single nucleotide polymorphisms within genes encoding sirtuin families and diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Clin Exp Nephrol* 15(3):381–390.
60. Maloney, S. C., Anteck, E., Odashiro, A. N., Fernandes, B. F., Doyle, M. et al. (2012). Expression of SIRT1 and DBC1 in developing and adult retinas. *Stem cells international* 2012: 908183.
61. Masland, R. H. (2001). The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4(9):877-886.
62. McGuinness, M. B., Karahalios, A., Simpson, J. A., Guymer, R. H., Robman, L. D. et al (2016). Past physical activity and age-related macular degeneration: the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Br J Ophthalmol* 100(10):1353-1358.
63. Meyers, S. M., Greene, T., Gutman, F. A. (1995). A twin study of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 120(6):757-766.
64. Morgan, I. G., Boelen, M. K. (1996). A retinal dark-light switch: a review of the evidence. *Vis Neurosci* 13(3):399-409.
65. Peeters, A. V., Beckers, S., Verrijken, A., Mertens, I., Roevens, P. et al. (2008). Association of SIRT1 gene variation with visceral obesity. *Hum Genet* 124(4):431.
66. Peng, C. H., Cherng, J. Y., Chiou, G. Y., Chen, Y. C., Chien, C. H., (2011). Delivery of Oct4 and SirT1 with cationic polyurethanes-short branch PEI to aged retinal pigment epithelium. *Biomaterials* 32(34):9077-9088.
67. Peng, Y., Zhang, G., Tang, H., Dong, L., Gao, C. et al. (2018). Influence of SIRT1 polymorphisms for diabetic foot susceptibility and severity. *Medicine* 97(28):e11455.


68. Pennington, K. L., DeAngelis, M. M. (2016). Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. *Eye Vis* 3(1):34.
69. Potente, M., Ghaeni, L., Baldessari, D., Mostoslavsky, R., Rossig, L. et al. (2007). SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* 21(20):2644–2658.
70. Provis, J. M., Penfold, P. L., Cornish, E. E., Sandercoe, T. M., Madigan, M. C. (2005). Anatomy and development of the macula: specialisation and the vulnerability to macular degeneration. *Clin Exp Optom* 88(5):269-281.
71. Ramírez, Á., Hernández, M., Suárez-Sánchez, R., Ortega, C., Peralta, J. et al. (2020). Type 2 diabetes-associated polymorphisms correlate with SIRT1 and TGF- β 1 gene expression. *Ann Hum Genet* 84(2):185-194.
72. Reche-Sainz, J. A., de la Torre Peral-Ortiz, M. J., Carpio-Bailen, R., Toledano-Fernandez, N. (2007). Diffuse large B cell lymphoma presenting with a bilateral serous macular detachment. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia* 82(9):559-562.
73. Reynolds, R., Rosner, B., Seddon, J. M. (2010). Serum lipid biomarkers and hepatic lipase gene associations with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 117(10):1989-1995.
74. Rizk, S. M., Shahin, N. N., Shaker, O. G. (2016). Association between SIRT1 Gene Polymorphisms and Breast Cancer in Egyptians. *PloS one* 11(3):e0151901.
75. Salminen, A., Kaarniranta, K., Kauppinen, A. (2013). Crosstalk between Oxidative Stress and SIRT1: Impact on the Aging Process. *Int J Mol Sci* 14(2):3834–3859.
76. Saraf, S. S., Ryu, C. L., Ober, M. D. (2015). The effects of cataract surgery on patients with wet macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 160(3):487-492.
77. Sarumaru, M., Watanabe, M., Inoue, N., Hisamoto, Y., Morita, E. et al. (2016). Association between functional SIRT1 polymorphisms and the clinical characteristics of patients with autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity* 49(5):329-337.
78. Sidorova-Darmos, E., Wither, R. G., Shulyakova, N., Fisher, C., Ratnam, M. et al. (2014). Differential expression of sirtuin family members in the developing, adult, and aged rat brain. *Front Aging Neurosci* 6:333.
79. SMcBurney, M. W., Yang, X., Jardine, K., Hixon, M., Boekelheide, K., et al. (2003). The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol Cell Biol* 23(1):38–54.

80. Sun, C., Zhao, M., Li, X. (2012). CFB/C2 gene polymorphisms and risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Curr Eye Res* 37(4):259-271.
81. Sparrow, J. R., Hicks, D., Hamel, C. P. (2010). The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* 10(9):802-823.
82. Tang, W., Chen, Y., Fang, X., Wang, Y., Fan, W., Zhang, C. (2018). SIRT1 rs3758391 and Major Depressive Disorder: New Data and Meta-Analysis. *Neurosci Bull* 34(5):863–866.
83. Taylor, D. J., Hobby, A. E., Binns, A. M., Crabb, D. P. (2016). How does age-related macular degeneration affect real-world visual ability and quality of life? A systematic review. *BMJ open* 6(12):e011504.
84. Thomas, J., Mohammad, S., Charnigo, R., Baffi, J., Abdel-Latif, A., Ziada, K. M. (2015). Age-Related Macular Degeneration and Coronary Artery Disease in a VA Population. *South Med J* 108(8):502–506.
85. Tikellis, G., Robman, L. D., Dimitrov, P., Nicolas, C., McCarty, C. A., Guymer, R. H. (2007). Characteristics of progression of early age-related macular degeneration: the cardiovascular health and age-related maculopathy study. *Eye* 21(2):169-176.
86. Wang, H. and Hartnett, M. E. (2016). Regulation of signaling events involved in the pathophysiology of neovascular AMD. *Mol Vis* 22:189–202.
87. Wong, W. L. Xinyi Su, Xiang Li, Chui Ming G Cheung, Ronald Klein, et al. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis”. *Lancet Glob Health* 2(2):e106-e116.
88. Yan, Q., Ding, Y., Liu, Y., Sun, T., Fritsche, L. G. et al. (2018). Genome-wide analysis of disease progression in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 27(5):929-940.
89. Yang, G., Hamadeh, I. S., Katz, J., Riva, A., Lakatos, P. et al. (2018). SIRT1/HERC4 locus associated with bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: an exome-wide association analysis. *J Bone Miner Res* 33(1):91-98.
90. Yue, X. G., Yang, Z. G., Zhang, Y., Qin, G. J., Liu, F. (2018). Correlations between SIRT1 gene polymorphisms and diabetic kidney disease. *R Soc Open Sci* 5(6):171871.

91. Zhang, Q. Y., Tie, L. J., Wu, S. S., Lv, P. L., Huang, H. W. et al. (2016). Overweight, obesity, and risk of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(3):1276-1283.
92. Zhang, W. G., Bai, X. J., Chen, X. M. (2010). SIRT1 variants are associated with aging in a healthy Han Chinese population. *Clin Chim Acta* 411(21-22):1679-1683.
93. Zhou, M., Luo, J., Zhang, H. (2018). Role of Sirtuin 1 in the pathogenesis of ocular disease. *Int J Mol Med* 42(1):13-20.

PRIEDAI

1 priedas. Kauno regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas.


KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickėvičiaus g. 9, LT-44307 Kaunas, tel. +370 37 32 68 89; e-mail: kaunoetik@ismmsi.lt

PRITARIMAS
BIOMEDICININIO TYRIMO PAPILDYMU/PRATĖSIMUI
2015-06-05 Nr. P1-BE-2-13/2008

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: „Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos ir ūminių kardiologinių išeminių sindromų sąsajos su matriksu metaloproteinazių ekspresiją koduojančių genų polimorfizmu“ (leidimo atlikti biomedicininį tyrimą leidimas 2008.02.19 Nr. BE-2-13). Išduodamas pritarimas papildymui pavadinimu: „Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos ir miego arterijos bei ūminių kardiologinių išeminių sindromų sąsajos su matriksu metaloproteinazių ekspresiją koduojančių genų polimorfizmu, imunogenetiniais veiksniais ir kraujo metabolitų profiliais“.	
Pagrindinis tyrėjas:	Prof. Vytautas Jašinskas
Biomedicininio tyrimo vieta:	LSMUL VŠĮ Kauno klinika, Akių ligų klinika Eivenių g. 2, LT-50009, Kaunas



Peržiūrėti šie [N] su minėtu tyrimu susiję dokumentai:

- [N] Biomedicininio tyrimo: „Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos ir miego arterijos bei ūminių kardiologinių išeminių sindromų sąsajos su matriksu metaloproteinazių ekspresiją koduojančių genų polimorfizmu, imunogenetiniais veiksniais ir kraujo metabolitų profiliais“ pagrindinio tyrimo prašymas dėl leidimo papildyti/pakeisti biomedicininį tyrimą;
- [N] Paraiška biomedicininiam tyrimui: „Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos ir miego arterijos bei ūminių kardiologinių išeminių sindromų sąsajos su matriksu metaloproteinazių ekspresiją koduojančių genų polimorfizmu, imunogenetiniais veiksniais ir kraujo metabolitų profiliais“;
- [N] Biomedicininio tyrimo: „Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos ir miego arterijos bei ūminių kardiologinių išeminių sindromų sąsajos su matriksu metaloproteinazių ekspresiją koduojančių genų polimorfizmu, imunogenetiniais veiksniais ir kraujo metabolitų profiliais“ protokolas nr. 2, versija Nr. 3, 2015-02-20;
- [N] Biomedicininio tyrimo: „Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos ir miego arterijos bei ūminių kardiologinių išeminių sindromų sąsajos su matriksu metaloproteinazių ekspresiją koduojančių genų polimorfizmu, imunogenetiniais veiksniais ir kraujo metabolitų profiliais“ santrauka nr. 2, versija Nr. 3, 2015-03-12;
- [N] Biomedicininio tyrimo „Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos ir miego arterijos bei ūminių kardiologinių išeminių sindromų sąsajos su matriksu metaloproteinazių ekspresiją koduojančių genų polimorfizmu, imunogenetiniais veiksniais ir kraujo metabolitų profiliais“ etinio vertinimo anketa;
- [N] Biomedicininio tyrimo: „Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos ir ūminių kardiologinių išeminių sindromų sąsajos su matriksu metaloproteinazių ekspresiją koduojančių genų polimorfizmu“ vykdymo ataskaitos santrauka. Pasirašyta pagrindinio tyrimo.
- [N] Biomedicininio tyrimo: „Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos ir miego arterijos bei ūminių kardiologinių išeminių sindromų sąsajos su matriksu metaloproteinazių ekspresiją koduojančių genų polimorfizmu, imunogenetiniais veiksniais ir kraujo metabolitų profiliais“ asmens informavimo forma, versija 2, data 2015-04-14;
- [N] Papildomai įtraukimu į biomedicininį tyrimą „Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos ir miego arterijos bei ūminių kardiologinių išeminių sindromų sąsajos su matriksu metaloproteinazių ekspresiją koduojančių genų polimorfizmu, imunogenetiniais veiksniais ir kraujo metabolitų profiliais“ tyrimą CV: Brigita Būdienė, Virginija Ašmonienė, Rasa Luitkevičienė, Romas Chaleckis.
- [N] VŠĮ LSMUL Kauno klinikų civilinės atsakomybės už pacientams padarytą žalą savanoriško draudimo liudijimas (poliusas).

[v] **Nutarta:**
[v] Pritarti biomedicininio tyrimo pakeitimams atitinkantiems pateiktus dokumentus ir išduoti pritarimą tyrimo papildymui/pratėsimui.

Kauno regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto nariai		
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis
1.	Prof. Romaldas Mačiulaitis	Klinikinė farmakologija
2.	Prof. Edgaras Stankevičius	Fiziologija, farmakologija
3.	Doc. Eimantas Pečiūis	Filosofija
4.	Dr. Ramunė Kasperavičienė	Kalbotyra
5.	Med. dr. Jonas Andriuskevičius	Chirurgija
6.	Agnė Krūšinskaitė	Teisė
7.	Prof. Skaidrius Miliauskas	Pulmonologija, vidaus ligos
8.	Med. dr. Rokas Bagdonas	Chirurgija
9.	Eglė Vaižgelienė	Visuomenės sveikata

Kauno regioninio biomedicininų tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininų tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaraucijoje, vaistų tyrimo Geros klinikinės praktikos etikos kodeksu.

Pirmininkas   Prof. Romaldas Mačiulaitis

2 priedas. Tiriamojo asmens sutikimo forma.

TIRIAMOJO ASMENS SUTIKIMO FORMA

Aš, (tiriamojo asmens vardas ir pavardė),
sutinku dalyvauti Lietuvos sveikatos mokslų universiteto KK Akių ligų klinikos atliekamame
tyrime, skirtame įvertinti genetinių veiksnių sąsajas su amžine geltonosios dėmės degeneracija.

Tiriamojo asmens _____

(Parašas)

Nr. _____ Data _____

3 priedas. Lentelės

1 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmų SIRT1 rs3818292 ir rs3758391 genotipų ir alelių dažniai sergančių pradine AGDD ir kontrolinėje grupėse pagal amžių

VNP	Genotipai / aleliai	<70 m.		p reikšmė	≥70 m.		p reikšmė
		Kontrolinė n (proc.) (n=132)	Pradinė AGDD n (proc.) (n=115)		Kontrolinė n (proc.) (n=191)	Pradinė AGDD n (proc.) (n=215)	
SIRT1 rs3818292	AA	119 (90,2)	98 (85,2)	0,124	173 (90,6)	184 (85,6)	0,173
	AG	11 (8,3)	17 (14,8)		18 (9,4)	29 (13,5)	
	GG	2 (1,5)	0 (0,0)		0 (0,0)	2 (0,9)	
	A	249 (94,3)	213 (92,6)	0,441	364 (95,3)	397 (92,3)	0,082
	G	15 (5,7)	17 (7,4)		18 (4,7)	33 (7,7)	
SIRT1 rs3758391	CC	72 (54,5)	62 (53,9)	0,605	109 (57,1)	113 (52,6)	0,541
	CT	52 (39,4)	49 (42,6)		74 (38,7)	89 (41,4)	
	TT	8 (6,1)	4 (3,5)		8 (4,2)	13 (6,0)	
	C	196 (73,2)	173 (75,2)	0,804	292 (76,4)	315 (73,3)	0,297
	T	68 (25,8)	57 (24,8)		90 (23,6)	115 (26,7)	

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; AGDD – amžinė geltonosios dėmės degeneracija.

2 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmų SIRT1 rs3818292 ir rs3758391 dvinarės logistinės regresijos analizė sergančių pradine AGDD ir kontrolinėje grupėse pagal amžių

Modelis	Genotipas/alelis	GS (95 proc. PI)	p reikšmė	AIC
<70 m.				
SIRT1 rs3818292				
Kodominantinis	A/A	1		
	A/G	1,877 (0,840–4,194)	0,125	340,311
	G/G	-	-	
Dominantinis	A/G+G/G vs. A/A	1,588 (0,735–3,430)	0,239	341,844
Recesyvinis	G/G vs. A/G+A/A	-	-	-
Viršdominantinis	A/G vs. A/A+G/G	1,908 (0,854–4,263)	0,115	340,699
Adityvinis	G	1,303 (0,649–2,618)	0,457	342,688
SIRT1 rs3758391				
Kodominantinis	C/C	1		
	C/T	1,094 (0,652–1,836)	0,733	344,219
	T/T	0,581 (0,167–2,021)	0,393	
Dominantinis	C/T+T/T vs. C/C	0,995 (0,603–1,643)	0,984	343,243
Recesyvinis	T/T vs. C/T+C/C	0,559 (0,164–1,906)	0,352	342,336
Viršdominantinis	C/T vs. T/T+C/C	-	-	-
Adityvinis	T	0,945 (0,618–1,446)	0,795	343,176
≥70 m.				
SIRT1 rs3818292				
Kodominantinis	A/A	1		
	A/G	1,515 (0,812–2,826)	0,192	561,125
	G/G	-	-	
Dominantinis	A/G+G/G vs. A/A	1,619 (0,874–3,000)	0,126	561,006

Recesyvinis	G/G vs. A/G+A/A	-	-	-
Viršdominantinis	A/G vs. A/A+G/G	1,499 (0,803–2,795)	0,204	561,766
Adityvinis	G	1,671 (0,926–3,015)	0,088	560,389
SIRT1 rs3758391				
Kodominantinis	C/C	1		
	C/T	1,160 (0,774–1,740)	0,473	564,179
	T/T	1,567 (0,625–3,930)	0,338	
Dominantinis	C/T+T/T vs. C/C	1,200 (0,811–1,776)	0,362	562,585
Recesyvinis	T/T vs. C/T+C/C	1,472 (0,597–3,632)	0,401	562,695
Viršdominantinis	C/T vs. T/T+C/C	-	-	-
Adityvinis	T	1,198 (0,862–1,667)	0,282	562,252

GS – galimybių santykis; PI – pasikliautinumo intervalas; AIC – Akaike informacijos kriterijus.

PUBLIKACIJOS

1. Liutkevičienė, Rasa; Vilkevičiūtė, Alvida; Gedvilaitė, Greta; **Kaikarytė, Kristė**; Kriaučiūnienė, Loresa. Haplotypes of HTRA1 rs1120638, TIMP3 rs9621532, VEGFA rs833068, CFI rs10033900, ERCC6 rs3793784, and KCTD10 rs56209061 gene polymorphisms in age-related macular degeneration: research article // Disease Markers. New York: Hindawi Publishing Corporation. ISSN 0278-0240. eISSN 1875-8630. 2019, vol. 2019, 9602949, p. 1–11. DOI: 10.1155/2019/9602949. [Citav. rod.: 2,761, bendr. cit. rod.: 3,312, kvartilis: Q2 (2018, InCites JCR SCIE)] [Indėlis: 0,200; indeksas: 0,167]
2. Banevičius, Mantas; Vilkevičiūtė, Alvida; Lenkšaitė, Miglė; Kriaučiūnienė, Loresa; **Kaikarytė, Kristė**; Miserevičiūtė, Jorinda; Žemaitienė, Reda; Liutkevičienė, Rasa. Naujų genetinių veiksnių paieška sergantiems amžine geltonosios dėmės degeneracija: literatūros apžvalga = New genetic factors search in patients with age related macular degeneration: Literature review // Sveikatos mokslai = Health sciences in Eastern Europe. Vilnius: Sveikatos mokslai. ISSN 1392-6373. 2017, t. 27, Nr. 4, p. 101–105. [Indėlis: 0,125]
3. **Kaikarytė, Kristė**; Liutkevičienė, Rasa. Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos sąsajos su TBX15 rs984222 bei DNM3 rs 1011731 genų šeimos nariais. Literatūros apžvalga = Associations between TBX15 rs984222 and DNM3 rs 1011731 genes polymorphisms and age-related macular degeneration // Lietuvos bendrosios praktikos gydytojas. Kaunas: Vitae Litera. ISSN 1392-3218. 2018, t. 22, Nr. 1, p. 53–59. (Literatūros apžvalga). [Indėlis: 0,500]
4. **Kaikarytė, Kristė**; Vilkevičiūtė, Alvida; Liutkevičienė, Rasa. TBX15 rs984222 gene polymorphism Association with AgeRelated Macular Degeneration by Gender // Vita Scientia: International conference „Vita Scientia“: conference book: 3rd January, 2018, Vilnius / Vilnius University. Vilnius: Vita est Scientia. ISSN 2538-791X. 2018, p. 23–24, no. 2 : pav. (Poster session). [Indėlis: 0,334]
5. **Kaikarytė, Kristė**; Vilkevičiūtė, Alvida; Liutkevičienė, Rasa. The Association between TBX15 rs984222 and age-related macular degeneration // The Vital Nature Sign: 11th International scientific conference „The Vital Nature Sign“: 19–20 October, 2017, Vilnius, Lithuania: abstract book / Vytautas Magnus University. Instrumental Analysis Open Access Center; Editors: Dr. Nicola Tiso, dr. Vilma Kaškonienė. Kaunas: Vytautas Magnus University. ISSN 2335-8653. 2017, p. 46–46, [no. VNS17/040]. [Indėlis: 0,334]