

*На правах рукописи*

**Абрамова Ольга Игоревна**

**ВОЗРАСТНАЯ МАКУЛЯРНАЯ ДЕГЕНЕРАЦИЯ:  
ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА  
И КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ**

3.1.5. Офтальмология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

**Мошетьова Лариса Константиновна** доктор медицинских наук, академик РАН, профессор

**Научный консультант:**

**Сабурина Ирина Николаевна**, доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:**

- д.м.н., профессор **Шишкин Михаил Михайлович**, Институт усовершенствования врачей ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России. Заведующий кафедрой глазных болезней

- д.м.н., **Шеремет Наталия Леонидовна**, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт глазных болезней». Главный научный сотрудник отделения патологии сетчатки и зрительного нерва.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «01» февраля 2022 г. на заседании Диссертационного совета 21.3.054.03 на базе ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России по адресу: 125995, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России по адресу: 125445, г. Москва, ул. Беломорская, д. 19 и на сайте <http://www.rmapo.ru/>

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Карпова Е.П.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы диссертации

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является одной из основных причиной центральной слепоты и слабовидения населения в развитых странах (Пупышева А. Д., Ким Е. И., 2017). В России, по разным данным, ВМД страдают от 14 до 46% лиц старше 65 лет, при этом, в ближайшие годы прогнозируется дальнейшее увеличение заболеваемости (Коняев Д. А., 2020). Согласно данным ВОЗ, доля заболевшего населения старше 60 лет в развитых странах составляет около 20%, а к 2050 году возрастёт, вероятно, до 33%. Есть основания полагать, что вариабельность данного заболевания на 71% обусловлена генетическими факторами (Lorés-Motta L., 2018). Известно от 33 до 50 генов, полиморфизмы которых могут быть ответственны за развитие возрастной макулопатии, но высоко достоверная ассоциация установлена лишь для некоторых из них (Белехова С. Г., Астахов Ю. С., 2015). При этом ни один из изученных генов не относится к регуляторам или маркерам процессов старения организма. В качестве одного из молекулярных признаков старения в 2013 г. López-Otín и соавт. было предложено прогрессирующее укорочение теломер. Установлено, что теломеры укорачиваются постепенно при каждом делении в течение всей жизни клетки, приводя к критически коротким теломерам, что, в конечном итоге, нарушает регенеративную способность тканей (Sanders J. L., 2013).

Новейшие исследования показывают, что длину теломер способны регулировать сиртуины. Являясь высоко консервативным семейством NAD-зависимых деацетилаз III класса, сиртуины регулируют основные клеточные функции, включая восстановление ДНК, экспрессию генов, метаболизм, активность теломер, апоптоз, дифференцировку клеток жировой ткани, выработку глюкозы, чувствительность к инсулину, окисление жирных кислот, нейрогенез, воспаление и старение (Lee S. H., 2019, Amano H, 2019).

Несмотря на развитие современной науки и внедрение в офтальмологическую практику новейших диагностических методов, патогене-

тические механизмы развития ВМД не разрешены и требуют дальнейшего изучения особенностей течения, профилактики и лечения данного заболевания в разных возрастных группах пациентов (Jalbert I., 2020, Коненков В. И., 2019), что определяет остроту проблемы и обосновывает актуальность настоящей диссертационной работы.

### **Степень разработанности темы**

Результаты ранее опубликованного исследования Weng X. в 2015 году показали, что длина теломер связана с риском развития ВМД: были выявлены более короткие теломеры лейкоцитов периферической крови у представителей популяции Китая, страдающих ВМД, в основном с географической атрофией, в сравнении с группой без ВМД. Однако по данным исследования Immonen I. и соавт., 2013, проводимого в другой популяции, различий в длине теломер лейкоцитов периферической крови, как у пациентов с ВМД в сравнении с группами здоровых лиц, так и при сравнении групп пациентов с сухой или влажной ВМД, не было установлено. Исследование Chen Z. и соавт. в 2015 году у китайцев продемонстрировало, что полиморфизм rs12778366 в промоторной области SIRT1 был значительно связан с ВМД в рецессивной и кодоминантной моделях. Однако подобных исследований в популяции Российской Федерации до настоящего времени не проводилось.

Учитывая клиническую и социальную значимость данной патологии, необходимо выявление информативных диагностических критериев для ранней диагностики возрастной макулярной дегенерации, которые будут обосновываться не только офтальмологическими данными, но и подтверждаться генетическими маркерами, что даст возможность разработать персонализированный подход к профилактике и лечению ВМД в каждом конкретном случае.

В связи с этим, **целью** настоящего исследования является персонализация диагностики и лечения возрастной макулярной дегенерации на основе сравнительного изучения возрастных патоморфологических и генетических особенностей заболевания.

### **Задачи исследования**

1. Изучить влияние полиморфизма rs12778366 гена SIRT1 на риск развития возрастной макулярной дегенерации и на ее течение в различных возрастных группах.

2. Оценить ассоциацию относительной длины теломер с риском развития возрастной макулярной дегенерации и тяжестью ее течения в различных возрастных группах пациентов.

3. Выявить корреляционные связи генетического полиморфизма rs12778366, длины теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы и тяжести течения возрастной макулярной дегенерации.

4. Установить степень влияния полиморфизма rs12778366 гена SIRT1 и длины теломер клеток эпителия роговицы на терапевтический ответ при лечении возрастной макулярной дегенерации ингибиторами ангиогенеза.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Доказано, что у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией с тяжелым клиническим течением заболевания регистрируются грубые морфологические изменения макулы (средние и крупные друзы, патологическая неоваскуляризация, фиброваскулярная пролиферация, географическая атрофия, субретинальный рубец), что ассоциировано с носительством генотипа TC rs12778366 гена SIRT1 и укорочением длины теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы. Между этими признаками существует тесная корреляционная связь, что обосновывает использование их как критерия прогноза развития и тяжести течения возрастной макулярной дегенерации.

2. Установлено, что при возрастной макулярной дегенерации отмечается укорочение длины теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы по сравнению с пациентами без патологических изменений на глазном дне, что свидетельствует о раннем репликативном старении у лиц, страдающих возрастной макулярной дегенерацией. Это позволяет рассматривать укорочение длины теломер как биомаркера старения. Выявленная взаимосвязь подтверждает значимость данного маркера как критерия ранней доклинической диагностики и прогноза течения данного заболевания.

## Научная новизна

Впервые определены риск развития и особенности клинического течения возрастной макулярной дегенерации в зависимости от полиморфизма rs12778366 SIRT1 и длины теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы.

Доказано, что у пациентов с возрастной макулопатией при распределении генотипов по полиморфному локусу rs12778366 SIRT1 наибольшей значимостью обладает генотип TC, который увеличивает риск развития возрастной макулярной дегенерации и предрасполагает к тяжелому течению данного заболевания.

Выявлено, что терапевтический ответ на лечение влажной формы возрастной макулярной дегенерации препаратом афлиберцепта изменяется в зависимости от полиморфизма rs12778366 гена SIRT1.

Установлено, что относительная длина теломер клеток эпителия роговицы является более чувствительным показателем оценки генетических изменений, определяющих течение возрастной макулярной дегенерации в разных возрастных группах, по сравнению с длиной теломер клеток буккального эпителия.

**Теоретическая и практическая значимость.** Теоретическая значимость работы обоснована тем, что в ходе исследования был выявлен один из маркеров раннего репликативного старения у пациентов, страдающих ВМД, выражающийся в укорочении теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы по сравнению с группой контроля. Также впервые доказано влияние полиморфизма rs12778366 гена SIRT1 на риск развития ВМД в популяции Российской Федерации. Отражением этого является статистически значимое увеличение частоты встречаемости генотипа TC полиморфизма rs12778366 SIRT1 у пациентов основной группы по сравнению с группой контроля. Практическая значимость результатов диссертационной работы заключается в том, что выявленная взаимосвязь полиморфного локуса rs12778366 SIRT1 и длины теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы с риском развития ВМД и ее течением позволяет прогнозировать риск развития данной патоло-

гии на доклиническом этапе развития, способствовать разработке новых стратегий лечения в соответствии с особенностями клинического течения. Применение генетического скрининга у лиц из группы риска позволит своевременно проводить профилактические мероприятия. Практическая значимость результатов, полученных при осуществлении диссертационного исследования, подчеркивается поданной заявкой на патент «Способ определения риска развития возрастной макулярной дегенерации и подбор препарата для лечения» №2021124419 от 17.08.21.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности полученных результатов обеспечивается научной постановкой цели и задач исследования, достаточной выборкой (210 пациентов, 306 глаз), применением современных высокоинформативных методов обследования и лечения пациентов (оптическая когерентная томография, микропериметрия, фоторегистрация глазного дна), а также статистической обработки результатов исследования.

Проведение диссертационного исследования «Возрастная макулярная дегенерация: особенности морфогенеза и клинического течения» одобрено Комитетом по этике научных исследований ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (протокол № 3 от 19.02.2019).

Апробация диссертации состоялась на расширенном заседании кафедры офтальмологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (протокол №14 от 30.08.2021). Основные положения диссертации доложены и обсуждены на XXVII международном офтальмологическом конгрессе «Белые ночи», международных конференциях «Трансляционная медицина: возможное и реальное» в 2020 и 2021 годах, на заседании кафедры офтальмологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России и сотрудников Московского офтальмологического центра ДЗМ ГБУЗ им. С. П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы.

Исследование проводилось в рамках государственного задания Рег. № НИОКТР АААА-А20-120031090034.

**Внедрение результатов работы в практику.** Результаты диссертационной работы внедрены в клиническую практику Московско-

го офтальмологического центра ДЗМ ГБУЗ им. С. П. Боткина (акт внедрения от 01.08.2020). Результаты научных исследований включены в раздел №9 «Заболевания сетчатки» основной профессиональной образовательной программы высшего образования – программа подготовки кадров высшей квалификации в ординатуре по специальности 31.08.59 Офтальмология, в учебные планы циклов повышения квалификации врачей-офтальмологов кафедры офтальмологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

**Публикации.** По теме диссертационной работы опубликовано 7 печатных работ, из них 4 в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, и в международных базах данных и системах цитирования SCOPUS.

**Личный вклад автора.** Автор принимал непосредственное участие в выполнении всех этапов научной работы: анализ научной отечественной и зарубежной литературы, обосновании актуальности темы исследования и степени разработанности проблемы, формулирование цели и задач, определение методологического подхода и методов их решения, проведение анализа полученных данных, обобщение результатов, формирование выводов и положений, выносимых на защиту, и практических рекомендаций, подготовка материалов для публикации по теме диссертационной работы. Автором лично производился сбор материала, офтальмологические исследования, забор образцов буккального эпителия и эпителия роговицы для генетического тестирования).

**Соответствие диссертации Паспорту научной специальности.** Диссертация «Возрастная макулярная дегенерация: особенности морфогенеза и клинического течения» соответствует формуле специальности 3.1.5. Офтальмология (Медицинские науки) и областям исследования: п. 1 «Разработка новых и усовершенствование известных методов обследования органа зрения и его придатков, методов диагностики различных заболеваний».

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 121 странице печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 38 таблицами и 56 рисунками. Список литературы содержит 268 источников (47 отечественных, 221 зарубежных).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материал и методы**

Исследование проводилось на кафедре офтальмологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, в городском московском офтальмологическом центре ГБУЗ ГКБ им С. П. Боткина ДЗМ и НИИ Общей патологии и патофизиологии.

Обследовано 210 пациентов (306 глаз). Средний возраст –  $70,83 \pm 10,44$  лет. Из них 140 пациентов (33 мужчины, 107 женщин) составили основную группу, в которую вошли пациенты с ВМД, а 70 пациентов – группу контроля. Согласно задачам диссертационной работы 96 пациентам (26 мужчин и 70 женщин), средний возраст которых составил  $70,96 \pm 9,72$  лет, проводились диагностические манипуляции, а 44 пациентам (37 женщин, 7 мужчин; средний возраст  $73,11 \pm 9,19$  лет) – наряду с диагностическими процедурами, проводилось лечение препаратом афлиберцепта по фиксированной схеме с проведением загрузочных инъекций (три инъекции с интервалом в 1 месяц).

В группу контроля вошли 22 мужчины и 48 женщин без патологических изменений на глазном дне, характерных для ВМД. Средний возраст –  $69,23 \pm 11,91$  лет.

Критерием включения для основной группы был установленный диагноз ВМД, сухой или влажной форм на одном или двух глазах.

Для группы контроля: отсутствие патологических изменений макулярной области, характерных для ВМД.

Критериями невключения были любые другие глазные заболевания, которые могут повлиять на результат и анализ результатов,

общие соматические заболевания в стадии суб- или декомпенсации и наличие аутоиммунных или онкологических заболеваний.

Для анализа возрастных морфогенетических особенностей 96 пациентов основной группы были распределены по следующим подгруппам (Рисунок 1) согласно классификации ВОЗ (2016 г.):

1. 45–59 лет (средний возраст). 18 пациентов (36 глаз), из них 9 мужчин и 9 женщин. Средний возраст пациентов в группе составил  $55,17 \pm 4,33$

2. 60–74 года (пожилой возраст). 38 пациентов (76 глаз), из них 7 мужчин и 31 женщина. Средний возраст пациентов в группе составил  $69,29 \pm 4,11$

3. 75–90 лет (старческий возраст). 40 пациентов (80 глаз), из них 10 мужчин и 30 женщин. Средний возраст пациентов в группе составил  $79,65 \pm 3,27$ .

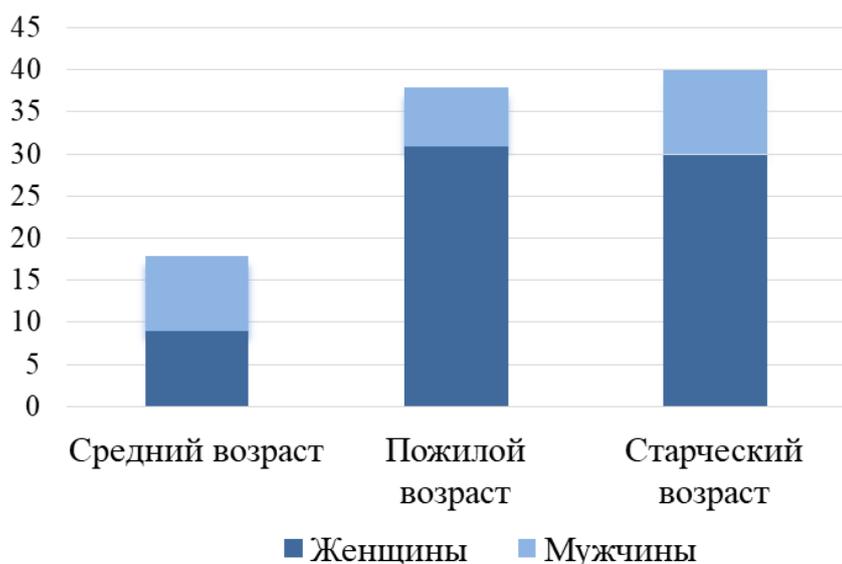


Рисунок 1. Распределение по половой принадлежности 96 пациентов основной группы в средней, пожилой и старческой возрастных группах

Для анализа ассоциации генетических особенностей и тяжести течения ВМД глаза 96 пациентов основной группы были распределены по следующим подгруппам согласно классификации AREDS:

1. Ранняя стадия ВМД (категория 2 AREDS). Женщин 34 и мужчин 20 (54 глаза). Средний возраст пациентов составил  $70,22 \pm 9,97$ .

2. Промежуточная стадия ВМД (категория 3 AREDS). Женщин 37 и 7 мужчин (44 глаза). Средний возраст пациентов составил  $71,64 \pm 9,09$ .

3. Поздняя стадия ВМД (категория 4 AREDS). Женщин 67 и мужчин 24 (91 глаз). Средний возраст пациентов составил  $71,71 \pm 9,29$ .

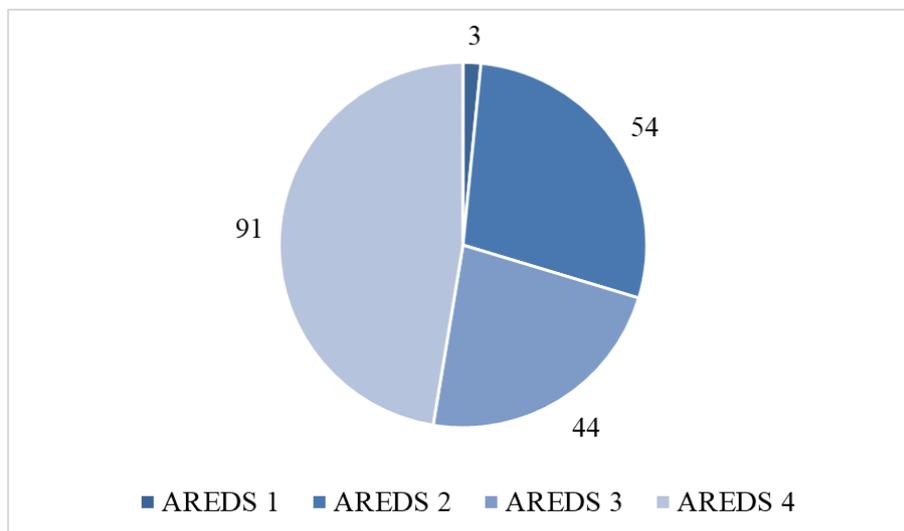


Рисунок 2. Распределение глаз 96 пациентов основной группы по категориям AREDS

**Офтальмологическое обследование** включало стандартные и специальные методы обследования: сбор анамнеза, рефрактометрию на приборе «Canon» (Full Auto Refkeratometer RK-F1, визометрию при помощи проектора опто типов «Tomey (TCP-1000)»<sup>2</sup> и стандартного набора стекол (анализировалас<sup>47</sup>ь МКОЗ), тонометрию при помощи пневмотонометра «Huvitz (HNT-7000)».

Сбор анамнестических и клинико-диагностических данных проводился с анализом сопутствующих заболеваний и факторов риска развития ВМД. У пациентов основной и контрольной групп учитывалась следующие факторы: женский пол, отягощенный по ВМД семейный анамнез, курение, высокий индекс массы тела, сниженная двигательная нагрузка, атеросклероз, гиперлипидемия (высокий уровень холестерина в крови), гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, инфаркты и инсульты в анамнезе, высокий уровень фибриногена плазмы крови, повышенный уровень С-реактивного

белка в сыворотке крови, сахарный диабет, хронические заболевания ЖКТ, прием антиоксидантных препаратов.

Биомикроскопическое и офтальмоскопическое исследование выполняли с помощью щелевой лампы «Торсон (SL-1E)». Стекловидное тело и глазное дно исследовали в условиях максимального мидриаза с 3-зеркальной линзой Гольдмана. Фоторегистрация глазного дна проводилась на фоторегистраторе цифровой фундус-камеры (Visucam 500) фирмы «Zeiss». Оптическую когерентную томографию (ОКТ) проводили на RTVue-100, фирмы «Optovue» и Spectralis HRA+ОСТ (Heidelberg Engineering). Микропериметрия была проведена пациентам из основной группы на фундус-микропериметре MAIA, фирмы CenterVue.

**Молекулярно-генетические методы.** Исследования проводились на базе ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» под руководством д. б. н. И. Н. Сабуриной. Биоматериалом для молекулярно-генетического исследования служили образцы буккального эпителия и образцы эпителия роговицы. Методика забора образцов клеток буккального эпителия и клеток роговицы соответствовала стандартным лабораторным протоколам ([https://helix.ru/site/page/61#collect\\_conjunctiva](https://helix.ru/site/page/61#collect_conjunctiva); [https://helix.ru/site/page/61#collect\\_buccal](https://helix.ru/site/page/61#collect_buccal)). Выделение ДНК из клеток буккального эпителия и клеток эпителия роговицы проводили стандартным методом с использованием протеиназы К и фенол-хлороформа. Количество и качество выделенной ДНК оценивалось на спектрофотометре NanoDrop 1000. Генотипирование полиморфного локуса rs12778366 гена SIRT1 проводили методом ПЦР в реальном времени на программируемом амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad, США) с использованием технологии конкурирующих зондов TaqMan. Специфические праймеры были синтезированы компанией ЗАО «Евроген». Анализ длины теломер в клетках буккального эпителия и клетках эпителия роговицы проводился методом ПЦР в реальном времени на программируемом амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad, США) по оригинальному протоколу (Cawthon, 2002) с использованием специфических праймеров. Все полученные данные

проанализированы с помощью программного обеспечения CFX Manadger TM, (Bio-Rad). Относительную длину теломер оценивали по показателю T/S, который рассчитывали как отношение числа копий теломерных повторов к числу копий референсного гена.

### **Статистические методы обработки результатов исследования**

Статистическая обработка полученных данных исследования проводилась с использованием программного пакета IBM SPSS STATISTICA Version 20.0 и Microsoft Office Excel 2016. В качестве основных показателей для сравнительного анализа применяли среднее значение ( $M$ ) со стандартным отклонением от среднего значения ( $s$ ). Для качественных переменных результатов были представлены как в абсолютных, так и относительных (%) значениях. Сравнение количественных данных проводили с помощью критериев Манна – Уитни и Краскела – Уоллеса. Статистическая достоверность различий групп для качественных показателей осуществлялась с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона и метода МакНеймера. Анализ взаимосвязей проводился на основе непараметрической ранговой корреляции по Спирмену. Анализ динамики показателей для сравнения двух периодов осуществлялся на основе непараметрического теста Уилкоксона. Для анализа влияния сразу нескольких независимых переменных на зависимую использовался многофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Уровень значимости считался значимым при  $p \leq 0,05$ .

Статистическая обработка результатов молекулярно-генетического исследования осуществлялась с помощью тестов на соблюдение равновесия Харди – Вайнберга и выявление ассоциаций методом в программе DeFinetti (в режиме свободного доступа на сайте Института генетики человека (Германия), <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Достоверными считали различия при уровне ошибки  $p \leq 0,01$ . Сила ассоциации анализируемых признаков определялась с помощью величины отношения шансов (ОШ) с доверительным интервалом (ДИ) при 95% уровне значимости. Предполагаемый фактор риска считался значимым для развития патологии при значении показателя ОШ с поправкой на ДИ больше единицы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### *Взаимосвязь особенностей клинического течения возрастной макулярной дегенерации с полиморфным локусом rs12778366 гена SIRT1 и длиной теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы*

При анализе 96 пациентов основной группы и группы контроля достоверных различий в возрастно-половых показателях не выявлено ( $p > 0,05$ ). Средний возраст пациентов основной группы составил  $70,96 \pm 9,72$ , группы контроля –  $69,23 \pm 11,91$ . Женский пол составил 73,96% от общего количества пациентов основной группы и 68,57% от пациентов группы контроля. Мужской пол – 26,04% от пациентов основной группы и 31,43% от пациентов группы контроля. При сравнительном анализе в основной группе было выявлено статистически значимое увеличение частоты встречаемости таких показателей, как: высокий ИМТ ( $P = 0,0086$ ), атеросклероз ( $P = 0,0010$ ), сахарный диабет ( $P = 0,0273$ ), светлый цвет радужки ( $P = 0,0192$ ), ишемическая болезнь сердца ( $P = 0,0107$ ), гиподинамия ( $P < 0,0001$ ). Частота приема антиоксидантных препаратов была выше у пациентов основной группы ( $P = 0,0048$ ).

При анализе частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного локуса rs12778366 гена SIRT1 выявлено, что частота встречаемости аллеля С в основной группе составила 22,4%, тогда как в группе контроля – 12,1%. Частота встречаемости гетерозиготного генотипа ТС выше в основной группе по сравнению с группой контроля (40,6% vs 21,4% соответственно). Анализ ассоциаций установил взаимосвязь полиморфизма rs12778366 гена SIRT1 с ВМД. Так, гетерозиготный генотип ТС в общей и доминантной моделях наследования являются генетическим фактором предрасположенности к данному заболеванию, увеличивая риск его развития в **2,553** и **2,516** раза соответственно ( $P = 0,008$ ). При анализе морфологических изменений сетчатки наиболее важными и статистически значимыми отличиями между генотипами обладали мягкие друзы ( $P = 0,0012$ ). Наиболее часто они встречались при генотипе ТС (67,9%).

Средняя длина теломер клеток буккального эпителия у пациентов основной группы составила  $0,77 \pm 0,08$ , в группе контроля –  $0,99 \pm 0,13$ . Выявлены достоверные различия в относительной длине теломер между исследуемыми группами ( $P < 0,0001$ ). Учитывая то, что не было выявлено статистической значимой разницы между возрастом пациентов данных групп ( $P > 0,05$ ), выявленное различие в относительной длине теломер может свидетельствовать о более раннем репликативном старении у лиц основной группы. При анализе относительной ДТЛ клеток эпителия роговицы также выявлены достоверные различия между основной и контрольной группой,  $0,74 \pm 0,09$  против  $1,07 \pm 0,12$ , соответственно ( $P < 0,0001$ ). Относительная ДТЛ клеток буккального эпителия была разделена на две подгруппы – короткие и длинные теломеры, исходя из медианной длины теломер испытуемых контрольной группы (медиана =  $0,9938$ ). Медианная длина теломер клеток эпителия роговицы равна  $1,0528$ . Относительная ДТЛ ниже медианной длины теломер контрольной группы считалась «короткими теломерами», а более высокая – «длинными теломерами». Выявлены статистически значимые различия в распределении длинных и коротких теломер клеток буккального эпителия и клеток эпителия роговицы между исследуемыми группами. Пациентов с короткими теломерами было больше в основной группе, чем в группе контроля ( $P < 0,00001$ ). Достоверность различий отображена в Таблице 1.

*Таблица 1.*

Распределение пациентов основной и контрольной групп по длине теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы

Показатель	Группа		Уровень P
	Основная, N = 96	Контрольная, N = 70	
<b>Теломеры клеток буккального эпителия</b>			
Длинные теломеры, n (%)	2 (2,1)	34 (48,6)	$< 0,00001$
Короткие теломеры, n (%)	94 (96,9)	36 (51,4)	
<b>Теломеры клеток эпителия роговицы</b>			

Длинные теломеры, n (%)	2 (1,04)	31 (51,7)	< 0,00001
Короткие теломеры, n (%)	190 (98,96)	29 (48,3)	

Оценка относительной длины теломер клеток буккального эпителия и эпителия клеток роговицы по длине в зависимости от генотипов полиморфизма rs12778366 гена SIRT1 в основной группе показала, что у носителей генотипа ТТ теломеры короче, чем носителей генотипов ТС и СС. Достоверность различий отображена в Таблице 2.

*Таблица 2.*

Распределение теломер клеток буккального эпителия и клеток эпителия роговицы по длине в зависимости от генотипов полиморфизма rs12778366 гена SIRT1 у пациентов основной группы

Показатель	Генотипы			Уровень P, df=2
	СС, N=2	ТС, N=39	ТТ, N=55	
<b>Теломеры клеток буккального эпителия</b>				
Длинные теломеры, n (%)	0 (0,00)	1 (50,0)	1 (50,0)	0,009
Короткие теломеры, n (%)	2 (2,13)	38(40,43)	54 (57,45)	
<b>Теломеры клеток эпителия роговицы</b>				
Длинные теломеры, n (%)	0 (0,00)	2 (100,0)	0 (0,00)	0,0006
Короткие теломеры, n (%)	4(2,13)	76(40,43)	110(57,45)	

***Анализ влияния генетического полиморфизма rs12778366 и относительной длины теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы на течение возрастной макулярной дегенерации в различных возрастных группах***

Анализ зрительных функций продемонстрировал, что показатели МКОЗ, светочувствительности макулы и стабильности фиксации статистически значимо различаются между тремя сравниваемыми возрастными группами. В средней возрастной группе МКОЗ была выше, чем в старческой возрастной группе ( $p = 0,0010$ ). Также данные светочувствительности макулы в средней возрастной группе были больше по сравнению с данными у пациентов старческой возрастной группы ( $P = 0,0118$ ). Стабильность фиксации была выше у паци-

ентов среднего возраста, в то время как нестабильность фиксации была выражена более у пациентов старческого возраста ( $P < 0,0001$ ). При анализе данных ОКТ толщины сетчатки статистически значимых различий между тремя возрастными группами не выявлено ( $p > 0,05$ ).

При оценке морфологических изменений по данным ОКТ выявлено, что у пациентов пожилого возраста выявлялось небольшое количество мелких друз (диаметр менее 63 микрон) ( $p = 0,0227$ ). Множество друз среднего размера, по крайней мере, одна большая друза ( $> 125$  мкм) было на 33,3% больше в старческой возрастной группе по отношению к группе среднего возраста ( $p = 0,0030$ ). Также в старческой возрастной группе было на 32,5% больше дефектов эллипсоидной зоны ( $p = 0,0011$ ) и на 63,4% больше задней отслойки стекловидного тела по сравнению с группой среднего возраста ( $p < 0,0001$ ). Мягкие (экссудативные) истинные друзы чаще выявлялись у пациентов пожилого возраста ( $p = 0,0122$ ).

Распределение генотипов по возрастным группам (средний, пожилой и старческий возраст) было однородным и не показало статистической разницы ( $P = 0,2182$ ). При оценке относительной длины теломер клеток буккального эпителия достоверных различий между возрастными группами не обнаружено ( $p = 0,2850$ ), в то же время выявлено, что относительная длина теломер клеток эпителия роговицы была больше в средней возрастной группе по сравнению с пожилой и старческой возрастными группами ( $p = 0,0282$ ) (Таблица 3).

*Таблица 3.*

Относительная длина теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы в средней, пожилой и старческой возрастных группах, ( $M \pm S$ )

Показатель	Возрастная группа			Уровень P (df = 2)
	Средний возраст, N = 18	Пожилой возраст N = 38	Старческий возраст N = 40	
Относительная длина теломер клеток буккального эпителия	0,74±0,06	0,78±0,08	0,77±0,08	0,2850
Относительная длина теломер клеток эпителия роговицы	0,80±0,10	0,73±0,05	0,73±0,07	0,0282

***Анализ влияния генетического полиморфизма rs12778366 и длины теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы на тяжесть течения возрастной макулярной дегенерации.***

Распределение глаз 96 пациентов группы (192 глаза) по AREDS соответствовало следующим значениям: отсутствие ВМД (1 AREDS) – 1,6%, ранняя стадия (2 AREDS) – 28,1%, промежуточная стадия (3 AREDS) – 22,9%, поздняя стадия (4 AREDS) – 47,4%.

Анализ частотного распределения генотипов в зависимости от стадии показал, что генотип TC встречался чаще независимо от стадии ( $p = 0,0462$ ).

При анализе относительной длины теломер все показатели статистически значимо различались между тремя группами.

Наименьшая относительная длина как теломер клеток буккального эпителия, так и теломер клеток эпителия роговицы отмечалась у пациентов с поздней стадией,  $0,75 \pm 0,08$  и  $0,69 \pm 0,04$  соответственно ( $P < 0,0001$ ).

**Клинический пример 1.** Пациент Т, 48 лет.

Диагноз: OS Возрастная макулярная дегенерация, влажная форма (AREDS 4) OD здоров. Visus OD 1,0 OS 0,3 sph - 0,5D = 0,5.

Светочувствительность сетчатки OD 27,1 dB OS 21,4 dB.

Стабильность фиксации OU стабильная.

Сопутствующие заболевания и факторы риска: женский пол.

Гетерозиготный генотип TC, короткие теломеры клеток буккального эпителия и эпителия роговицы.

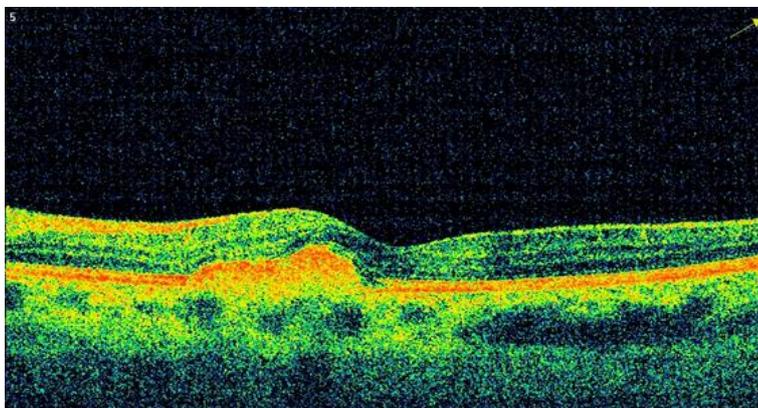


Рисунок 3. ОКТ Макулы OS. ХНВ неактивна, изменения ПЭС и эллипсоидной зоны

**Клинический пример 2.** Пациент В, 67 лет.

Диагноз: OU Возрастная макулярная дегенерация, сухая форма (AREDS 2).

Visus OD 0,5 sph +1,0D = 0,8–0,9 OS 0,9 н\к.

Светочувствительность сетчатки OD 25,2 dB OS 26,5 dB.

Стабильность фиксации OU стабильная.

Сопутствующие заболевания и факторы риска: женский пол, гипертоническая болезнь, гиперлипидемия, высокий ИМТ, сниженная двигательная нагрузка, прием антиоксидантов.

Гомозиготный генотип ТТ, длинные теломеры клеток буккального эпителия и эпителия роговицы.

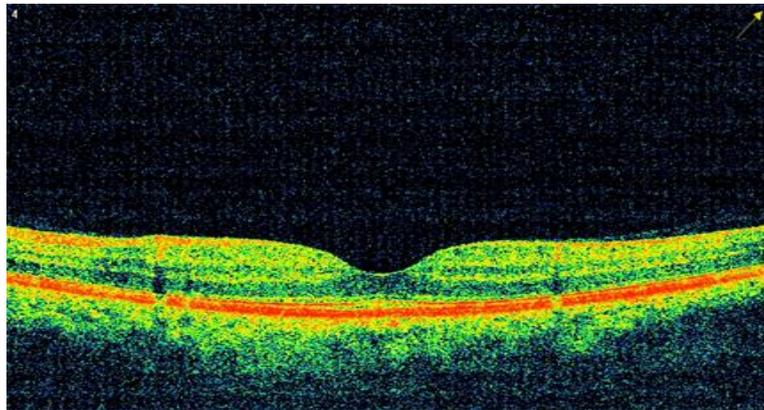


Рисунок 4. ОКТ макулы OD. Мелкие друзы, дезорганизация ПЭС, дефекты эллипсоидной зоны.

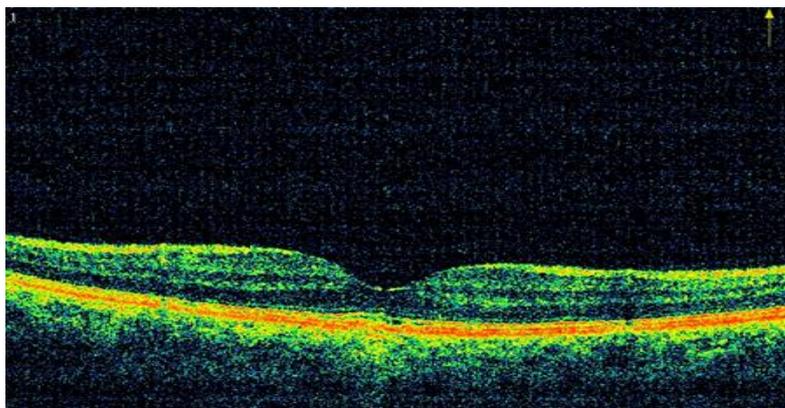


Рисунок 5. ОКТ макулы OS. Мелкие друзы, дезорганизация ПЭС, дефекты эллипсоидной зоны

***Влияние полиморфизма rs12778366 гена SIRT1 и длины теломер клеток эпителия роговицы на терапевтический ответ при лечении афлиберцептом.***

40 пациентов основной группы получили инъекции препарата афлиберцепта по фиксированной схеме с проведением загрузочных инъекций (три инъекции с интервалом в 1 месяц). Функциональные показатели макулы (МКОЗ) до и после лечения статистически значимо не различались ( $p = 0,7642$ ). Толщина сетчатки в fovea достоверно уменьшилась после лечения с  $495,89 \pm 187,52$  до  $291,66 \pm 157,72$  ( $P < 0,0001$ ).

Анализ функциональных показателей макулы и параметров сетчатки до и после лечения в зависимости от генотипа полиморфизма rs12778366 гена SIRT1 показал, что в результате полученного лечения толщина сетчатки в fovea уменьшилась, причем у носителей генотипа ТТ – почти в два раза с  $503,18 \pm 109,16$  до  $252,12 \pm 42,44$  ( $P < 0,0001$ ). Функциональные показатели макулы до и после лечения статистически значимо не различались как для носителей генотипа ТТ, так и генотипа ТС ( $p = 0,8981$  и  $p = 0,9245$  соответственно).

Сравнительный анализ показал, что относительная длина теломер клеток эпителия роговицы до и после лечения статистически значимо не различается ( $P > 0,05$ ). Но были выявлены ее статистически значимые различия ( $P = 0,0421$ ) в зависимости от генотипов полиморфизма rs12778366 гена SIRT1: у носителей генотипа ТС относительная длина теломер меньше ( $0,678 \pm 0,027$ ), чем у носителей генотипа ТТ ( $0,699 \pm 0,031$ ). Это может свидетельствовать о том, что пациенты с генотипом ТС менее восприимчивы к лечению.

При анализе относительной длины теломер выявлено, что удлинение теломер после лечения отмечалось у 90,6% носителей генотипа ТТ, в то время как у носителей генотипа ТС отмечалось в 58,3% случаев ( $P = 0,0134$ ). Можно предположить, что генотип ТТ обладает протективным потенциалом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современном мире отмечается увеличение заболеваемости ВМД не только за счет лиц пожилого, но и за счет лиц среднего возраста. Несмотря на достижения современной офтальмологии, в настоящее время нет достоверных методик определения предрасположенности и прогнозирования течения данной патологии. В научной литературе представлено немного работ, посвященных изучению роли пусковых механизмов и маркеров старения, лежащих в основе данного геронтологического заболевания. Проведенные молекулярно – генетические исследования полиморфизма rs12778366 SIRT1 и длины теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы позволили установить тесные взаимосвязи между данными маркерами и ВМД. Было доказано, что генотип ТС rs12778366 SIRT1 увеличивает риск развития ВМД в общей и доминантной моделях наследования в 2,553 и 2,516 раза ( $P = 0,008$ ). Также были выявлены признаки более раннего репликативного старения с лиц, страдающих ВМД: было отмечено укорочение длины теломер буккального эпителия и клеток эпителия роговицы у пациентов с данной патологией по сравнению с группой контроля (для клеток буккального эпителия –  $0,77 \pm 0,08$  против  $0,99 \pm 0,13$ , для клеток эпителия роговицы –  $0,74 \pm 0,09$  против  $1,07 \pm 0,12$  ( $P < 0,0001$ ). При этом, длина теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы у пациентов с ВМД закономерно укорачивалась в более поздних стадиях ( $P < 0,0001$ ). Изучение взаимосвязей данных показателей с терапевтическим ответом при лечении препаратом афлиберцепта позволило установить протективные свойства генотипа ТТ rs12778366 SIRT1, в то время как носители генотипа ТС были менее восприимчивы к лечению. Ранее такой анализ на популяции РФ не проводился. Полученные результаты указывают на то, что носительство генотипа ТС rs12778366 SIRT1 и укорочение длины теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы, являются факторами риска развития ВМД, влияют на тяжесть и течение заболевания, а также на результат проводимого лечения. В дальнейшем определение данного генотипа при помощи генетического тестирова-

ния представляется перспективным направлением в практической офтальмологии: полученные данные могут использоваться для ранней диагностики, прогноза клинического течения и эффективности лекарственной терапии при влажной форме ВМД.

## **ВЫВОДЫ**

1. У пациентов с возрастной макулярной дегенерацией генетическим фактором предрасположенности является гетерозиготный генотип TC rs12778366 SIRT1, увеличивающий риск ее развития в общей и доминантной моделях наследования в **2,553** и **2,516** раза соответственно ( $P = 0,008$ ).

2. О более раннем репликативном старении у лиц, страдающих возрастной макулярной дегенерацией, свидетельствует выявленное укорочение длины теломер буккального эпителия и клеток эпителия роговицы у пациентов с данной патологией по сравнению с группой контроля (для клеток буккального эпителия –  $0,77 \pm 0,08$  против  $0,99 \pm 0,13$ , для клеток эпителия роговицы –  $0,74 \pm 0,09$  против  $1,07 \pm 0,12$  ( $P < 0,0001$ )).

3. Определено, что при поздних стадиях возрастной макулярной дегенерации выявляется статистически значимое укорочение теломер клеток буккального эпителия и эпителия роговицы по сравнению с ранней и промежуточной стадиями ( $P < 0,0001$ ), что свидетельствует о том, что лица с поздними стадиями возрастной макулярной дегенерации обладают более ранним репликативным старением.

4. Установлено, что пациенты с генотипом TC rs12778366 SIRT1 менее восприимчивы к лечению афлиберцептом, в то время как генотип TT обладает протективным действием. Так, после проведенного лечения, увеличение длины теломер выявлено у 90,6% носителей генотипа TT, в то время как у носителей генотипа TC – в 58,3% случаев ( $p = 0,0134$ ), при этом отмечалась достоверная разница в уменьшении отека сетчатки как у носителей генотипа TT ( $P < 0,0001$ ), так и у носителей генотипа TC ( $p = 0,0230$ ). У носителей генотипа TT отек уменьшился почти в два раза с  $503,18 \pm 109,16$  до  $252,12 \pm 42,44$  ( $P < 0,0001$ ).

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

С целью повышения эффективности ранней диагностики возрастной макулярной дегенерации включить в алгоритм обследования молекулярно-генетическое тестирование по полиморфизму rs12778366 гена SIRT1 и длине теломер клеток роговицы не только у лиц с установленным диагнозом, но и у группы риска.

У пациентов с влажной формой возрастной макулярной дегенерации перед введением афлиберцепта рекомендуется проводить молекулярно-генетическое тестирование по полиморфизму rs12778366 гена SIRT1.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Мошетова, Л. К. Сиртуины и их роль в старении органа зрения. Обзор литературы / Л. К. Мошетова, О. И. Абрамова, К. И. Туркина, М. К. Нурбеков, О. П. Дмитренко, И. Н. Сабурин, С. А. Кочергин // Офтальмология. – 2020. – Т. 17, № 3.– С. 330–335; 6\0,86 с. ИФ - 0,640.

2. Мошетова, Л. К. Стволовые клетки в лечении возрастной макулярной дегенерации / Л. К. Мошетова, О. И. Абрамова, И. Н. Сабурин, К. И. Туркина // РМЖ «Клиническая офтальмология». – 2019. – Т. 19, № 3. –С. 143–148; 6\1,5 с. ИФ - 0,528.

3. Мошетова, Л. К. Ассоциация относительной длины теломер клеток буккального эпителия и генетического варианта гена SIRT1 с возрастной макулярной дегенерацией / Л. К. Мошетова, О. И. Абрамова, К. И. Туркина, О. П. Дмитренко, Н. С. Карпова // РМЖ «Клиническая офтальмология». – 2021. – Т. 21, № 3. – С. 143–146; 4\0,8 с. ИФ - 0,528.

4. Мошетова, Л. К. От клеточного старения до возрастной макулярной дегенерации: роль теломер / Л. К. Мошетова, О. И. Абрамова, К. И. Туркина, О. П. Дмитренко, Н. С. Карпова // РМЖ «Клиническая офтальмология». –2020. – Т. 20, № 3. – С. 148–151; 6\0,8 с. ИФ - 0,528.

5. Абрамова, О. И. Гены старения как пусковой механизм развития возрастной макулярной дегенерации / О. И. Абрамова, Л. К. Мошетова // Тез. докл. XII Конференция молодых ученых с международным участием «Трансляционная медицина: возможное и реальное». – М., 2021. – С. 17–19.

6. Абрамова, О. И. Ассоциация генетического полиморфизма гена SIRT1 с Возрастной макулярной дегенерацией / О. И. Абрамова, Л. К. Мошетова // Тез. докл. XI Конференция молодых ученых с международным участием «Трансляционная медицина: возможное и реальное». – М., 2020. – С. 21–22.

7. Абрамова, О. И. Ассоциация генетического полиморфизма гена SIRT1 с возрастной макулярной дегенерацией / Н. С. Карпова, О. П. Дмитренко, М. К. Нурбеков, О. И. Абрамова, Л. К. Мошетова, К. И. Туркина // Тезисы докл. VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. – Новосибирск, 2020. – С. 462–463.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ВМД – возрастная макулярная дегенерация

ДИ – доверительный интервал

И. ф. – импакт-фактор

МКОЗ – максимально коррегируемая острота зрения

ОКТ – оптическая когерентная томография

ОШ – отношение шансов

rs12778366 – однонуклеотидный полиморфизм 12778366

SIRT1 – sirtuin 1, сирутин 1