

Valentina GINEVIČIENĖ ♦ Justina KILAITĖ ♦ Erinija PRANCKEVIČIENĖ ♦
Alina URNIKYTĖ ♦ Rūta DADELIENĖ ♦ Asta MASTAVIČIŪTĖ ♦
Ildus I. AHMETOV ♦ Vidmantas ALEKNA

Genomo, epigenomo ir telomerų ilgio ypatumai esant sarkopenijai ir senatviniam išsekimo sindromui

Metodinės rekomendacijos



Metodinės rekomendacijos „Genomo, epigenomo ir telomerų ilgio ypatumai esant sarkopenijai ir senatviniam išsekimui“ skirtos gydytojams, gydytojams rezidentams, sveikatos priežiūros specialistams, medicinos genetikams siekiantiems suprasti ir daugiau žinoti apie ankstyvąją sarkopenijos ir išsekimo sindromo prevenciją ir diagnostiką. Šios metodinės rekomendacijos taip pat skirtos mokslininkams-tyrėjams, atliekantiems genetinius ir kitus šiuolaikinius genomikos tyrimus, siejamus su žmogaus senėjimo procesais ir patologija senatvėje.

Metodinės rekomendacijos patvirtintos Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Tarybos 2025 m. kovo 25 d. posėdžio nutarimu Nr. (1.13 E) 150000-TPN-36.

Autoriai:

Valentina Ginevičienė, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas

Justina Kilaitė, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas

Erinija Pranckevičienė, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas

Alina Urnikytė, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas

Rūta Dadelienė, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas

Asta Mastavičiūtė, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas

Ildus I. Ahmetov, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas,

Liverpool John Moores University, United Kingdom

Vidmantas Alekna, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas

Recenzavo:

Prof. habil. dr. **Vita Lesauskaitė**, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Prof. dr. **Algirdas Utkus**, Vilniaus universitetas

Padėka:

Autoriai nuoširdžiai dėkoja recenzentams prof. habil. dr. Vitai Lesauskaitei ir prof. dr. Algirdui Utkui už išsamią darbo analizę ir vertingas pastabas.

Dėkojame už pagalbą – Ievai Eglei Jamontaitei, Dorei Orentaitei, Jekaterinai Danilovai, Gabijai Anikevičiūtei, Laurai Jurkūnaitei ir Kristijonai Gutauskaitei – už pagalbą renkant pacientų duomenis, už išskirtinį darbą laboratorijoje bei analizuojant genomo duomenis.

Šios metodinės rekomendacijos parengtos vykdant Lietuvos mokslo tarybos finansuojamą projektą „Genomo, epigenomo ir telomerų ilgio ypatumai esant sarkopenijai ir senatviniam išsekimui“ (sutar ties Nr. S-MIP-22-36).

Bibliografinė informacija pateikiama Lietuvos integralios bibliotekų informacinės sistemos (LIBIS) portale *ibiblioteka.lt*

ISBN 978-609-07-1148-4 (skaitmeninis PDF)

© Valentina Ginevičienė, Justina Kilaitė, Erinija Pranckevičienė, Alina Urnikytė, Rūta Dadelienė, Asta Mastavičiūtė, Ildus I. Ahmetov, Vidmantas Alekna, 2025

© Vilniaus universitetas, 2025

TURINYS

Ivadas	4
Santrumpos	6
I. Sarkopenija ir senatvinis išsekimo sindromas	7
Sarkopenijos ir išsekimo sindromo fenotipo ypatumai	8
Sarkopenijos ir išsekimo sindromo fenotipas ir jo vertinimo metodologija	9
Sarkopenijos ir išsekimo sindromo priežastys ir rizikos veiksniai	11
II. Genetinis sarkopenijos ir senatvinio išsekimo pagrindas	16
Genomo ypatumai esant sarkopenijai ir senatviniam išsekimui	17
Epigenomo ypatumai esant sarkopenijai ir senatviniam išsekimui	19
Telomerų ilgio ypatumai esant sarkopenijai ir senatviniam išsekimui	22
III. Molekulinės-genetinės analizės metodologija	24
DNR išskyrimas	24
Plataus masto genotipavimo tyrimas	25
Plataus masto epigenomo tyrimas	33
Santykinio telomerų ilgio nustatymas	35
IV. Sarkopenijos ir išsekimo sindromo genetinės rizikos vertinimas pagal fenomo, genomo, epigenomo ir santykinio telomerų ilgio tyrimų rezultatus	39
Plataus masto viso genomo asociacijos tyrimo rezultatai	40
Plataus masto viso metilomo asociacijos tyrimo rezultatai	45
Leukocitų telomerų ilgio tyrimo rezultatai	48
V. Sarkopenijos ir išsekimo sindromo prevencija	53
VI. Sarkopenijos ir išsekimo sindromo ankstyvojo vertinimo modelis	55
Literatūra	58

IVADAS

Šiuolaikinis mokslu pagrįstas požiūris, paremtas genomikos technologijomis ir šių metodų prieinamumas bei taikymas klinikinėje praktikoje padės suprasti geriatrinių sindromų patogenezę, tame tarpe ir sarkopenijos ir išsekimo sindromo, bei spręsti su senėjimu susijusias problemas.

Sarkopenija ir senatvinis išsekimo sindromas yra pagrindiniai geriatriniai sindromai, kurie didina senyvo amžiaus asmenų sergamumą ir mirštamumą. Šių glaudžiai susijusių geriatrinių sindromų patogenezė nėra visiškai aiški. Iki šiol nebuvo priimtų vieningų praktinių rekomendacijų ir ankstyvos diagnostikos metodų. Dėl to siekiant šių senatvinių sindromų prevencijos, ankstyvos diagnozės, gydymo ir/ar prognozės būtina suprasti jų patogenezę, molekulinis mechanizmus ir ryšius tarp procesų, siejamų su senėjimu ir šių būklių požymiais, – tam reikalingas šiuolaikinis mokslu pagrįstas požiūris, ypač sistemų biologijos, t.y. omikos (fenomikos, genomikos, epigenomikos ir kt.) metodų prieinamumas ir jų taikymas klinikinėje praktikoje.

Genetinis testavimas šiuolaikinėje medicinoje jau taikomas daugelio ligų diagnostikoje, tačiau dar nėra taikomas geriatrijoje, ypač tokių būklių kaip sarkopenija ir išsekimo sindromas, taip pat nėra jų tiksliosios diagnostikos ir/ar prevencijos rekomendacijų. Naujausi tyrimai rodo, kad senatvėje, esant sarkopenijai ir išsekimo sindromui, išryškėja specifinės savybės (sumažėja skeleto raumenų masė ir jėga, fizinis pajėgumas) ir genetinis polinkis, kuris susiję su energijos apykaitos sutrikimais, biologinių procesų disreguliavimu, pažintinių funkcijų sutrikimu ir sisteminiu uždegimu. Genetinis sarkopenijos ir senatvinio išsekimo komponentas yra sudėtinis įtakojamas daugelio genų ir aplinkos, bei priklauso nuo individualių fiziologinių ir molekulinų savybių. Moksliniai duomenys rodo, kad telomerų ilgis yra molekulinis senėjimo proceso požymis, kuris atspindi biologinį amžių DNR lygmeniu. Neseniai buvo pranešta, kad senėjimas įvertintas pagal epigenetinį (DNR metilinimo) amžiaus pagreitį ir telomerų ilgio pokyčius, yra glaudžiai susiję su įvairiais senėjimo ir ligų fenotipais. Tokiu būdu senėjimą moduliuojančios genomo, epigenomo ir fenomo sąveikos molekulinė analizė gali padėti nustatyti naujus molekulinis žymenis, kurios būtų galima pritaikyti sarkopenijos ir išsekimo sindromo ankstyvai diagnostikai ir prognozei. Tačiau genomo profilių, DNR metilinimo, telomerų ilgio ir klinikinių fenotipų sąsajos analizė tarp senyvo amžiaus pacientų su sarkopenija ir/ar išsekimo sindromu, dar nebuvo atlikta. Geresnis sarkopenijos ir išsekimo sindromo

požymių ir molekulinį procesų supratimas leis gydytojams, sveikatos priežiūros specialistams identifikuoti šių geriatrinių sindromų rizikos veiksnius, įgyvendinti prevencines priemones, tobulinti intervencijas, klinikinę praktiką bei atitinkamai užtikrinti kiekvieno senyvo amžiaus žmogaus poreikius.

Šiose metodinėse rekomendacijose aprašyti tyrimo metodai, tokie kaip sarkopenijos ir išsekimo sindromo fenotipinių savybių analizė, santykinio telomerų ilgio, plataus masto epigenomo ir genomo asociacijų tyrimai, bei rizikos veiksniai ir molekuliniai žymenys, įtakojantys polinkį geriatriniais sindromams, tarp jų ir polinkį į fiziologinių sistemų išsekimą, sumažėjusią raumenų masę, jėgą ir funkcinę būklę.

Šios metodinės rekomendacijos yra skirtos gydytojams, gydytojams rezidentams, sveikatos priežiūros specialistams, medicinos genetikams, siekiantiems suprasti ir daugiau žinoti apie ankstyvąją sarkopenijos ir išsekimo sindromo prevenciją ir diagnostiką. Šios metodinės rekomendacijos taip pat skirtos mokslininkams–tyrėjams, atliekantiems genetinius, plataus masto genomo ir epigenomo tyrimus, siejamus su žmogaus ilgaamžišku, senėjimu ir patologija senatvėje.

SANTRUMPOS

CES-D – epidemiologinių tyrimų centro depresijos simptomų skalė, angl. *Center for Epidemiologic Studies Depression Scale*)

DNR – deoksiribonukleorūgštis

GEPITEL – Genomo, epigenomo ir telomerų ilgio ypatumai esant sarkopenijai ir senatviniam išsekimui (projekto pavadinimas)

GWAS – plataus masto viso genomo asociacijos tyrimas, angl., *Genome-Wide Association Study*

EWGSOP, Europos darbo grupė senyvo amžiaus žmonių sarkopenijai vertinti, angl., *European Working Group on Sarcopenia in Older People*

HVP – Hardžio-Vainbergo pusiausvyros dėsnis

IDAT – intensyvumo duomenų (angl., intensity data) formatas

nkRNR – *nekoduojančioji ribonukleino rūgštis*

KMI – kūno masės indeksas

MOXY – raumenų aprūpinimo deguonimi vertinimo sistema, angl., *Muscle Oxygen Monitor*

PASE – senyvo amžiaus asmenų fizinio aktyvumo vertinimo skalė, angl. *Physical Activity Scale for the Elderly*,

RL-PGR – realaus laiko polimerazės grandininė reakcija

SPPB – trumpasis fizinės funkcijos testų rinkinys, angl. *Short Physical Performance Battery*

STI – santykinis telomerų ilgis

SmO₂ – raumenų prisotinimas deguonimi (angl., *muscle oxygen saturation*)

SRMI – skersaruožių raumenų masės indeksas

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas

I. SARKOPENIJA IR SENATVINIS IŠSEKIMO SINDROMAS

Senstanti visuomenė susiduria su sveikatos problemomis, su gausybe lėtinių ligų susijusių su senėjimu, gretutinėmis ligomis ir geriatriniais sindromais, – tai yra rimtas iššūkis ekonomikos ir sveikatos priežiūros sistemoms. Vyriausybės strateginės analizės centro (STRATA) 2020-ųjų metų duomenimis prognozuojama, kad dėl spartaus populiacijos senėjimo netolimoje ateityje Lietuva bus viena seniausių visuomenių Europos Sąjungoje. Dėl gerėjančių gyvenimo sąlygų, medicinos tobulėjimo, mažėjančio mirtingumo ilgėja tikėtina vidutinė gyvenimo trukmė, tačiau tai vyksta sparčiau nei sveiko gyvenimo trukmės ilgėjimas. Dėl šios priežasties didėja medicininės išlaidos, apsunkinama senstanti visuomenė ir sveikatos apsaugos sistema.

Sarkopenija ir senatvinis išsekimo sindromas yra dažni senyvo amžiaus asmenų grupėje. Šios būklės yra glaudžiai susijusios, nes sumažėjęs fizinis aktyvumas ir skeleto raumenų masės mažėjimas yra būdingas abiem sindromams [1,2]. Sarkopenijai ypač būdingas progresuojantis raumenų jėgos ir masės mažėjimas, o išsekimo sindromui – fizinių ir kognityvinių rezervų išsekimas, dėl ko atsiranda sveikatos ir savarankiškumo problemos. Senatvinio išsekimo sindromo fenotipas yra apibrėžiamas kai yra trys iš penkių kriterijų: nevalingas kūno masės sumažėjimas, silpnumas, nuovargis, lėtumas ir mažas fizinis aktyvumas. Mokslinėje literatūroje nurodyta, kad sarkopenijos ir senatvinio išsekimo fenotipas yra sudėtinis (daugiaveiksnis), įtakojamas daugelio genetinių, epigenetinių ir aplinkos veiksnių.

Siekiant senatvinių sindromų, tokių kaip sarkopenija ir išsekimo sindromas, prevencijos, ankstyvos diagnostikos, gydymo ir/ar prognozės būtina suprasti jų patogenezę, molekulinis mechanizmus ir ryšius tarp procesų, siejamų su senėjimu ir šių būklių požymiais. Molekulinė genomo ir aplinkos sąveikos analizė turėtų padėti nustatyti biožymenis, lemiančius geriatrinių sindromų pasireiškimą, senatvinę patologiją ir/arba ilgaamžiškumą. Taigi, genetinių veiksnių, genomo ir epigenomo vertinimas bei nustatyti biožymenys leis suprasti fiziologinius ir molekulinis organų ir sistemų pokyčius senatvėje, bendrai biologinius senėjimo mechanizmus.

Šiuo metu klinikiniuose tyrimuose yra svarbūs pacientų išgyvenamumo vertinimo modeliai. Kadangi skirtingi duomenys gali turėti įtakos paciento išgyvenamumui, genomo ir epigenomo biožymenys, kartu su fenotipo vertinimo rodikliais, gali pagerinti šių vertinimo modelių rezultatus ir gali būti naudojami kaip nepriklausomi kintamieji kuriant sarkopenijos ir senatvinio išsekimo sindromo predikcinius vertinimo modelius.

Sarkopenijos ir išsekimo sindromo fenotipo ypatumai

Tyrimuose, kuriuose nagrinėjami sarkopenijos ir išsekimo sindromo kompleksiniai dinaminiai fenotipai, vyksta jų priežasties paieška, tame tarpe galimų su amžiumi susijusių pakitimų ir galimų bendrų biologinių procesų, kurie apsprendžia senyvo amžiaus žmonių būdingas būklės [3]. Padidėjusią sarkopenijos ir išsekimo sindromo išsivystymo riziką lemia veiksniai, tokie kaip sociodemografiniai (senyvas amžius, žemas išsilavinimo lygis, socioekonominė padėtis, vienvietė), klinikiniai (poliligitumas, nutukimas, netinkama mityba, pažinimo funkcijų sutrikimai, depresijos simptomai, polifarmacija), biologiniai (uždegiminiai ir endokrininiai pokyčiai, mikroelementų trūkumas), genetiniai (genomo, epigenomo), su gyvenimo būdu susiję veiksniai (fizinis pasyvumas ar žalingi įpročiai) ir daugiakomponentė šių veiksnių sąveika. Buvo įrodyta, kad esant sarkopenijai tris kartus dažniau išsivysto ir senatvinis išsekimo sindromas. Vertinant sarkopeniją, kaip galimą pradinę išsekimo sindromo stadiją, esminis fenotipinis komponentas yra sumažėjęs skersaruožių raumenų funkcinis rezervas, kuris kliniškai apibūdinamas kaip maža raumenų masė ir jėga. Epidemiologinių ir klinikinių tyrimų rezultatai rodo, kad senyvo amžiaus asmenų preklinikinė būklė siejama su uždegimu ir padidintu raumenų katabolizmu. Klinikinėje stadijoje atsiranda augimo hormonų ir lytinių hormonų koncentracijos pokyčiai; α motorinių neuronų sumažėjimas, katabolinių citokinų ir raumenų skaidulų skaičiaus ir savybių pokyčiai, satelitinių ląstelių skaičiaus ir aktyvumo sumažėjimas [4]. Uždegiminis procesas yra susijęs su oksidaciniu stresu, ląstelių senėjimu ir telomerų trumpėjimu.

Tyrimai rodo, kad su amžiumi susijęs raumenų nykimas lydimas lėtinio uždegimo. Šis procesas pasižymi nedideliu, bet nuolatiniu uždegiminių žymenų, tokių kaip TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir CRP (C reaktyvusis baltymas) padidėjimu. Didesnė CRP, IL-6 ir TNF- α raiška yra būdinga išsekimo sindromui ir sarkopenijai. Šie žymenys gali skatinti raumenų baltymų skaidymą ir slopinti jų sintezę, taip sukeldami raumenų atrofiją. Buvo nustatyta, kad IL-6 ir CRP yra susiję su sumažėjusia raumenų jėga. Be to, senyvo amžiaus žmonių raumenyse kaupiasi senstančios ląstelės, kurios irgi išskiria uždegiminius citokinus, kurie ne tik skatina raumenų atrofiją, bet ir trikdo mitochondrijų funkciją, didindami oksidacinį stresą ir reaktyviųjų deguonies formų (ROS) gamybą. Per didelę ROS gamybą dar labiau padidina mitochondrijų pažeidimus ir vėlesnius medžiagų apykaitos sutrikimus bei skatina proteolizę, sustiprindama ubikvitino proteosomų sistemą, vieną iš pagrindinių baltymų skaidymo būdų, todėl skeleto raumenys nyksta. Dėl vietinio uždegimo išsiskiriantys prouždegiminiai veiksniai gali paskatinti makrofagų ir kitų imuninių ląstelių

infiltraciją, kas lemia kitų uždegiminių veiksnių atsaką, skatina raumenų baltymų skaidymą, plečia uždegimo mastą ir didina pažeidimą. Be to, TNF- α aktyvacija gali sukelti raumenų ląstelių apoptozę, skatindama kaspazių veikimą. TNF- α , pagrindinis apoptozės signalinio kelio reguliatorius, jungiasi prie TNF- α receptorių skeleto raumenyse ir per su Fas susijusį mirties domeną (FADD) aktyvuoja kaspazes, taip sukeldamas apoptozę. Dėl suaktyvėjusios apoptozės skeleto raumenyse padidėja raumenų baltymų irimas. Šiame procese taip pat svarbus ubikvitinas, kuris duoda signalą proteosomai ardyti raumenų baltymus. Su ubikvitinu yra susiję skaidymo sistemos baltymai, tokie kaip MuRF1 (raumenų specifinis RING piršto baltymas 1) ir Atrogin-1, kuris taip pat vadinamas su raumenų atrofija susijusiu faktoriumi.

Taigi esant sarkopenijai ir išsekimo sindromui raumenyse ir visame organizme vyksta daugybė molekulinų pokyčių, kurie neigiamai veikia širdies ir kraujagyslių, kraujodaros, raumenų ir kaulų sistemas bei kognityvinę funkciją ir tuo prisideda prie būdingų senėjimu fenotipinių pokyčių.

Sarkopenijos ir išsekimo sindromo fenotipas ir jo vertinimo metodologija

Klinikinis apibūdinimas

Sarkopenija nustatoma vadovaujantis Europos senų žmonių sarkopenijos darbo grupės (angl.: The European Working Group on Sarcopenia in Older People, EWGSOP2, 2018 m.) bendru sutarimu, pagal pasiūlytus kriterijus – *sarkopenijos diagnostinės reikšmės*:

- ♦ maža raumenų masė – skersaruožių raumenų (galūnių) masės indeksas (SRMI): vyrams $< 7,0 \text{ kg/m}^2$ ir moterims $< 6,0 \text{ kg/m}^2$;
- ♦ maža raumenų jėga (plaštakų dinamometrija): $< 27 \text{ kg}$ vyrams ir $< 16 \text{ kg}$ moterims;
- ♦ maža fizinė funkcija – eisenos greitis $\leq 0,8 \text{ m/s}$ (esant sunkiai sarkopenijos formai).
- ♦ Senatvinio išsekimo sindromo vertinimas ir diagnostika remiasi *L. Fried* kriterijais, t.y. tiriamasis vertinamas kaip turintis *senatvinį išsekimo sindromą* jei atitinka tris iš penkių kriterijų:
- ♦ kūno masės mažėjimas (per pastaruosius 12 mėnesių kūno masė sumažėjo daugiau nei $4,5 \text{ kg}$ savaime);
- ♦ nuovargis (atsakoma teigiamai į bent vieną iš dviejų klausimų depresijos vertinimo skalės (CES-D) klausimyne: „Viskas, ką dariau, reikalavo didelių pastangų“, „Man buvo sunku pradėti ką nors dirbti ar veikti“);

- ◆ sumažėjęs ėjimo greitis (žemiausias 20 proc. pagal lytį ir ūgį);
- ◆ maža raumenų jėga (plaštakos raumenų jėga patenkanti į žemiausią 20 proc. atsižvelgiant į lytį ir kūno masės indeksą);
- ◆ mažas fizinis aktyvumas (vertinamas fizinio aktyvumo klausimynu (PASE): vyrų < 64 balų, moterų < 52 balų).

Sarkopenijos ir išsekimo sindromo fenotipo parametrų vertinimo metodologija

Tiriamųjų klausimynas demografiniams, socialiniams ir sveikatos rodiklių kintamiesiems vertinti (*anketinė apklausa*): kontaktiniai duomenys, amžius, šeimyninė padėtis, išsilavinimas, žalingi įpročiai, gretutinės ligos, vartojami medikamentai, griuvimai, mitybos būklės vertinimas (MNA, sudaro 6 klausimai, naudojamas vertinant mitybos įpročius, apetitą, kūno masės mažėjimą; laisvos prieigos klausimynas <https://www.mna-elderly.com/sites/default/files/2021-10/mna-mini-lithuanian.pdf>); kasdienės veiklos anketa (rodo nepriklausomumo lygį, naudojama vertinant kasdienės funkcijas, laisvos prieigos klausimynas <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.392555/asr>); instrumentinė kasdienės veiklos anketa (rodo savarankiškumą, vertinamos savarankiškumo veiklos; laisvos prieigos klausimynas <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.392555/asr>); fizinio aktyvumo klausimynas (PASE, *Physical Activity Scale for the Elderly* – rodo fizinį aktyvumą, t.y. laisvalaikio, namų ruošos ir su darbu susijusias veiklas); laisvos prieigos klausimynas <https://www.sralab.org/rehabilitation-measures/physical-activity-scale-elderly>); geriatrinė depresijos skalė (GDS, atspindi emocinę būklę, rodo galimą depresiją, laisvos prieigos klausimynas <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.392555/asr>), trumpasis protinės būklės tyrimas (<https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.392555/asr>).

- 1) *Antropometriniai matavimai ir funkciniai testai*: ūgis, kūno masė, kūno masės indeksas (KMI), kūno dalių apimčių matavimas, kūno sudėtis (dvisrautė radioabsorbcimetrija – raumenų masės matavimui), rankų raumenų jėga (plaštakos dinamometrija), psichomotorinės reakcijos laikas ir judesių dažnis (reakciometru ir programine įranga judesių dažnio nustatymui), Širdies ir kraujotakos sistemos reakcija į standartinį aerobinį fizinį krūvį (ergometras ir telemetrinė Polar sistema), raumenų aprūpinimas deguonimi (MOXY sistema).
- 2) *Trumpasis fizinės funkcijos testų rinkinys* (SPPB, angl., *Short Physical Performance Battery*) – 4 metrų ėjimo greičio vertinimas, pusiausvyros vertinimas (stovint ir stengiantis išlaikyti pusiausvyrą po 10 sekundžių trijose padėtyse: suglaustomis pėdomis, pusiau tandemineje padėtyje ir tandemineje padėtyje), gebėjimas atsistoti nuo kėdės (penkis kartus, rankas laikant ant krūtinės).

Sarkopenijos ir išsekimo sindromo priežastys ir rizikos veiksniai

GEPITEL projekto metu tyrime dalyvavo 204 senyvo amžiaus asmenys (amžiaus vidurkis $82,2 \pm 7,6$ metai): 161 moteris (78,9 proc.) ir 43 vyrai (21,1 proc.). Kontrolinę grupę sudarė asmenys, kurie neturėjo nei sarkopenijos, nei senatvinio išsekimo sindromo požymių – 82 tiriamieji ($80,2 \pm 7,5$ metų amžiaus, 65 moterys ir 17 vyrų). Sarkopenijos ir senatvinio išsekimo sindromo grupę sudarė 122 tiriamieji ($85,3 \pm 6,7$ metų amžiaus): 31 (15,2 proc.) su sarkopenija, 29 (14,2 proc.) su išsekimo sindromu ir 62 (30,4 proc.) asmenys su sarkopenija ir išsekimo sindromo diagnoze.

Tiriamųjų pagrindinės fenotipo charakteristikos pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. Tiriamųjų fenotipinės charakteristikos

Charakteristika	Visi tiriamieji (n = 204)	Kontrolinė grupė (n = 82)	Sarkopenijos ir išsekimo sindromo grupė (n = 122)	p reikšmė
Amžius, metai	83 (77 - 87)	81 (75 - 86)	86 (82 - 89,25)	<0,001
Moterų. (%)	161 (78,9%)	65 (79,2%)	96 (78,68%)	0,001
Išsilavinimo lygis				0,549
- Pradinis	1 (0,5 %)	1 (0,7%)	0	
- Pagrindinis	4 (2 %)	3 (2,1 %)	1 (1,6%)	
- Vidurinis	41 (20,1%)	24 (16,9%)	17 (27,4%)	
- Specialusis vidurinis	27 (13,2%)	21 (14,8%)	6 (9,7%)	
- Aukštesnysis	46 (22,5%)	30 (21,1%)	16 (25,8%)	
- Aukštasis neuniversitetas	23 (11,3%)	17 (12%)	6 (9,7%)	
- Aukštasis universitetas	62 (30,4%)	46 (32,4%)	16 (25,8%)	
Rūkymas (%)				0,325
- Niekada nerūkė	163 (79,9%)	116 (81,7%)	47 (75,8%)	
- Rūkė	35 (17,2%)	21 (14,8%)	14 (22,6%)	
- Dabar rūko	6 (2,9%)	5 (3,5 %)	1 (1,6%)	
Alkoholis (%)				0,005
- Nevartoja	159 (77,9%)	103 (72,5%)	56 (90,3%)	
- Vartoja	45 (22,1 %)	39 (27,5%)	6 (9,7%)	

Charakteristika	Visi tiriamieji (n = 204)	Kontrolinė grupė (n = 82)	Sarkopenijos ir išseki- mo sindromo grupė (n = 122)	p reikšmė
Ligos, skaičius	7 (4 - 9)	6 (3 - 8)	8 (6 - 10)	<0,001
Medikamentai, skaičius	6 (4 - 8)	6 (4 - 8)	6 (3,75 - 8)	0,536
Polifarmacija	113 (55,4%)	47 (57%)	66 (51,6%)	0,473
MNA, balai	11 (9 - 14)	12 (10,75 - 14)	8 (7 - 10)	<0,001
GDS, balai	3 (0 - 5)	2 (0 - 4)	4 (0 - 6)	0,014
TPBT, balai	27 (24 - 29)	28 (25 - 29)	24 (23 - 26)	<0,001
ANTROPOMETRIJA IR KŪNO KOMPOZICIJA				
Ūgis, cm	167 (163 - 172)	166,5 (163 - 170,25)	169 (163,5 - 176,72)	0,021
Kūno masė, kg	67,3 (59,7 - 78,5)	69,75 (61,52 - 78,9)	61,4 (53,8 - 77,1)	<0,001
KMI, kg/m ²	24 (21,59 - 26,97)	24,6 (22,72 - 27,4)	21,55 (19,73 - 24,71)	<0,001
Raumenų (liesoji masė), kg	39,01 (32,96 - 43,31)	40,04 (35,04 - 45,03)	34,72 (30,2 - 39,64)	<0,001
Galūnių liesoji masė, kg	18,09 (15,31 - 21,63)	19,24 (16,12 - 21,99)	15,51 (14,5 - 19,53)	<0,001
Riebalų masė, kg	24,6 (20,18 - 31,97)	25,72 (21 - 33,49)	21,6 (18,45 - 28,44)	0,011
SRMI, kg/m ²	13,62 (12,08 - 15,55)	14,32 (12,84 - 15,98)	12,38 (11,23 - 13,29)	<0,001
FIZINIS PAJĖGUMAS IR FUNKCINĖ BŪKLĖ				
KVA, balai	6 (4 - 6)	6 (4 - 6)	3 (1 - 4,25)	<0,001
IKVA, balai	5 (2 - 8)	7 (4 - 8)	2 (1 - 2,25)	<0,001
Dinamometrija (plaštakos spaudi- mo jėga), kg	14 (12 - 23,5)	16 (14 - 26)	12 (9,5 - 18,5)	<0,001
Eisenos greitis, m/s	0,68 (0,53 - 0,82)	0,78 (0,64 - 0,86)	0,52 (0,47 - 0,59)	<0,001
TFFT, balai	8,5 (6 - 10)	9 (8 - 11)	6 (4 - 7)	<0,001
SAFAS, balai	35 (27 - 76)	56 (32,5 - 83)	27 (25 - 30)	<0,001
Paprastos psicho- motorinės reakci- jos laikas, mls	326 (285 - 405)	305 (271 - 349,75)	406 (358 - 478)	<0,001

Charakteristika	Visi tiriamieji (n = 204)	Kontrolinė grupė (n = 82)	Sarkopenijos ir išsekimo sindromo grupė (n = 122)	p reikšmė
Sudėtingos psichomotorinės reakcijos laikas, mls	617 (527 - 782)	575 (494,5 – 658,5)	781 (673 - 913)	<0,001
10 sek judesių dažnis, skaičius	51 (45,75 - 56)	53 (48 - 57)	44 (41 - 49)	<0,001
60 sek judesių dažnis, skaičius	253 (217 - 298)	275 (240,75 – 307,25)	215,5 (188 – 239,75)	<0,001
Borgo skalė, balai	7 (5 - 8)	7 (5,25 - 8)	7 (4,25 - 8)	0,752
Raumenų oksigenacija ramybėje %	70,16 (47,59 - 92,73)	77,88 (61,27 – 94,49)	35,09 (27,66 – 42,52)	<0.001
Raumenų oksigenacija krūvio metu %	60,48 (35,88 – 85,08)	68,06 (48,31 – 87,81)	26,00 (14,86 – 37,14)	<0.001

MNA – trumpasis mitybos būklės vertinimas, GDS – geriatrinė depresijos skalė, TPBT – trumpasis protinės būklės tyrimas, KMI – kūno masės indeksas, SRMI – skersaruožių raumenų masės indeksas, KVA – kasdienės veiklos anketa, IKVA – instrumentinė kasdienės veiklos anketa, TFFT – trumpasis fizinių funkcijų testų rinkinys, SAFAS – senyvų asmenų fizinio aktyvumo skalė

Nustatyta, kad sarkopenijos ir išsekimo sindromo grupėje dalyviai buvo statistiškai reikšmingai vyresni, turėjo daugiau gretutinių ligų ir buvo mažiau savarankiškesni (vertinant kasdienę veiklą ir instrumentinę kasdienę veiklą) negu kontrolinės grupės asmenys [5]. Visų tiriamųjų grupėse nebuvo nustatyta reikšmingų skirtumų analizuojant vartojamų vaistų kiekį ar polifarmacijos paplitimą. Bendrai polifarmacija buvo nustatyta 113 (55,4 proc.) tiriamųjų. Vertinant tiriamųjų asmenų skersaruožių raumenų masės indeksą (SRMI) nustatyta, kad moterų amžius ($r = -0,29$; $p = 0,0002$) ir išsilavinimas ($r = 0,13$; $p = 0,094$) turėjo reikšmingą sąsają SRMI. Taip pat tiriamųjų sveikatos būklė (bendras ligų skaičius) reikšmingai neigiamai įtakojo SRMI: vyrų ($r = -0,38$; $p = 0,011$), moterų ($r = -0,36$; $p < 0,0001$).

Tyrimo metų nustatytas mitybos nepakankamumas (MNA balų suma <7) 24 tiriamiesiems (11,8 proc., 3 kontrolinės grupės asmenys ir 21 iš sarkopenijos ir išsekimo sindromo grupių, $p < 0,0001$), o mitybos nepakankamumo rizika (MNA balų suma 8-11) nustatyta tarp 90 (44,1 proc.) asmenų. Vyrų mitybos ypatumai teigiamai įtakoja SRMI ($r = 0,45$; $p = 0,0023$), tačiau moterų mityba nėra toks reikšmingas veiksnys siejamas su SRMI ($r = 0,14$; $p = 0,074$).

Iš viso 133 (65,2 proc.) dalyviai nurodė, kad bent vieną kartą per paskutinius 12 mėnesių patyrė griuvimą. Kontrolinėje grupėje griuvimų buvo reikšmingai mažiau negu sarkopenijos ir/arba išsekimo sindromo grupėse ($p < 0,001$). Be to tarp asmenų su sarkopenija ir/arba išsekimo sindromu buvo reikšmingai daugiau griuvusių nei negriuvusių (77 vs. 56, $p < 0,001$) [6–8].

Vertinant visų tiriamųjų emocinę būklę nustatyta, kad 43 (21,07 proc.) dalyviai turėjo depresiškumo požymius. Sarkopenijos ir išsekimo sindromo grupės tiriamieji turėjo reikšmingai daugiau depresiškumo požymių nei kontrolinėje grupėje ($p = 0,007$). Protinės būklės tyrimų rezultatai parodė, kad visi tiriamieji surinko pakankamai balų, kad pažinimas būtų vertinamas kaip nesutrikęs. Tačiau sarkopenijos ir išsekimo sindromo grupėje balų skaičius buvo statistiškai reikšmingai mažesnis negu kontrolinėje grupėje ($p < 0,0001$).

Fizinio aktyvumo lygio analizė parodė, kad pusė tiriamųjų turėjo sumažėjusią fizinę funkciją: 41 (28,87 proc.) asmuo iš kontrolinės grupės ir 61 (98,3 proc.) iš sarkopenijos ir/arba išsekimo sindromo grupių ($p < 0,0001$) [9]. Be to, tarp grupių nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas vertinant eisenos greitį ir raumenų (plaštakos spaudimo) jėgą: sarkopenijos ir išsekimo sindromo grupėje dalyviai buvo lėtesni ($p < 0,001$) ir silpnesni ($p = 0,006$). Tiriamųjų vyrų ($r = 0,35$; $p = 0,024$) ir moterų ($r = 0,46$; $p < 0,0001$) fizinis aktyvumas buvo teigiamai susijęs su SRMI.

Buvo atlikta SRMI ir fiziologinių charakteristikų sąsajos regresinė analizė, atsižvelgiant į 10 fenotipo parametrų, tokių kaip tiriamųjų lytis, amžius, fizinis aktyvumas, mištyba, ligų skaičius, psichinė būklė, geriatrinės depresijos skalė, išsilavinimo lygis, rūkymas ir alkoholio vartojimas. Šios analizės rezultatai parodė, kad (1) psichikos būklė ir depresija turi reikšmingą poveikį SRMI; (2) maža raumenų masė siejama su prastesniu pratimų toleravimu (Borgo skalė ergometrijos metu) ir didesniu pastangų suvokimu ($p = 0,0005$); (3) didesnė tiriamųjų raumenų masė (SRMI) siejama su didesne raumenų jėga ($p < 0,0001$) ir su geresniu motoriniu greičiu bei koordinacija, t.y. su geresne neuromotorine funkcija ($p = 0,0013$); kuo mažesnis SRMI – tuo prastesnė raumenų jėga ir neuromotorinė funkcija.

Tiriant raumenų oksigenacijos procesų ypatumus tarp tiriamųjų asmenų nustatyta, kad raumenų prisotinimas deguonimi (SmO_2) ramybės metu reikšmingai skyrėsi tarp kontrolinės grupės asmenų ($77,88 \pm 16,6\%$) ir tiriamųjų grupėje su sarkopenija ir/arba išsekimo sindromu ($35,09 \pm 7,43\%$). SmO_2 tarp grupių skyrėsi pasibaigus 6 min trukmės standartiniam fiziniam krūviui ($68,06 \pm 19,75$ vs. $26,00 \pm 11,14\%$) ir po 5 min. poilsio ($77,55 \pm 7,14$ vs. $46,09 \pm 11,21\%$) ($p < 0,001$). Tačiau SmO_2 sumažėjimas nuo ramybės būklės iki standartinio fizinio krūvio pabaigos abiejose grupėse buvo panašus 9–10% [10].

- ➡ *Apibendrinant GEPITEL tiriamųjų fenotipo analizės rezultatus galima teigti, kad senyvo amžiaus asmenims su sarkopenija ir/arba išsekimo sindromu būdinga prasta raumenų oksigenacija, maža raumenų masė (raumenų masės indeksas), blogėjanti funkcinė būklė ir fizinio krūvio netoleravimas, reikalaujantys didesnių pastangų atliekant fizinius pratimus. Gauti rezultatai rodo, kad sarkopenija ir senatvinis išsekimo sindromas yra susiję su poliligotumu, depresiškumo požymiais, mitybos nepakankamumu, padidėjusia griuvimų rizika ir prastesne neuromotorine funkcija.*

II. GENETINIS SARKOPENIJOS IR SENATVINIO IŠSEKIMO PAGRINDAS

Genetinis sarkopenijos ir senatvinio išsekimo komponentas yra daugiaveiksnis, įtakojamas daugelio genetinių veiksnių, aplinkos, gyvenimo būdo bei priklauso nuo individualių fiziologinių ir molekulinį viso organizmo savybių, ypač skersaruožių raumenų ypatumų [11]. Yra žinoma, kad žmogaus raumenys taip pat turi genetinį komponentą ir priskiriami prie paveldimų kiekybinių organizmo požymių, kurių paveldimumo koeficientas svyruoja 30–85 proc. raumenų jėgai ir 50–80 proc. raumenų masei [12]. Tyrimai rodo, kad sarkopenijos ir senatvinio išsekimo specifiniai genomo žymenys yra susiję su energijos metabolizmu, biologinių procesų reguliacija, pažinimu ir sisteminiu uždegimu [11,13]. Be to, nemažai svarbūs yra su senėjimu susiję epigenetiniai mechanizmai, tokie kaip DNR metilinimas, histonų modifikacijos, nkRNR [11,14]. Moksliniai tyrimai rodo, kad senėjimo proceso ypatumai koreliuoja su DNR metilinimo pokyčiais visuose žmogaus audiniuose (ypač raumenyse). Buvo įrodyta, kad genomo DNR metilinimo lygis keičiasi žmogui senstant ir veikiant aplinkai, todėl pastebėti stabilūs biologinio senėjimo skirtumai tarp senyvo amžiaus asmenų [14]. Epigenetiniai žymenys gali nurodyti chromosominį asmens amžių, kuris pagrįstas DNR metilinimo modeliais. Buvo nustatyta, kad genomo variacija ir kai kurių genomo sričių DNR sekų metilinimas yra susijęs su sarkopenijos ir senatvinio išsekimo sindromo fenotipo kriterijais, pvz., su sumažėjusia skeleto raumenų mase, rankų paspaudimo jėga, ėjimo greičiu, su pažinimo funkcijomis [11]. Manoma, kad genomo žymenų ir DNR metilinimo modeliai gali būti taikyti klinikiniuose tyrimuose kaip rizikos veiksnių, lemiančių su senėjimu susijusių ligų, analizė [14]. Taip pat mokslininkų įrodyta, kad telomerų ilgis yra molekulinis ir ląstelinis senėjimo proceso požymis [15]. Buvo pranešta, kad nors telomerų ilgis yra reikšmingas senėjimo žymuo, tačiau vertinant sudėtingus su amžiumi susijusius sindromus, tokius kaip sarkopenija ir išsekimas, reikia remtis papildomais tyrimais (kaip genomo ar epigenomo analizė), t.y. reikalingas kompleksinis biožymenų vertinimas, kuris padėtų tiksliau įvertinti ir prognozuoti šių senatvinių sindromų simptomus, progresiją ir gydymą.

Genomo ypatumai esant sarkopenijai ir senatviniam išsekimui

Šiuolaikiniai naujomis technologijomis paremti molekuliniai genetiniai tyrimai padeda nustatyti visą žmogaus DNR seką. Išsiaiškinus, kokie genų variantai lemia didesnę polinką ligai, galima tiksliai numatyti tikimybę žmogui susirgti tam tikra liga, nustatyti padidėjusią riziką ankstyvojoje ligos stadijoje arba dar iki pasireiškiant simptomams.

Genų, lemiančių sarkopeniją ir išsekimo sindromą, paieška prasidėjo lėtai nuo 2000-ųjų pabaigos, atliekant genų kandidatų tyrimus ir vėliau taikant plataus masto viso genomo asociacijos analizės tyrimus (GWAS, angl. *Genome-wide association studies*). Populiarių genų kandidatų tyrimuose buvo identifikuojami vieno nukleotido polimorfizmai (VNP) tarp senyvo amžiaus tiriamųjų (su ir be geriatrinio sindromo požymiais), taikant atvejo kontrolės analizės metodologiją. Kai kurie nustatyti VNP buvo reikšmingai siejami su energijos metabolismu, biologinių procesų reguliacija, pažinimu ir sisteminiu uždegimu. Genų kandidatų tyrimuose, analizuojant sarkopenijos ir išsekimo sindromo fenotipą, pagrindinis dėmesys buvo skiriamas raumenų atrofijos, uždegimo ir citokinų genų variantams. Iš tokių žinomų reikšmingų prouždegiminių citokinų nustatytų genotipų variantų buvo *TNF-α* geno promotoriuje (rs1800629) VNP, *IL18* geno variantas irgi promotoriuje (rs360722) ir 2 VNP *IL12* gene (rs9852519 ir rs4679868), kurie ypač siejami su senatvinio išsekimo sindromo kriterijais pagal kaupiamojo deficito modelį (apimant fizinius, psichologinius ir socialinius veiksnius) [16]. Genų raiškos tyrime nustatyta, kad didesnis *IL18* geno raiškos lygis ir IL-18 kiekis kraujo serume siejamas su prastesniu senyvo amžiaus asmenų fiziniu pajėgumu ir blogesne kasdienio gyvenimo veikla [17]. Taip pat patvirtinta, kad genas kandidatas siejamas su senatviniu išsekimu yra *APOE* (koduojantis apolipoproteiną E) [18]. Šis pleiotropinis genas, dalyvauja įvairiose fiziologinėse funkcijose: lipoproteinų metabolizme, uždegiminiame atsake, oksidaciniame streso ir centrinės nervų sistemos fiziologijoje. *APOE* ε4, ε3 ir ε2 aleliai yra labiausiai ištirti genotipai susiję su įvairiomis senatvinėmis ligomis, tokiomis kaip, Alzheimerio liga, insultu, hipertenzija ir širdies-kraujagyslių ligomis. *APOE* ε4 alelis nustatytas kaip reikšmingas išsekimo sindromo diagnostinis ir prognostinis žymuo. Apskritai *APOE* genas buvo vienas pirmųjų nustatytų genų kandidatų labiausiai siejamų su ilgaamžiškumu, – tai gali paaiškinti šio geno įtaką senatvinių ligų ir sindromų pasireiškimui [18].

Genų kandidatų tyrimų patvirtintų sarkopenijos ir išsekimo sindromo žymenų sąrašas bei jų vaidmuo formuojant fenotipą [19]:

- 1) Uždegiminio atsako signalinių kelių žymenys: *IL-18* rs360722, *IL-12* rs9852519 ir rs4679868, *SELP* rs6131, *TNFA* rs1800629;

- 2) Žymenys atsakingi už raumenų funkciją:
 - ♦ Insulino signalinio kelio VNP: *IGF2* rs680;
 - ♦ Pagumburio-hipofizės-antinksčių ašis/ Kortizolio sistemos VNP: *GR* ER22/23EK (22 ir 23 kodonuose);
 - ♦ Raumenų biogenezės VNP: *AMPD1* rs17602729, *ACTN3* rs1815739, *ACVR18* rs2854464, *MSTB* rs1805086;
- 3) Lipoproteinų reguliacijos VNP: *LRP1* rs1799986, *APOE* $\epsilon 4$ alelis;
- 4) Homeostazės VNP: *MTR* rs10925235, rs2297967, rs10802569, rs1770449 ir rs1050993; *FN1* rs7567647; *GSTZ1* rs2287396; *TIAM1* rs2833383; *STAT1* rs1400657; *TCN2* rs740234; *BTRC* rs10883631; *VTN* rs2227729; *ACE I/D*, *CNTF* rs1800169;
- 5) Apoptozės VNP: *CREBBP* rs129968; *KAT2B* rs2929408; *CASP8* rs3769827, rs6747918, rs2037815 ir rs6745051;
- 6) β -Adrenerginio receptoriaus VNP: *ADRB2* ($\beta 2$ -ADR) rs1042714;
- 7) Mitochondrinės DNR: *mt146*, *mt204*, *mt228*.

Pastaraisiais metais genų kandidatų tyrimų reikšmė sumažėjo dėl didelio našumo viso genomo genotipavimo ir sekoskaitos technologijų pažangos, kartu su išsamiais žiniomis apie žmogaus genetinę architektūrą, – kas leido ištirti genetinius variantus visame genome dėl jų vaidmens senėjimo procese ir geriatrinių sindromų patogenezėje. Šiuo metu Žmogaus senėjimo genomo išteklį duomenų bazėse (GenAge, LongevityMap, <https://genomics.senescence.info/>; Aging Atlas https://ngdc.cncb.ac.cn/aging/age_related_genes) nurodyti 307 genetiniai variantai reikšmingai siejami su senėjimo procesu, iš jų 78 žymenys yra susiję su sarkopenija [20] ir 30 genų kandidatų, siejamų su išsekimo sindromu [21].

GWAS tyrimų duomenimis su išsekimo sindromu buvo patvirtinti 30 genų kandidatų biožymenys: *CXCL10* (C-X-C motyvo chemokino ligandas 10), *IL-6* (interleukinas 6), *CX3CL1* (C-X3-C motyvo chemokino ligandas 1), *GDF15* (augimo diferenciacijos faktorius 15), *FNDC5* (fibronektino 5 tipo domenai), *PLAU* (plazminogeno aktyvatorius, urokinazė), *AGT* (angiotenzinogenas), *BDNF* (smegenų kilmes neurotrofinis faktorius), *PGRN* (progranulinas), *FGF21* (fibroblastų augimo faktorius 23), *LEP* (leptinas), miRNR (mikro Ribonukleorūgštis), *AHCY* (adenozilhomocisteinazė), *KRT18* (keratinas 18); *PTX3* (pentraksinas), *sVCAM/ICAM* (tirpi kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė 1 / tarpląstelinės adhezijos molekulė 1), *APP* (amiloido beta pirmtakas), *LDH* (laktato dehidrogenazė), *TGF β* (transformuojantis augimo faktorius beta), *PAI-1* (plazminogeno aktyvatoriaus inhibitorius 1), *TGM2* (transglutaminazė 2), *sRAGE* (tirpūs pažangių glikozinimo galutinių produktų receptoriai), *HMGB1* (didelio mobilumo grupės 1 dėžutė), *C3/C1Q* (komplemento faktorius 3/1Q), *ST2* (Interleukino 1 receptoriai), *AGRN* (agrinai), *IGF-1* (į insuliną panašus augimo faktorius 1), *RETN* (resistinas), *ADIPOQ* (adiponektinas), *GHRL* (grelinas), *GH* (augimo hormonas), *LTF* (laktoferinas) [21].

GWAS rezultatų duomenimis, su pagrindiniu sarkopenijos fenotipu – raumenų jėga (plaštakos dinamometrijos rodiklis), raumenų liesa mase (arba skersaruožių raumenų masės indeksas) ir ėjimo greitis, – reikšmingai siejami 78 nepriklausomi VNP iš 73 genomo sričių, asocijuotų su visais trimis požymiais. Iš 78 VNP 55 polimorfizmai taip pat buvo susiję su kūno riebalų mase ir 25 polimorfizmai su 2 tipo diabetu (T2D), o tai rodo, kad sarkopenija, nutukimas ir T2D turi daug bendrų rizikos alelių [20]. Bioinformatinė analizė atskleidė, kad sarkopenijos rizikos aleliai buvo susiję su nuovargiu, griuvimais (per pastaruosius metus), neurotiškumu, alkoholio vartojimo dažnumu, rūkymu, televizoriaus žiūrėjimu, didesniu druskos, baltos duonos ir perdirbtos mėsos vartojimu. Apsauginiai (protektiniai) genų aleliai buvo teigiamai susiję su kaulų mineralų tankiu, serumo testosterono, IGF1 ir 25-hidroksivitamino D lygiu, ūgiu, intelektu, pažinimo veikla, išsilavinimu, pajamomis, fiziniu aktyvumu, maltos kavos gėrimu ir sveikesne mityba (kaip rupių miltų arba viso grūdo duona, kalis, magnis, sūris, riebi žuvis, baltymai, vanduo). Be to, literatūros duomenys rodo, kad fizinis aktyvumas (jėgos pratimai) gali sukelti reikšmingus 26 iš 73 susijusių genų raiškos pokyčius raumenyse (*m. vastus lateralis*), kas iš dalies paaiškina teigiamą jėgos treniruočių poveikį sarkopenijos profilaktikai ir gydymui [20].

Epigenomo ypatumai esant sarkopenijai ir senatviniam išsekimui

Žmogaus DNR sekos pokyčiai (kaip VNP žymenys) nėra vieninteliai su amžiumi susiję genetiniai veiksniai ir genomo pokyčiai. Prie molekulinio senėjimo mechanizmų taip pat priskiriamos epigenetinės modifikacijos, tokios kaip DNR metilinimas, histonų modifikacija, chromatinio remodeliavimas, nkrNR, kurios turi įtakos genų raiškai nekeičiant pačios DNR sekos. Tarp epigenetinių modifikacijų reikšmingiausi yra DNR metilinimo pokyčiai, kurie priskiriami prie pagrindinių genų raiškos reguliatorių. Metilinamos geno reguliacinės sekos – promotoriaus arba greta jo esančios citozino ir guanino sankaupos (vadinamos CpG salelėmis, raidė “p” parodo, kad citozinas ir guaninas sujungti fosfodiesterine jungtimi), – šį procesą katalizuoja fermentas DNR metiltransferazė (metilina citoziną CpG srityse). CpG salelės dažniausiai yra išsidėstę šalia svarbių koduojančių sričių – genų ir jų reguliacinių sričių, kurie atsakingi už pagrindines ląstelės funkcijas, homeostazės palaikymą, energijos ir medžiagų apykaitą. Vienas iš pagrindinių epigenetinių mechanizmų yra tam tikrų genų promotorių metilinimas ir jų veiklos slopinimo mechanizmų, kuris nustatomas daugelio patologijų atvejais. Taigi, DNR metilinimo sutrikimai išbalansuoja įvairių biologinių procesų eigą, todėl skatina įvairių patologijų atsiradimą.

Šiuo metu identifikuojami DNR metilinimo žymenys, kaip unikalūs DNR metilinimo modeliai, nustatyti patologijų atvejais, kurie keičiasi atsižvelgiant į žmogaus chronologinę amžių. Tyrimuose su atkartojančiais rezultatais buvo nustatytos kelios genomo CpG vietos, asocijuotos su amžiumi [14]. Pastaraisiais metais sarkopenija ir išsekimo sindromas sulaukė vis didesnio susidomėjimo dėl ryškių fenotipo sąsajų su ilgaamžiškumu ir su senėjimu susijusiais fenotipais. Egzistuoja biologinio senėjimo ir geriatrinių požymių individualus skirtumas tarp senyvo amžiaus asmenų, – šį fenomeną iš dalies ir paaiškina DNR metilinimo modeliai. Remiantis regresijos koeficientais, apskaičiuotais iš daugybės duomenų rinkinių, pagal DNR metilinimo duomenis galima tiksliai numatyti asmens chronologinį amžių. Skirtumas tarp prognozuojamo DNR metilinimo amžiaus ir chronologinio amžiaus buvo pavadintas „epigenetiniu amžiaus pagreitinėjimu“, kuris parodė DNR metilinimo sąsają su keliais senėjimo fenotipais įvairiuose audiniuose. Kelios mokslininkų grupės nustatė „DNR metilinimo laikrodžius“, kurie tiksliai prognozuoja chronologinį asmens amžių [14,22]. Hannum ir kt. laikrodis, sukurtas iš kraujo DNR, matuojantis 25000 CpG salelių metilinimo frakciją, turėjo koreliacijos koeficientą su amžiumi $> 0,9$ ir vidutinę amžiaus prognozės paklaidą < 5 metų [22]. DNR metilinimo laikrodžiai laikomi hibridiniais skaičiavimais, apimančiais ir chronologinius, ir biologinius elementus. Iš tiesų, biologinį amžių gali atspindėti skirtumas tarp tikrojo chronologinio amžiaus ir DNR metilinimo amžiaus, kurį numato DNR metilinimo laikrodis. Tyrimai rodo, kad senyvo amžiaus žmonių grupėje šis skirtumas (Δ amžius) numatė mirtingumą: 5 metų Δ amžius buvo susijęs su 16% padidėjusia mirtingumo rizika, nepriklausomai nuo amžiaus, išsilavinimo, socialinės klasės ir gretutinių ligų. Taip pat buvo pranešta apie paprastesnę baltą, pagrįstą tik 10 CpG vietų metilinimu, numatantį bet kokias širdies-kraujagyslių sistemos priežastis, mirtingumą nuo vėžio [14,22].

Kelios mokslininkų grupės nagrinėjo su amžiumi susijusius DNR metilinimo pokyčius raumenyse, atsižvelgdami į su amžiumi susijusius fiziologinius raumenų pokyčius, būtent raumenų atrofiją, lipidų apykaitos pokyčius ir raumenų skaidulų susitraukimo tipų organizaciją senatvėje [14,23]. Pagrindinis dėmesys buvo skiriamas DNR metilinimo, mRNR ir baltymų raiškos pokyčiams genuose, kurie skatina raumenų atrofiją (*FBXO32*, *TRIM63*, *MYOG*, *HDAC4*, *HDAC5*), dalyvauja riebalų rūgščių metabolizme raumenyse (*CD36*, *GOT2*, *CPT1A*, *HADH*, *LPL*, *SLC27A1*, *SLC27A4*, *UCP3*) ir koduoja miozino lengvas ir sunkias grandines, kurios diferencijuoja I, IIa ir IIx tipo skaidulas (*MYH6*, *MYH7*, *MYH1*, *MYL3*, *MYH2*). Nors tik trys lipidų apykaitos genai buvo skirtingai metilinti genai (DMG, angl., *differentially methylated genes*) be atitinkamų genų raiškos pokyčių, visi genai, skatinantys raumenų atrofiją, buvo hipometilinti su amžiumi. Visų pirma, *HDAC4* dažniausiai buvo hipometilintas ir atitinkamai padidėjo mRNR lygis, o *FBXO32* taip pat buvo hipometilintas, atitinkamai padidėjus atrogin-1 baltymų kiekiui (2 lentelė). Beveik

visi genai, koduojantys miozino grandines, buvo hipometilinti, tačiau genų raiškos pokyčių nebuvo aptikta [23].

2 lentelė. Su amžiumi susiję genų raiškos ir DNR metilinimo pokyčiai raumenyse (pagal Voisin et al., 2021 [23]).

Genetinių veiksnių reikšmė	Geno pavadinimas	Genas	SMS skaičius	SMS metilinimo pokyčiai su amžiumi	Genų raiškos pokytis su amžiumi
Raumenų atrofija	Atrogin-1	<i>FBXO32</i>	2	Hipometilinimas	Padidėjusi baltymo raiška
	MuRF1	<i>TRIM63</i>	3	Hipometilinimas	
	Miogeninas	<i>MYOG</i>	1	Hipometilinimas	
	Histono deacetilazė 4	<i>HDAC4</i>	19	Hipo- ir hipermetilinimas	Padidėjusi mRNR raiška
Riebalų rūgščių metabolizmas raumenyse	Histono deacetilazė 5	<i>HDAC5</i>	2	Hipometilinimas	
	Riebalų rūgščių translokazė	<i>CD36</i>	0		Sumažėjusi mRNR ir baltymo raiška
	Plazmos membranos riebalų rūgštis surišantis baltymas	<i>GOT2</i>	0		
	Karnitino palmitoil-transferazė 1	<i>CPT1A</i>	0		
	β-Hidroksiacylo-KoA dehidrogenazė	<i>HADH</i>	2	Hipometilinimas	
	Lipoproteinų lipazė	<i>LPL</i>	1	Hipometilinimas	
	Ilgos grandinės riebalų rūgščių transporto baltymas 1	<i>SLC27A1</i>	0		
	Ilgos grandinės riebalų rūgščių transporto baltymas 4	<i>SLC27A4</i>	0		Sumažėjusi baltymo raiška
	Atsijungimo baltymas 3	<i>UCP3</i>	1	Hipometilinimas	

Genetinių veiksnių reikšmė	Geno pavadinimas	Genas	SMS skaičius	SMS metilinimo pokyčiai su amžiumi	Genų raiškos pokytis su amžiumi
Raumenų skaidulų tipui būdingi genai	Miozino sunkioji grandinė 2	<i>MYH2</i>	1	Hipometilinimas	
	Miozino sunkioji grandinė 1	<i>MYH1</i>	0		
	Miozino lengvoji grandinė 3	<i>MYL3</i>	2	Hipometilinimas	
	Miozino sunkioji grandinė 6	<i>MYH6</i>	0		
	Miozino sunkioji grandinė 7	<i>MYH7</i>	5	Hipometilinimas	

SMS – skirtingai metilinta sritis (arba DMG, angl., *differentially methylated genes*).

Telomerų ilgio ypatumai esant sarkopenijai ir senatviniam išsekimui

Šiuo metu intensyviai ieškoma žymenų, kurie galėtų prognozuoti sveikatą senyvame amžiuje, gyvenimo ir sveiko gyvenimo trukmes. Vienas tokių potencialių senėjimo žymenų yra telomerų ilgio trumpėjimas, – kaip molekulinis ir ląstelinis senėjimo proceso požymis.

Telomeros – tai žmogaus linijinių chromosomų galuose esantys baltymų nekoduojantys tandeminiai DNR sekos pasikartojimai. Telomeros, jų formuojamos antrinės struktūros ir šelterinų baltymų kompleksai pasižymi svarbia funkcija – apsaugo chromosomose esančią genetinę informaciją, kuri galėtų būti prarandama replikacijos metu, degraduojant nukleazėmis ar dėl reparacijos sutrikimų [24,25]. Dėl DNR replikacijos mechanizmo ypatumų su kiekvienu ląstelės dalijimusi telomeros trumpėja. Be to, jų ilgį neigiamai veikia vidiniai organizmo veiksniai (pvz., oksidacinis stresas) bei įvairūs aplinkos ir gyvenimo būdo veiksniai (tokie kaip fizinis aktyvumas, stresas, mityba ar socioekonominė padėtis) [24,26]. Manoma, kad sutrumpėjusias telomeras gali atstatyti fermentas telomerezė, pasižyminti atvirkštinės transkriptazės aktyvumu, tačiau šis fermentas besidalijančiose somatinėse ląstelėse nėra aktyvus arba yra labai mažo aktyvumo, todėl šiose ląstelėse telomeros progresyviai trumpėja. Telomeroms pasiekus kritinį ilgį, ląstelės ciklas „užrakinamas“, prasideda uždegiminiai ir kiti ląstelinio senėjimo procesai. Sutrumpėjusios telomeros laikomos senėjimo požymiu ir siejamos su amžiumi susijusiomis

ligomis, tame tarpe ir su senatviniu išsekimu bei sarkopenija, taip pat su senyvo amžiaus nulemiamo mirtingumo rizika (predikcinis žymuo) [27,28].

Nesenai atlikta dvikryptė Mendelio atsitiktinės randomizacijos analizė parodė, kad leukocitų telomerų ilgis yra susijęs su sarkopenija [15]. Buvo nustatyta, kad ilgesnės telomeros turi reikšmingą ryšį su didesne liesąja raumenų mase ir greitesniuėjimo tempu, o trumpesnės telomeros – su mažesne plaštakų suspaudimo jėga ir sumažėjusiu fiziniu aktyvumu [15]. JK Biobanko duomenų analizė parodė reikšmingą ryšį tarp trumpesnio telomerų ilgio ir didesnės išsekimo sindromo pasireišimo rizikos 472 000 tiriamųjų grupėje, 40–69 metų amžiaus, su išsekimo ir prieš-išsekimo sindromu [29]. Tyrimo rezultatai sutapo su kitais Jungtinėje Karalystėje atliktais tyrimais kai tiriamųjų amžiaus intervalas buvo 60–75 metai. Mokslininkų nustatyta, kad laipsniškai trumpėjantys telomerų ilgiai visose amžiaus grupėse buvo susiję su senatvinio išsekimo (prieš/ir) sindromo požymiais, t.y., su visais *Fried* kriterijais. Šis telomerų ilgio trumpėjimo ryšys su fenotipu (atskiris komponentais) stiprėja didėjant išsekimo sindromo rodiklių skaičiui. Be to, tiriamųjų kūno kompozicijos rodikliai, socialiniai-demografiniai ir gyvenimo būdo veiksniai, tokie kaip KMI, socialinis nepriteklis, alkoholio vartojimas, rūkymas ir gretutinių ligų buvimas atskirai, turėjo daug stipresnę asociaciją su išsekimo sindromo kriterijais nei telomerų trumpėjimas. Tačiau gyvenimo būdo veiksniai, kaip rūkymas, mityba, fizinis aktyvumas, buvo reikšmingai susiję su telomerų ilgio trumpėjimu. Tyrimų rezultatai parodė, kad telomerų ilgis, kaip priešlaikinio senėjimo žymuo, pagreitina chronologinio amžiaus poveikį geriatrinių sindromų rizikai. Mokslinių tyrimų rezultatai patvirtina naujausias sampratas apie telomerų dinamiką ir su senėjimu susijusias ligas [15,29].

III. MOLEKULINĖS-GENETINĖS ANALIZĖS METODOLOGIJA

Iš kraujo mėginių (veninio kraujo leukocitų) išskiriama DNR (metodika nurodyta poskyryje „DNR išskyrimas“) bei atliekami telomerų ilgio, viso genomo ir epigenomo asociacijos tyrimai:

1. Plataus masto viso genomo tyrimas, t.y. genotipavimas lustais (*Infinium Global Screening Array-24 v3.0 Kit*) pagal DNR žymenis (metodika nurodyta poskyryje „Plataus masto genotipavimo tyrimas“).
2. Plataus masto epigenomo tyrimas – visuminė DNR metilinimo profilio analizė lustais (*Infinium(*)Human Methylation 450K arba EPIC*) (metodika nurodyta poskyryje „Plataus masto epigenomo tyrimas“).
3. Santykinio telomerų ilgio tyrimas taikant kiekybinę polimerazės grandininę reakciją (metodika nurodyta poskyryje „Santykinio telomerų ilgio nustatymas“).

DNR išskyrimas

Siekiant apsaugoti DNR nuo degradacijos ir išvengti mikrokrešulių susidarymo, tiriamųjų kraujas surenkamas į vakuuminius mėgintuvėlius su antikoagulantu EDTA (etilendi-amintetraacetatu). DNR išskyrimas ir gryninimas su „PureLink™ Genomic DNA Mini Kit“ (Thermo Fisher Scientific, JAV) rinkiniu atliekamas remiantis gamintojo nurodytu protokolu.

Naudojami reagentai ir priemonės: Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Proteinazė K tirpalas (20 mg/ml), RNazė A tirpalas (20 mg/ml), 96–100 % etanolis, fosfatinis buferinis druskų tirpalas, genominis eliacijos buferis, genominis lizės/surišimo buferis, genominis plovimo buferis 1 ir plovimo buferis 2, gryninimo kolonėlės surinkimo mėgintuvėliuose, surinkimo mėgintuvėliai, sterilūs 1,5 ml talpos mikrocentrifuginiai mėgintuvėliai.

Įranga: centrifuga „Eppendorf™ Centrifuge 5424 R“ (Eppendorf AG, Vokietija), termoblokas „Stuart SBH200D/3 Block Heater“ (Cole-Parmer, Jungtinė Karalystė), vorteksas „Vortex-Genie 2“ (Scientific Industries, JAV)

Darbo eiga: į sterilų mikrocentrifuginį mėgintuvėlį pridedama 20 µl proteinazės K tirpalo. Iš šaldytuvo išimami kraujo ėminiai ir paliekami kambario temperatūroje sušilti 10–15 min. Atšildžius kraujo ėminį, į mikrocentrifuginį mėgintuvėlį su proteinaze K perkeliama 200 µl kraujo. Jei mėginyje nepakankamas kraujo kiekis, mėginys skiedžiamas

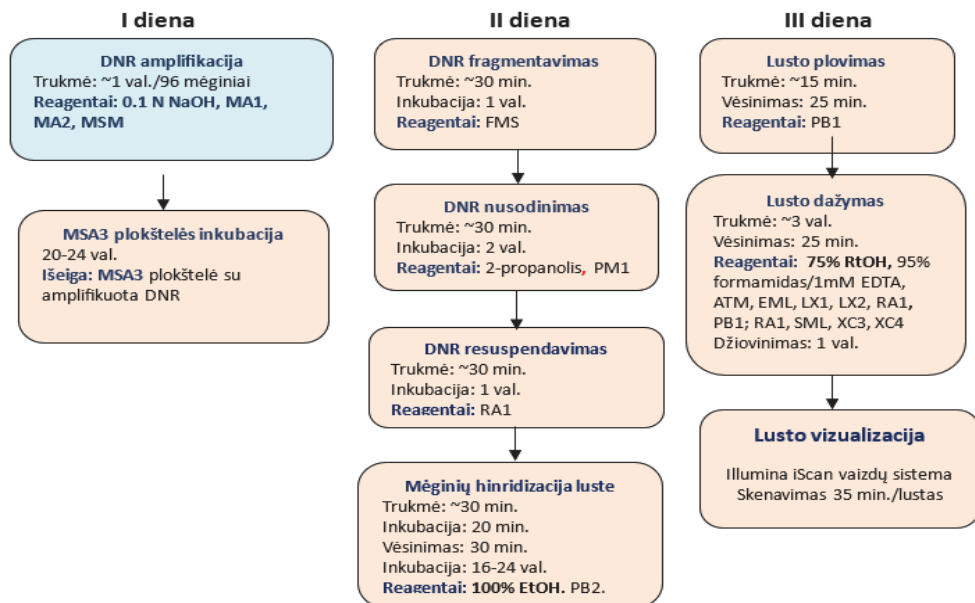
PBS tirpalu iki reikiamo 200 μ l tūrio. Ribonukleorūgštis (RNR) iš mėginio pašalinama į mėginį įpilant 20 μ l RNazės A tirpalo. Mėginys gerai sumaišomas trumpai sukant (vortexuojant) bei inkubuojamas kambario temperatūroje 2 min. Pridedama 200 μ l genomio lizės/surišimo buferio bei sukama iki kol bus pasiektas homogeninis tirpalas. Norint suaktyvinti baltymų skaidymą, inkubuojama 55°C temperatūroje termobloke 10 min. Pasibaigus inkubacijos laikui, į mėgintuvėlį pridedama 200 μ l 96–100 % etanolio bei sukama, kol bus pasiektas homogeninis tirpalas. Paruoštas lizatas (~640 μ l) iš mėgintuvėlio perkeliamas į gryninimo kolonėlę, įdėtą į surinkimo mėgintuvėlį. Kolonėlę centrifuguojama kambario temperatūroje 1 min. 10 000 $\times$ g. Panaudotas surinkimo mėgintuvėlis išmetamas, o kolonėlę patalpinama į naują surinkimo mėgintuvėlį. Į kolonėlę įpylus 500 μ l genomio plovimo buferio 1, centrifuguojama kambario temperatūroje 1 min. 10 000 $\times$ g. Kolonėlę perkeliama iš panaudoto surinkimo mėgintuvėlio į naują. Į kolonėlę įpylus 500 μ l genomio plovimo buferio 2, centrifuguojama kambario temperatūroje 3 min. maksimaliu 19 000 $\times$ g greičiu. Panaudotas surinkimo mėgintuvėlis išmetamas, o kolonėlę perkeliama į sterilų 1,5 μ l talpos mikrocentrifuginį mėgintuvėlį. Į kolonėlę įpylus 100 μ l genomio eliacijos buferio, mėginys inkubuojamas kambario temperatūroje 1 min. Toliau centrifuguojama kambario temperatūroje 1 min. maksimaliu 19 000 $\times$ g greičiu. Norint išgauti daugiau DNR, eliacijos etapas kartojamas antrą kartą. Į kolonėlę pridedama 50 μ l genomio eliacijos buferio ir centrifuguojama kambario temperatūroje 1,5 min. maksimaliu 19 000 $\times$ g greičiu. Kolonėlę išmetama, o mikrocentrifuginis mėgintuvėlis su išskirta DNR laikinai laikomas 4°C temperatūroje šaldytuve.

DNR koncentracija ir kokybė vertinama „NanoDrop® ND-1000“ spektrofotometru, matuojant absorbciją (A) tam tikrame šviesos bangų ilgyje. Spektrofotometras nuvalomas ir kalibruojamas su 1–2 μ l dejonizuoto vandens. Nuvalius vandenį, 1–2 μ l DNR mėginio užnešami ant spektrofotometro. DNR koncentracijos matavimas vykdomas esant 260 nm bangos ilgiui, ties kuriuo DNR absorbuoja šviesą. Svarbu atsižvelgti į DNR kokybę, nes prastas DNR švarumas gali neigiamai paveikti tolimesnių tyrimų rezultatus. Kadangi baltymai sugeria šviesą esant 280 nm bangos ilgiui, A₂₆₀/A₂₈₀ santykis naudojamas DNR švarumo įvertinimui. Geros kokybės DNR A₂₆₀/A₂₈₀ santykis turėtų būti ~1,8. Atsižvelgus į DNR mėginių švarumą, geros kokybės mėginiai toliau koncentruojami arba skiedžiami dejonizuotu vandeniu iki tolimesniems tyrimams reikalingos koncentracijos.

Plataus masto genotipavimo tyrimas

Plataus masto genotipavimo principas. Genominės DNR mėginių plataus masto genotipavimas atliekamas pagal VNP žymenis (nuo 700 000 iki 1.8 mln. VNP) naudojant lustus (pvz. *Infinium Global Screening Array-24 v3.0 Kit*, *Illumina*). Kiekviename *Illumina* rinki-

nyje yra lustai (BeadChips) kartu su reagentais, skirtais DNR mėginiams (koncentracija ~200 ng 50 ng/μL) amplifikuoti, fragmentuoti, hibridizuoti, žymėti ir aptikti (*iScan Illumina* instrumentu) (1 pav.).



1 pav. Plataus masto genotipavimo *Illumina Infinium* tyrimo protokolas ir darbo eiga

Analizė remiasi viso genomo amplifikacija (1 val. ir inkubacija 37°C, 20–24 val.) pagausinant DNR iki 1000 kartų; amplifikuota DNR yra fragmentuojama (37°C, 1 val.), nusodinama, resuspenduojama (48°C, 1 val.) ir hibridizuojama su VNP specifiniais pradmenimis, kurie yra imobilizuoti luste (hibridizacija vyksta 48°C, 16–24 val.). Toliau vykdomas pohibridizacinis etapas (lusto dažymas), kuris apima atplovimo ir vieno nukleotido pratęsimo reakciją su pratęstu nukleotidu, žymėtu fluorescenciniu dažikliu, ir signalo sustiprinimas dažais. Fluorochromais žymėti nukleotidai yra aptinkami naudojant *Illumina iScan* optinę sistemą, kuri identifikuoja spalvas ir signalo intensyvumą. Pirminių duomenų kokybės kontrolė (duomenų normalizavimas, klasterizacija ir genotipų klasifikavimas) ir pirminė analizė atliekama naudojant *GenomeStudio 2.0* programinę įrangą.

*Plataus masto genotipavimo protokolas.***(1) gDNR gausinimas**

Etapui naudojami reagentai: MA1, MA2, MSM, 0,1 N NaOH

Darbo eiga:

- ♦ Atsižvelgiant į tiriamų DNR mėginių skaičių, į MSA3 / MSA6 plokštelę išpilstoma po 20 µl MA1 reagento.
- ♦ Į plokštelės kiekvieną šulinėlį su MA1 įpilti po 4 µl 0,1 N NaOH.
- ♦ Į plokštelės šulinėlius įpilti po 200 ng DNR (t. y. po 4 µl DNR (50±5) ng/µl koncentracijos). Uždengti plokštelę dengiamuoju dangteliu.
- ♦ Purtyti plokštelę purtyklėje 1600 aps./min. greičiu 1 min. Centrifuguoti 280×g greičiu 1 min.
- ♦ Inkubuoti plokštelę kambario temperatūroje (nuo +18 °C iki +25 °C) 10 min.
- ♦ Į kiekvieną plokštelės šulinėlį su mėginiais išpilstyti po 34 µl MA2 reagento.
- ♦ Į kiekvieną plokštelės šulinėlį su mėginiais išpilstyti po 38 µl MSM reagento.
- ♦ Uždengti plokštelę dengiamuoju dangteliu. Purtyti purtyklėje 1600 aps./min. greičiu 1 min. Centrifuguoti 280×g greičiu 1 min.
- ♦ Inkubuoti plokštelę hibridizacijos krosnyje +37 °C 20–24 val.

(2) gDNR skaidymas

Etapui naudojami reagentai: FMS

Darbo eiga:

- ♦ Išimti iš hibridizacijos krosnies MSA3 / MSA6 plokštelę, nucentrifuguoti 280×g greičiu 1 min.
- ♦ Į plokštelės šulinėlius su mėginiais išpilstyti po 25 µl FMS reagento, uždengti plokštelę dengiamuoju dangteliu. Purtyti 1600 aps./min. greičiu 1 min. Centrifuguoti plokštelę 280×g greičiu 1 min.
- ♦ Inkubuoti plokštelę mikroplokštelių inkubatoriuje +37 °C 1 val.

(3) gDNR išsodinimas

Etapui naudojami reagentai: PM1, 2-propanolis

Darbo eiga:

- ♦ Į MSA3 / MSA6 plokštelės mėginių šulinėlius po 50 µl išpilstyti PM1 reagentą, uždengti dengiamuoju dangteliu. Purtyti 1600 aps. / min. greičiu 1 min.
- ♦ Inkubuoti plokštelę mikroplokštelių inkubatoriuje +37 °C 5 min. Po inkubavimo centrifuguoti 280×g greičiu 1 min.
- ♦ Į kiekvieną plokštelės šulinėlį išpilstyti po 155 µl 100 % 2-propanolio, uždengti plokštelę nauju dengiamuoju dangteliu. 10 kartų apversti.

- ♦ Inkubuoti plokštelę šaldytuve (nuo +2 °C iki +8 °C) 30 min.
- ♦ Po inkubavimo plokštelę centrifuguoti 3000×g greičiu 20 min. Po centrifugavimo plokštelės šulinėliuose su mėginiais dugne turi būti matomos melsvos spalvos nuosėdos.
- ♦ Nedelsiant išimti plokštelę iš centrifugos, pašalinti dengiamąjį dangtelį ir staigiu judesiu apversti plokštelę ant beplaušių sugertukų. Neleidžiant supernatantui pakliūti į kitus šulinėlius stipriai daužyti plokštelę ant absorbuojančių beplaušių sugertukų 1 min.
- ♦ Apverstą neuždengtą plokštelę ant mėgintuvėlių stovo džiiovinti kambario temperatūroje (nuo +18 °C iki +25 °C) 1 val.
- ♦ Prieš resuspendaciją įsitikinti, kad nuosėdos išdžiūvo.

(4) *gDNR resuspendacija*

Etapui naudojami reagentai: RA1

Darbo eiga:

- ♦ Į MSA3 / MSA6 plokštelę su nuosėdomis išpilstyti po 23 µl RA1 reagento.
- ♦ Ant plokštelės užlydyti dengiamosios folijos lapą naudojantis folijos užlydytuvu (folijos lapo matine puse į vidų).
- ♦ Plokštelę inkubuoti hibridizacijos krosnyje +48 °C 1 val. Po inkubavimo plokštelę purtyti 1800 aps./min. greičiu 1 min.; centrifuguoti 280×g greičiu 1 min.

(5) *gDNR hibridizacija ant lustų*

Etapui naudojami reagentai: PB2

Darbo eiga:

- ♦ Hibridizacijos kameros paruošimas: surinkti hibridizacijos kamerą, į hibridizacijos kameros dugną tinkamai įdėti guminę tarpinę, į dugne esančius rezervuarus, priklausomai nuo naudojamų lustų skaičiaus, įpilti po 400 µl PB2 reagento, uždengti hibridizacijos kamerą dangčiu.

Hibridizacija:

- ♦ Resuspenduotus mėginius MSA3 / MSA6 plokštelėje denatūruoti mikroplokštelių inkubatoriuje +95 °C 20 min.
- ♦ Po denatūravimo plokštelę vėsinti kambario temperatūroje 30 min.
- ♦ Plokštelę trumpai centrifuguoti 280×g greičiu.
- ♦ Išpakuoti lustus ir tinkamai sudėti į hibridizacijos kameros įdėklus, kurie užpylus DNR mėginius ant lustų bus dedami į hibridizacijos kamerą.
- ♦ Ant atitinkamo įleidimo į lustą laukelio užpilti po 14 µl resuspenduoto DNR mėginio.

- ♦ Nedelsiant, lustus, esančius hibridizacijos kameros įdėkluose, tinkamai įdėti į hibridizacijos kameroje jiems esančias vietas ir atsargiai uždengti hibridizacijos kameros dangčiu. Dviem judesiais užspausti hibridizacijos kameros užraktus.
- ♦ Hibridizacijos kamerą padėti ant hibridizacijos krosnies padėklo taip, kad kameros užraktai būtų nukreipti į kairę ir į dešinę krosnies sienas.
- ♦ Inkubuoti esant 5 vienetų hibridizacijos krosnies padėklo siūbavimui $+48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 16–24 val.

(6) *Lustų plovimas*

Etapui naudojami reagentai: PB1

Darbo eiga:

- ♦ Išimti hibridizacijos kamerą iš hibridizacijos krosnies ir palaukti 25 min. kol atvės iki kambario temperatūros (nuo $+18\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- ♦ Pripildyti (~200 ml) du stiklinius indus PB1 reagentu. Metalinį lustų laikiklį pažymėti į pirmąjį indą su PB1 reagentu.
- ♦ Paruošti daugiavietį lustų talpiklį. Pripildyti jį ~150 ml PB1 reagento (kad lustai būtų visiškai apsemti).
- ♦ Paruošti *Te-Flow*TM tėkmės kamerų dalis: juodus rėmelius, plastikines tarpines (*Infinium LCG glass back spacers*), dengiamuosius stiklus (*Infinium LCG glass back plates*) ir gnybtukus.
- ♦ Dengiamuosius stiklus paruošti iš anksto kiekvieną kartą prieš naudojant plauti 1 % detergento tirpalu (pvz., *Alconox*[®]) pagal gamintojo nurodytą protokolą.
- ♦ Įjungti termostatą ir vandens cirkuliacijos sistemą prijungtą prie *Te-Flow*TM tėkmės kamerų laikiklio *Tecan*, kad nusistovėtų $+44\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra (temperatūros matavimui naudoti nešiojamą RTD termometrą).
- ♦ Hibridizacijos kamerai atvėsus, ją atidaryti ir išimti įdėklus su lustais.
- ♦ Iš įdėklo išimti po vieną lustą, jį laikant brūkšniniu kodu arčiau savęs, vienu lėtu įstrižu tęstiniu judesiu nuimti lusto plėvelę. Neliesti lusto paviršiaus su hibridizuotais DNR mėginiais. Saugoti lustą nuo išdžiūvimo.
- ♦ Nulupus plėvelę, lustą palengva panardinti į metalinį lustų laikiklį pirmame inde su PB1 reagentu.
- ♦ Visiems lustams esant panardintiems metaliniame lustų laikiklyje pirmame inde su PB1 reagentu, lustų laikiklį aktyviai, bet švelniai kilnoti kertant skysčio paviršių 1 min.
- ♦ Perkelti VNP-LGH lustų laikiklį su VNP-LGH lustais į antrą indą su PB1 reagentu ir aktyviai, bet švelniai kilnoti kertant skysčio paviršių 1 min.

Te-Flow™ tėkmės kamerų surinkimas

- ♦ Paruošti daugiavietį lustų talpiklį, čia patalpinti juodus rėmelius į jiems skirtas vietas talpiklyje.
- ♦ Į rėmelius įdėti lustus, įsitikinti, kad jie yra pilnai panirę PB₁ reagente.
- ♦ Atskyrus nuo baltų apsauginių plėvelių, permatomas plastikines tarpines tinkamai uždėti ant panardintų lustų.
- ♦ Tinkamai uždėti talpiklio laikiklį ant lustų talpiklio su rėmeliais, lustais ir tarpinėmis.
- ♦ Suspausto sauso oro priemone nupūsti dulkes nuo tinkamai išplautų ir 70 % etanolio nuvalytų dengiamųjų stiklų ir nedelsiant stiklus guldyti ant lustų su plastikinėmis tarpinėmis.
- ♦ Kiekvienos surenkamos *Te-Flow™* tėkmės kameros dviejose vietose užspausti gnybtukus – 5 mm atstumu nuo viršaus ir brūkšninio kodo pusėje 5 mm atstumu nuo reagentų rezervuaro pradžios;
- ♦ Žirklėmis nukirpti išsikišusias plastikinių tarpinių dalis abiejose surinktos *Te-Flow™* tėkmės kameros pusėse.
- ♦ Surinktas *Te-Flow™* tėkmės kameras laikyti horizontaliai ant darbastalio ir talpinti į *Te-Flow™* tėkmės kamerų laikiklį *Tecan* tik tuomet, kai viskas paruošta tolesnei dažymo procedūrai.
- ♦ Tuščią hibridizacijos kamerą nedelsiant plauti dH₂O, o PB₂ reagento rezervuarus kruopščiai patrinti šepetėliu tam, rekomenduojama plovimui naudoti 1 % detergento tirpalą (pvz., *Alconox®*) ir po to gausiai praskalauti dH₂O.

(7) Lustų dažymas

Etapui naudojami reagentai: RA₁, LX₁, LX₂, EML, XC₃, SML, ATM, PB₁, XC₄, 95% formamido ir 1mM EDTA mišinys.

Darbo eiga:

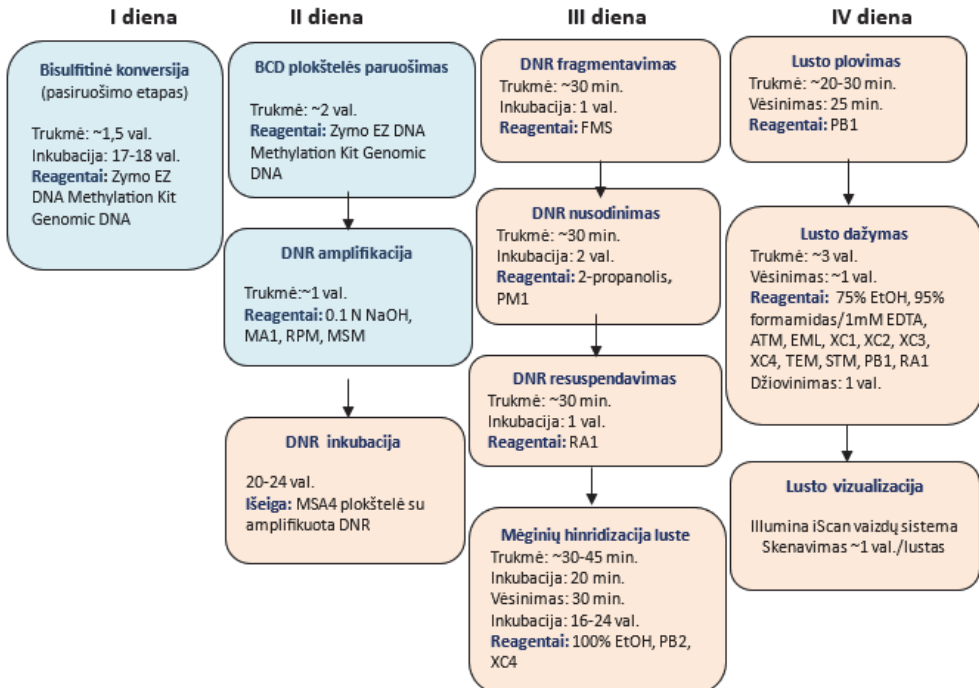
- ♦ *Vienos bazės pratęsimo reakcija*
 - Įsitikinus, kad *Tecan* laikiklio paviršiaus temperatūra yra +44°C, patalpinti surinktas *Te-Flow™* tėkmės kameras į *Te-Flow™* tėkmės kamerų laikiklį *Tecan*.
 - Į kiekvieną *Te-Flow™* tėkmės kamerą automatine pipete įpilti:
 - 150 µl RA₁ reagento, inkubuoti 30 s, kartoti 5 kartus (iš viso 6 įpylimai);
 - 225 µl LX₁ reagento, pakartoti vieną kartą, inkubuoti 10 min.;
 - 225 µl LX₂ reagento, pakartoti vieną kartą, inkubuoti 10 min.;
 - 300 µl EML reagento, inkubuoti 15 min.;
 - 250 µl FA ir EDTA reagento, inkubuoti 1 min., du kartus pakartoti ir inkubuoti 5 min.

- Termostato ir vandens cirkuliacijos sistemoje nustatyti temperatūrą nurodytą ant SML reagento buteliuko.
 - 250 µl XC₃ reagento, inkubuoti 1 min., pakartoti du kartus.
- ♦ *Lustų dažymas*
 - Jei įvykdžius protokolą numatoma iš karto skenuoti lustus, įjungti HiScan™SQ sistemos *iScan* genominių analizatorių.
 - Dažymą pradėti tik tuomet, kai pasiekta ant SML reagento pakuotės nurodyta temperatūra.
 - Į kiekvieną Te-Flow™ tėkmės kamerą automatine pipete įpilti:
 - 250 µl SML reagento, inkubuoti 10 min.;
 - 250 µl XC₃ reagento, inkubuoti 1 min., du kartus pakartoti ir inkubuoti 5 min.;
 - 250 µl ATM reagento, inkubuoti 10 min.;
 - 250 µl XC₃ reagento, inkubuoti 1 min., du kartus pakartoti ir inkubuoti 5 min.;
 - 250 µl SML reagento, inkubuoti 10 min.;
 - 250 µl XC₃ reagento, inkubuoti 1 min., du kartus pakartoti ir inkubuoti 5 min.;
 - 250 µl ATM reagento, inkubuoti 10 min.;
 - 250 µl XC₃ reagento, inkubuoti 1 min., du kartus pakartoti ir inkubuoti 5 min.;
 - 250 µl SML reagento, inkubuoti 10 min.;
 - 250 µl XC₃ reagento, inkubuoti 1 min., du kartus pakartoti ir inkubuoti 5 min.
 - Nedelsiant išimti Te-Flow™ tėkmės kameras iš laikiklio *Tecan*, padėti horizontaliai ant darbastalio.
- ♦ *Lustų plovimas ir padengimas*
 - Į plastikinį plovimo indą įpilti ~310 ml PB₁ reagento, į jį tinkamai patalpinti plastikinį lustų laikiklį plovimui po dažymo.
 - Išrinkti *Te-Flow*™ tėkmės kameras: mentele atkabinti gnybtukus; atsargiai nuimti dengiamuosius stiklus; stengiantis nepaliesi lusto mėginių zonų nuimti plastikines tarpines;
 - Lustą brūkšniniu kodu nuo savęs nedelsiant panardinti į PB₁ tirpale esantį plastikinį laikiklį. Pusę lustų talpinti prieš laikiklio rankeną, pusę – už. Lustai turi būti pilnai panardinti PB₁ reagente.
 - Lėtai kertant PB₁ reagento paviršių kilnoti plastikinį laikiklį su lustais aukštyn-žemyn 10 kartų. Palaikyti 5 min.

- Supurtyti XC4 reagentą, įsitikinti, kad jis visiškai resuspendavęs.
- Į plastikinį plovimo indą įpilti ~310 ml XC4 reagento, nelaikyti jo inde ilgiau nei 10 min.
- Po lustų mirkymo PB1 reagente, plastikinį lustų laikiklį tinkamai patalpinti į indą su XC4 reagentu.
- Lėtai kertant XC4 reagento paviršių kilnoti plastikinį laikiklį su lustais aukšty-žemyn 10 kartų. Palaikyti 5 min.
- Lėtai ištraukti ir nuvarvinti plastikinį laikiklį su lustais iš XC4 reagento indo, laikiklį padėti ant mėgintuvėlių stovo taip, kad lustų brūkšniniai kodai būtų nukreipti į viršų.
- Iš plastikinio laikiklio ištraukti lustus ir išrikiuoti ant mėgintuvėlių stovo brūkšniniais kodais į viršų.
- Lustus džiovinti vakuuminėje džiovyklėje 50–55 min esant 675 mm Hg (0,9 bar).
- Išdžiovintų lustų reversines puses atsargiai nušluostyti nuo XC4 reagento pertekliaus 70 % etanolio suvilgytomis beplaušėmis servetėlėmis.
- ♦ *Lustų skenavimas Illumina iScan genetiniu analizatoriumi.*
 - iScan genetinio analizatoriaus paruošimas: įjungti kompiuterį ir suvesti prisijungimo duomenis; įjungti Illumina iScan genetinį analizatorių; pradiniam darbalaukio lange pasirinkti *iScan Control Software (iCS)* aplikaciją ir suvesti prisijungimo duomenis; iš anksto per DMAP Client programą parsisiųsti lustų (pagal kiekvieną unikalų brūkšninį kodą) dekodavimo dokumentus, kiekvienam lustui po vieną *.dmap* dokumentą. Juos patalpinti DMAPS kataloge.
 - *Lustų skenavimas: iCS aplikacijoje* pasirinkti *Start* → atsidarius prietaiso durelėms ant išvažiavusios platformos į atitinkamas vietas tinkamai sudėti paruoštus lustus, → *iCS* aplikacijoje pasirinkti *Next*, prietaiso durelės užsidaro. Genetinis analizatorius nuskaito lustų brūkšninius kodus. → Pasirodo lentelė (3×4) su kiekvieno lusto duomenimis (brūkšninio kodo skaitmenimis, lusto tipu ir skenavimo protokolu bei vaizdo formatu). → Naudojantis *Settings* mygtukais lentelėje pagal poreikį galima atlikti nustatymų korekcijas. Lentelės apačioje esančiuose laukeliuose būtina nurodyti *.dmap* dokumentų katalogą (angl. *Input path*) ir po skenavimo gaunamų duomenų kaupimo katalogą (angl. *Output path*).
- ✓ Jeigu viskas yra atlikta, pasirinkti *Scan*. Skenavimo trukmė priklausomai nuo skenuojamų lustų skaičiaus – iki 2 valandų.

Plataus masto epigenomo tyrimas

Plataus masto metilomo analizės principas. Plataus masto metilomo analizė atliekama taikant *Illumina* lustus *Infinium Methylation EPIC v2.0 BeadChip Kit* (32 Spl), kurie leidžia aptikti > 935 000 žymenų bei nustatyti tikslinių genomo sričių metilinimo lygio skirtumus DNR mėginiuose. Kiekviename *Illumina* rinkinyje yra lustas su reagentais, skirtais DNR mėginiams (200 ng / 50 ng/μL DNR išskirta iš kraujo leukocitų) amplifikuoti, fragmentuoti, hibridizuoti, žymėti ir aptikti *iScan Illumina* instrumentu. Pradiniam darbo etapui – DNR bisulfitinimui – reikalingi papildomi reagentai Zymo EZ DNR metilinimo rinkinys (*Bisulfite conversion, EZ DNA Methylation™ Kits*, Zymo). Analizės esmę sudaro viso metilomo vertinimas, aptinkant citozino metilinimą CpG salose, remiantis daugialypiu bisulfitu konvertuotos genominės DNR genotipavimu. Apdorojant DNR bisulfitu, nemetilinti citozinai chemiškai modifikuojami į uracilą, o metilinti citozinai lieka nepakitę. Bisulfito konversijos metu reikia laikytis *Illumina* rekomenduojamų inkubavimo sąlygų, kad padidinti DNR konversijos greitį, tačiau atlikdami visus kitus veiksmus, reikia vadovautis gamintojo (Zymo EZ) instrukcijomis. Bisulfitu konvertuoti



2 pav. Plataus masto DNR metilinimo analizės protokolai ir darbo eiga

genominės DNR mėginiai perkeliama į plokštelę, tolesni tyrimo etapai atitinka plataus masto genotipavimo *Illumina Infinium* tyrimo protokolą (2 pav. ir 2.1.1. skyrius „Plataus masto genotipavimo protokolas“). Darbas vykdomas griežtai laikantis gamintojo protokolo (https://support-docs.illumina.com/ARR/Inf_HD_Methylation/Content/ARR/FrontPages/inf_hd_methylation_pg.htm) pagal schemą pateiktą 2 paveiksle.

DNR metilinimo duomenų analizė bioinformaciniais įrankiais. *Illumina Methylation EPICv2.0* metilinimo duomenys paprastai gaunami intensyvumo duomenų failų (angl., intensity data, IDAT) patentuotu formatu, kurį išveda iScan skenavimas ir kuriame saugomas kiekvieno lusto zondo intensyvumas. Pirminių duomenų apdorojimas atliekamas su „GenomeStudio“ programine įranga. Ji naudojama duomenų kokybės kontrolei atlikti. Metilinimo duomenų kokybės kontrolei galima naudoti ir R „Bioconductor“ paketus „SeSAMe“ bei „DMRcate“, su kuriais IDAT formato žaliaviniai duomenys paverčiami į skaitines metilinimo signalo stiprumo vertes. Šie paketai leidžia atlikti tolesnį metilinimo duomenų normalizavimą ir diferencinius tyrimus.

Metilinimo frakcijos vertės, kurių klaidingo aptikimo tikimybė didesnė nei 0,01 ($p > 0,01$), nevertinamos pašalinant jas iš analizės. Taip pat jeigu mėginyje yra nuo 10% iki 20% nevertinamų metilinimo frakcijos reikšmių tokie mėginiai pašalinami iš analizės.

Duomenų kokybės kontrolė. Likusiems mėginiams ir analizei tinkamiems metilinimo frakcijos vertėms atliekama dažo nuokrypio ir fono korekcija (angl. „Dye-bias and background correction“) ir normalizavimas „Noob“ (angl., normal-exponential out-of-band) metodu. „Noob“ yra „normalus eksponentinis už juostos ribų“ fono korekcijos ir dažų poslinkio išlyginimo metodas, naudojamas analizuojant *Illumina Infinium* metilinimo matricas. Tai metodas, kuris naudoja už juostos ribų esančius valdymo zondus, kad įvertintų ir ištaisytų fono surišimą normalizuojant duomenis [30]. Toliau mėginių tinkamumo tyrimui patikrinimas atliekamas naudojant daugiamačių mastelio keitimą (angl. „Multidimensional scaling“, MDS) ir pagrindinių komponentų analizę (ang. „Principal component analysis“, PCA). Šie metodai projektuoja daugiamačius mėginius į mažesnio matumo erdvę, kas leidžia pastebėti atskirų mėginių nuokrypius nuo savo kategorijos ir aptikti partijos efektus (angl. „Batch effect“) kada skirtumai tarp mėginių yra sąlygoti techninių artefaktų, kaip pavyzdžiui tie patys mėginiai surinkti skirtingose laboratorijose arba skirtingu laiku, ir matysis kaip skirtingos viena nuo kitos nutolusios grupės projekcijų erdvėje. Partijos efektams pataisyti arba naudojami papildomi normalizavimo metodai (artimiausių bendrų kaimynų arba dirbtinių kintamųjų analizė (angl. „Surrogate variable analysis“) bet dažniausiai atrastas partijos efektas yra anotuojamas ir tolesnėje analizėje įtraukimas kaip papildomas kovariantinis kintamasis.

Metilinimo skirtumų tarp grupių ir asociacijos su fenotipu testavimas. Metilinimo frakcijos skirtumai gali būti stebimi tarp skirtingų kokybinių fenotipinių grupių (kaip lytis, gyvenimo būdas ir kt., pvz., skirtumai tarp rūkančių arba nerūkančių). Metilinimo frak-

cijos skirtumai gali būti asocijuoti ir su tolydžiai kintančiais fenotipais, kaip kūno masės indeksas (KMI) ar santykinis telomerų ilgis. Metodai naudojami reikšmingų metilinimo frakcijos skirtumų nustatymui tarp grupių ar asociacijos su tolydžiu fenotipu yra paremti tiesiniais modeliais. „Bioconductor“ R paketai „SeSAMe“ ir „DMRcate“ skirti metilinimo duomenų analizei naudoja „limma“ (angl., linear model matrix) metodą [31]. *Limma* yra tiesinių modelių naudojimas analizuojant visus eksperimentus kaip integruotą visumą, – tai turi įtakos dalijimuisi informacija tarp mėginių. Kiekvienam lusto zondui (angl. „probe“) įvertinama ar yra reikšmingas metilinimo frakcijos skirtumas tarp grupių, ar stipri koreliacija tarp fenotipo ir metilinimo frakcijos, parodanti asociaciją. Skirtumui tarp grupių vertinti „limma“ atlieka t-testą patikrinti ar metilinimo frakcijos vidurkis reikšmingai skiriasi tarp mėginių, kurie priklauso skirtingoms grupėms. Nustatyti asociacijai su kiekybiniu fenotipu „limma“ atlieka tiesinės regresijos modelio koeficientų ir jų reikšmingumo vertinimą. Asociacijos nustatyme į regresijos modelį gali būti įtraukti papildomi kintamieji, kurie gali įtakoti asociacijos stiprumą (pvz., amžius ir lytis). Kiekvienam lusto zondui, kuris buvo įtrauktas į analizę „limma“ suskaičiuoja skirtumo arba asociacijos efekto dydį, statistikos reikšmę ir p reikšmingumo lygmenį. Taip pat kiekvienam zondui yra įvertinama klaidingo aptikimo tikimybė (angl. „False discovery rate“, FDR). Tie zondai kuriems $FDR < 0.05$ yra atrenkami kaip žymenys, kurių metilinimo frakcija reikšmingai skiriasi tarp grupių ar kitu atveju yra reikšmingai asocijuota su tolyginiu fenotipu. Jeigu reikšmingi zondai žymenys CpG salose patenka į geno sritį ar persidengia su genine sritim, tuomet šis persidengimas atskleidžia galimą nustatyto geno sąsają su tiriamu fenotipu per reguliacinius kelius ir mechanizmus. Tam, kad atskleisti kokie tai gali būti biologiniai reguliaciniai keliai reikalinga tolesnė analizė paremta žymens geninės aplinkos tyrimu. Žymens geninės aplinkos tyrimas gali būti atliekamas pasinaudojant egzistuojančiomis genomo naršyklių duomenų bazėmis tokiomis kaip Santa Kruzo Kalifornijos Universiteto Genomo Naršyklė (angl., „UCSC Genome Browser“), Europos Bioinformatikos Instituto „Ensembl“ duomenų bazė arba Nacionalinio Biotechnologijos Informacijos Centro (angl., „National Center of Biotechnology Information“ NCBI) duomenų bazė.

Santykinio telomerų ilgio nustatymas

Periferinio kraujo leukocitų santykinio telomerų ilgio (STI) matavimas atliekamas taikant kiekybinę realaus laiko polimerazės grandininę reakciją (RL-PGR) – tai didelio našumo metodas, nereikalaujantis didelių DNR kiekių ir yra patogus didelių imčių epidemiologiniuose tyrimuose.

STI nustatymo metodologija gali remiantis Joglekar ir kitų mokslininkų [32] aprašyta optimizuota RL-PGR metodika. Norint įvertinti STI, amplifikuojamos telomeros ir vienos kopijos genas – žmogaus β -globino (*HBB*) genas. Atliekami du pakartojimai. Kaip referentinė-kontrolinė DNR tyrime naudojamas trijų su tyrimu nesusijusių asmenų DNR mišinys. Tyrimo metu prie dvigrandės DNR nespecifiškai jungiasi fluorescencinis dažas „SYBR® Green I“. Pagal didėjantį fluorescencijos lygį po kiekvieno RL-PGR ciklo nustatomas produkto kiekis. Kai fluorescencija 10 kartų viršija foninį lygį (angl. *baseline*) ir pasiekiamas slenkstinis lygis (angl. *threshold*), fiksuojama Ct (angl. *cycle threshold*) vertė, kuri toliau naudojama STI apskaičiavimui.

Naudojami reagentai ir priemonės: RL-PGR plokštelė „MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate“ (Thermo Fisher Scientific, JAV), optinė plėvelė „Optical Adhesive Covers“ (Thermo Fisher Scientific, JAV), sterilūs 1,5 ml talpos mikrocentrifuginiai mėgintuvėliai, vanduo be nukleazų (QIAGEN N.V., Vokietija), RL-PGR mišinys „SYBR™ Green PCR Master Mix“ (Thermo Fisher Scientific, JAV), pradmenų sekos (Thermo Fisher Scientific, pasirinktos pagal Joglekar ir kt., 2020 [32]):

- TelA 5'-CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT-3'
- TelB 5'-GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT-3'
- HBB₁ 5'-GCT TCT GAC ACA ACT GTG TTC ACT AGC-3'
- HBB₂ 5'-CAC CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'

Įranga: RL-PGR termocikleris „7900HT Fast Real-Time PCR System“ (Applied Biosystems, JAV), centrifuga „HETTICH ZENTRIFUGEN D-78532 Tuttlingen“ (Hettich Zentrifugen, Vokietija), mini centrifuga „Mini centrifuge ROTILABO®“ (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija), purtyklė (Vortex) „Lab Dancer Vario“ (IKA Works GmbH & Co. KG, Vokietija).

RL-PGR plokštelės surinkimas vykdomas sterilioje aplinkoje (traukos spintoje – *Laminare*). Pradmenys ir DNR mėginiai atšildomi kambario temperatūroje, supurtomi ir nucentrifuguojami. Pagal 3-oje lentelėje pateiktus reagentų tūrius 1,5 ml mėgintuvėliuose paruošiami du RL-PGR reakcijos mišiniai: vienas – telomerų pagausinimui, kitas – *HBB* geno.

Į mėgintuvėlį supilami visi reagentai, išskyrus DNR. Reakcijos mišiniai supurtomi ir nucentrifuguojami. Į RL-PGR plokštelės šulinėlius išpilstoma po 19 μ l reakcijos mišinio: į 48 šulinėlius telomerų amplifikacijai skirta reakcijos mišinio, į kitus 48 šulinėlius – *HBB* amplifikacijai skirta reakcijos mišinio. Į šulinėlius įnešama po 1 μ l DNR mėginio arba referentinės DNR. Atliekami du pakartojimai. Neigiamai kontrolei į šulinėlį neįnešama DNR.

3 lentelė. RL-PGR reakcijos mišinio sudėtis santykinio telomerų ilgio nustatymui

Reagentas		Pradinė koncentracija	Galutinė koncentracija	Tūris vienam mėginiui, µl
Vanduo be nukleazių		-	-	5
Pradmenys	TelA + TelB	100 µM + 100 µM	0,8 µM + 1,5 µM	2 + 2
	HBB1 + HBB2	100 µM + 100 µM	3 µM + 7 µM	2 + 2
RL-PGR mišinys „SYBR™ Green PCR Master Mix“		2X	2X	10
Viso:		-	-	19
DNR			20 ng/µl	1
Viso:		-	-	20

Surinkta plokštelė uždengiama optine plėvele, apsaugančia nuo garavimo. Plokštelė centrifuguojama 2 000 aps./min. 2 min. Plokštelė uždengiama nuo išsilydymo ją apsaugančių terminių kompresu ir įdedama į RL-PGR termociklerį. „SDS 2.3 Applied biosystems™“ programoje pasirenkama standartinės kreivės 96-ių šulinėlių plokštei programa. Kaip detektorius pasirenkamas „SYBR® Green I“ dažas. Sukuriama temperatūrinė programa (4 lentelė).

4 lentelė. RL-PGR temperatūrinė programa santykinio telomerų ilgio nustatymui

Etapas	Temperatūra	Trukmė	Ciklų skaičius
DNR polimerazės aktyvacija	95 °C	10 min.	1
Denatūracija	95 °C	15 s	35
Pradmenų hibridizacija	60 °C	2 min.	
Lydimosi kreivės stadija	95 °C	15 s	1
	60 °C	1 min.	1
	95 °C		1

Pasibaigus reakcijai, fiksuojamos Ct vertės. Siekiant patikrinti PGR produktų specifiškumą, papildomai atliekama lydimosi kreivės analizė. Telomerų produkto lydimosi temperatūra ~76°C, o *HBB* produkto – ~80°C.

RL-PGR efektyvumo įvertinimas. Norint užtikrinti RL-PGR optimizaciją ir kokybišką STI apskaičiavimą, nustatomas telomerų ir *HBB* geno reakcijų efektyvumas. Šis rodiklis įtakojamas pasirinktos detekcijos sistemos bei naudojamų pradmenų struktūros (leidžia patikrinti, ar nėra klaidų ruošiant mėginius). RL-PGR reakcijos efektyvumas vertinamas

atliekant referentinės DNR dukartinius serijinius skiedimus su dviem pakartojimais: 20 ng/μl, 10 ng/μl, 5 ng/μl, 2,5 ng/μl ir 1,25 ng/μl. Pagal gautų serijinių skiedimų Ct verčių priklausomybę nuo koncentracijos logaritminėje skalėje konstruojama standartinė kreivė. Naudojant standartinės kreivės nuokrypio kampą, reakcijos efektyvumas (E) apskaičiuojamas pagal šią formulę: $E = 10^{(-1/\text{nuokrypio kampas})}$.

Procentinė reakcijos efektyvumo išraiška apskaičiuojama: $E\% = (E - 1) \times 100 \%$.

Idealiu atveju, kai reakcijos efektyvumas lygus 100 % ir po kiekvieno amplifikacijos ciklo reakcijos produkto kiekis padvigubėja, kreivės nuokrypio kampas lygus $-3,32$. Tai gi, optimizuotos RL-PGR reakcijos STI apskaičiavimui pasižymėjo reakcijos efektyvumu 90–110% ir standartinės kreivės determinacijos koeficientu (R^2) $>0,98$.

Santykinio telomerų ilgio apskaičiavimas. Rezultatų analizė ir STI apskaičiavimas vykdomas naudojantis MS Excel programa. Pagal dviejų pakartojimų rezultatus kiekvienam DNR mėginiui ir referentinei DNR apskaičiuojama vidutinė Ct reikšmė ($Ct_{vid.}$) ir standartinis nuokrypis. Viso tyrimo metu išlaikoma tokia pati slenkstinio lygio vertė – 0,2. Kiekvieno tiriamojo telomeroms ir referentiniam *HBB* genui pagal formulę apskaičiuojama ΔCt :

$$\Delta Ct = Ct_{vid.}(\text{referentinės DNR}) - Ct_{vid.}(\text{mėginio})$$

Apskaičiuojamas santykinis telomerų ilgis (STI):

$$STI = \Delta \Delta Ct = \frac{E(\text{telomerų})^{\Delta Ct(\text{telomerų})}}{E(HBB)^{\Delta Ct(HBB)}}$$

Kiekvienam mėginiui ir referentinei DNR pagal formulę apskaičiuojama ΔCt :

$$\Delta Ct = Ct_{vid.}(HBB) - Ct_{vid.}(\text{telomerų})$$

Apskaičiuojamas santykinis telomerų ilgis (STI):

$$STI = \Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{mėginio}) - \Delta Ct(\text{referentinės DNR})$$

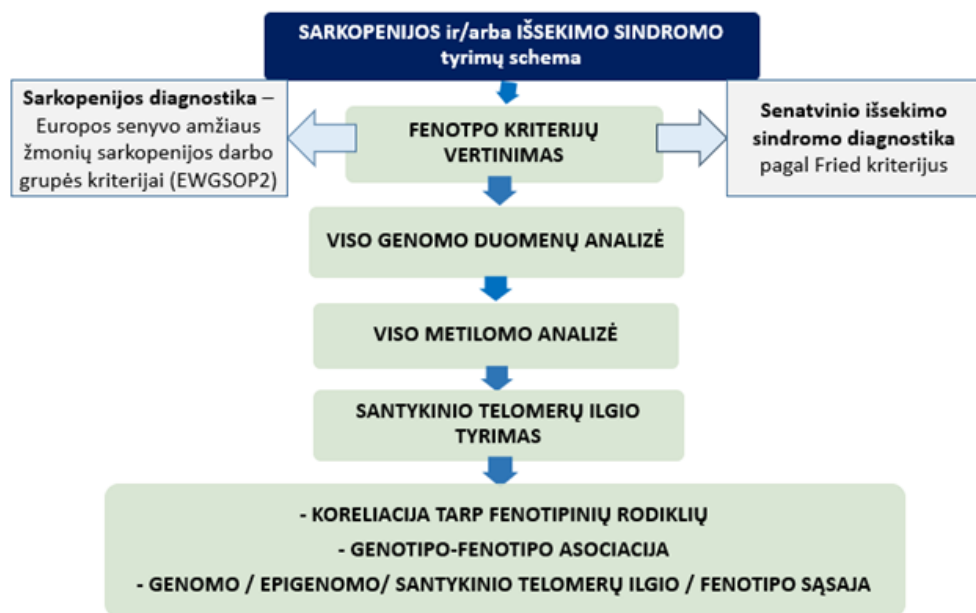
Norint įvertinti tyrimo pakartojamumą ir atkartojamumą, skaičiuojami referentinės DNR pakartojimų Ct verčių variacijos koeficientai. Vertinant šiuos aspektus tyrimo vi-
duje (angl. *intra-assay*), variacijos koeficientai apskaičiuojami tarp referentinės DNR pakartojimų vienoje plokštelėje. Vertinant pakartojamumą ir atkartojamumą tarp tyrimų, variacijos koeficientai apskaičiuojami tarp referentinės DNR pakartojimų bent trijose skirtingose plokštelėse.

IV. SARKOPENIJOS IR IŠSEKIMO SINDROMO GENETINĖS RIZIKOS VERTINIMAS PAGAL FENOMO, GENOMO, EPIGENOMO IR SANTYKINIO TELOMERŲ ILGIO TYRIMŲ REZULTATUS

Šiuolaikinis mokslų pagrįstas sarkopenijos ir išsekimo sindromo rizikos vertinimas turi būti kompleksiškas atsižvelgiant į fenotipinius rodiklius, genomo variaciją, epigenomo (DNR metilinimo) lygio profilį, santykinio telomerų ilgio dinamiką bei pagal šiuo metu nustatytus ir patvirtintus biožymenis bei jų sąveiką.

Apibendrinta sarkopenijos ir/arba išsekimo sindromo tyrimų schema (remiantis GEPITEL projekto multi-omikos ir bioinformatinės-biostatistinės analizės seka) pavaizduota 3 paveiksle.

Atlikti GEPITEL tyrimų rezultatai rodo, kad senyvame amžiuje esant sarkopenijai ir išsekimo sindromui, išryškėja specifiniai šiems geriatriniais sindromams ir patologiniam senėjimui būdingi klinikiniai, genetinio polinkio ir epi-genomo ypatumai:



3 pav. Apibendrinta sarkopenijos ir/arba senatvinio išsekimo sindromo tyrimų schema.

- ♦ susiję su poliligitumu, depresiškumo požymiais, mitybos nepakankamumu, padidėjusia griuvimų rizika ir prastesne neuromotorinė funkcija;
- ♦ išryškėja būdingas fizinio ir funkcinio pajėgumo sumažėjimas, skeleto raumenų masės ir jėgos nykimas, nepakankama raumenų oksigenacija, fizinio krūvio netoleravimas;
- ♦ genetinis polinkis siejamas su genomo variacija atsakinga už raumenų bei centrinės nervų sistemos veiklą ir reguliaciją bei su transmembraninių receptorių signalizacija, kuri dalyvauja raumenų ir viso organizmo energijos apykaitoje ir biologinių procesų reguliavime, tačiau kai kurių genomo žymenų asociacija dar turi būti patvirtinta papildomose tyrimuose su didesne tiriamųjų intimi;
- ♦ kompleksinė genomo profilio, DNR metilini mo, telomerų ilgio ir klinikinių fenotipų sąsajos analizė tarp senyvo amžiaus pacientų su sarkopenija ir/ar išsekimo sindromu parodė polinkį į fiziologinių sistemų išsekimą, sumažėjusią raumenų masę, jėgą ir funkcinę būklę, o DNR metilinimo profilis buvo reikšmingai susijęs su telomerų ilgiu, fiziologiniais parametrais ir su gyvenimo būdo ypatumais;
- ♦ nepaisant amžiaus ir lyties, pacientai su trumpesnėmis telomeromis turi didesnę riziką sirgti sarkopenija ir/arba išsekimo sindromu;
- ♦ sumažėjęs telomerų ilgis reikšmingai susijęs su žemesniu fizinio aktyvumo lygiu ir su mažesne raumenų mase esant sarkopenijai ir/arba išsekimo sindromui;
- ♦ nors santykinis telomerų ilgis, kaip atskiras rodiklis, nėra reikšmingas prognozuojant sarkopenijos ar senatvinio išsekimo sindromo atsiradimą, tačiau kompleksiskai jis rodo sąsają su fenotipu ir koreliaciją su epigenomu (tarp 49 genomo metilintų sričių).

Plataus masto viso genomo asociacijos tyrimo rezultatai

Plataus masto viso genomo asociacijos tyrimo (GWAS, Genome-Wide Association Studies) metu galima nustatyti genetinius rizikos veiksnius (vieno nukleotido polimorfizmus) siejamus su specifiniais žmogaus bruožais, ligomis ar būklėmis įskaitant sarkopenijos ir/arba išsekimo sindromo fenotipą. GWAS metu analizuojami atvejo (tiriamųjų su dominančių požymiu, kaip tirtų geriatrinių sindromu) ir kontrolės (asmenys be požymių) genomo variacija, siekiant identifikuoti reikšmingas asociacijas tarp VNP ir fenotipo. GWAS analizėje VNP laikomi reikšmingai susijusiais su fenotipu, kurių p reikšmė yra mažesnė nei 5×10^{-8} , ir „galimai asocijuoti“ (angl., *suggestively associated*), kai p reikšmė mažesnė už 1×10^{-5} . Tokie variantai rodo galimą, tačiau dar nepakankamai stiprų ryšį su

fenotipu ir paprastai reikalauja papildomų tyrimų (pvz., taikant geno kandidato atvejo-kontrolės asociacijos analizę), kad būtų patvirtintas jų reikšmingumas.

GEPITEL projekto metu atlikta GWAS analizė 192 senyvo amžiaus ($82,2 \pm 7,6$ metų amžiaus) tiriamiesiems su (atvejo) ir be sarkopenijos ir/ar senatvinio išsekimo sindromo (kontrolė). GWAS parodė 10 svarbiausių VNP (su pataisyta p reikšme, angl. *p.adjust*) siejamų su sarkopenijos ir išsekimo sindromu, tačiau reikšmingumas nesiekė 1×10^{-5} (5 lentelė). Tikėtina, kad mažas asociacijos reikšmingumas yra susijęs su maža tiriamųjų imtimi.

5 lentelė. Genomo variantų asociacija su sarkopenija ir senatvinio išsekimo sindromo statusu.

Chromosoma	VNP	UNADJ	GC	BONF	HOLM	SIDAK_SS	SIDAK_SD	FDR_BH	FDR_BY
10	rs1469808	1.04E-05	1.27E-05	1	1	0.8377	0.8377	0.7811	1
19	rs10404976	1.64E-05	1.97E-05	1	1	0.9422	0.9422	0.7811	1
10	rs34714034	1.65E-05	1.99E-05	1	1	0.9434	0.9434	0.7811	1
1	rs10900325	2.73E-05	3.25E-05	1	1	0.9913	0.9913	0.7811	1
21	rs7279061	3.00E-05	3.58E-05	1	1	0.9946	0.9946	0.7811	1
5	rs17076915	3.70E-05	4.39E-05	1	1	0.9984	0.9984	0.7811	1
3	rs783511	3.74E-05	4.44E-05	1	1	0.9985	0.9985	0.7811	1
4	rs4862562	3.79E-05	4.50E-05	1	1	0.9986	0.9986	0.7811	1
3	rs6769702	4.24E-05	5.02E-05	1	1	0.9994	0.9994	0.7811	1
2	rs10208260	6.64E-05	7.80E-05	1	1	1	1	0.7811	1

GC – Genominės kontrolės koreguota reikšmingumo vertė; BONF – Bonferroni koreguota reikšmingumo vertė, HOLM – Holm pakopinio mažinimo koreguota reikšmingumo vertė; SIDAK_SS – Sidako vieno žingsnio pakoreguota reikšmingumo vertė, SIDAK_SD – Sidako pakopinio mažinimo pakoreguota reikšmingumo vertė; FDR_BH – Benjamini ir Hochberg pakopinė FDR kontrolė; FDR_BY – Benjamini ir Yekutieli pakopinė FDR kontrolė.

Atlikta GWAS analizė vertinant VNP sąsają su fenotipiniais rodikliais, tokiais, kaip tiriamųjų eisenos greitis, raumenų jėga (plaštakų suspaudimo jėga) ir raumenų masė. Vertinant VNP sąsają su eisenos greičiu ir raumenų mase reikšmingai asocijuotų VNP nebuvo nustatyta, tačiau 4 VNP (rs60001950, rs935630, rs56879175, rs10903128) buvo galimai asocijuoti su eisenos greičiu ir 5 VNP (rs11731003, rs59939477, rs4876847, rs2473666, rs4456805) su raumenų mase. Daugelis nustatytų VNP literatūroje neaprašyti, tačiau su eisenos greičiu galimai susiję VNP rs935630 yra nekoduojančios RNR geno *LOC105373390* neapibūdintas introno variantas; su raumenų mase susiję: rs11731003 yra *SORCS2* (angl., *Sortilin Related VPS10 Domain Containing Receptor 2*) geno variantas, kuris dalyvauja

centrinės nervų sistemos neuropeptidų receptorių aktyvume; rs59939477 VNP geno *THSD7B* (angl., *Thrombospondin Type 1 Domain Containing 7B*), dalyvaujantys aktino citoskeleto reorganizavime; rs4876847 *SAMD12* (angl., *Sterile Alpha Motif Domain Containing 12*) geno – dalyvauja transmembraninių receptorių baltymų tirozino kinazės signalizacijos kelyje (6 lentelė).

6 lentelė. GWAS rezultatai: VNP sąsaja su fenotipu

CHR	VNP	UNADJ	GC	BONF	HOLM	SIDAK_SS	SIDAK_SD	FDR_BH	FDR_BY
VNP asociacija su eisenos greičiu									
3	rs60001950*	3.10E-06	3.37E-06	0.5395	0.5395	0.4169	0.4169	0.3155	1
2	rs935630*	5.48E-06	5.94E-06	0.9547	0.9547	0.6151	0.6151	0.3155	1
5	rs56879175*	7.19E-06	7.78E-06	1	1	0.714	0.714	0.3155	1
1	rs10903128*	7.25E-06	7.84E-06	1	1	0.7169	0.7169	0.3155	1
8	rs71530220	1.37E-05	1.47E-05	1	1	0.9073	0.9073	0.4757	1
16	rs6498643	2.21E-05	2.37E-05	1	1	0.9785	0.9785	0.6402	1
1	rs12034358	3.28E-05	3.51E-05	1	1	0.9967	0.9967	0.7969	1
4	rs11933661	4.25E-05	4.54E-05	1	1	0.9994	0.9994	0.7969	1
2	rs12694884	6.10E-05	6.50E-05	1	1	1	1	0.7969	1
6	rs6927621	6.76E-05	7.20E-05	1	1	1	1	0.7969	1
VNP asociacija su raumenų mase									
4	rs11731003*	4.26E-06	4.93E-06	0.7416	0.7416	0.5236	0.5236	0.2583	1
2	rs59939477*	4.46E-06	5.15E-06	0.7754	0.7754	0.5395	0.5395	0.2583	1
8	rs4876847*	5.51E-06	6.36E-06	0.9599	0.9599	0.6171	0.6171	0.2583	1
6	rs2473666*	6.06E-06	6.98E-06	1	1	0.6515	0.6515	0.2583	1
3	rs4456805*	7.56E-06	8.69E-06	1	1	0.7316	0.7316	0.2583	1
4	rs4695338	1.01E-05	1.16E-05	1	1	0.8281	0.8281	0.2583	1
16	rs34460715	1.04E-05	1.19E-05	1	1	0.836	0.836	0.2583	1
5	rs11741262	2.23E-05	2.53E-05	1	1	0.9794	0.9794	0.4645	1
2	rs181133	2.40E-05	2.72E-05	1	1	0.9847	0.9847	0.4645	1
6	rs6927621	6.76E-05	7.20E-05	1	1	1	1	0.7969	1
VNP asociacija su raumenų jėga									
6	rs75652203**	3.74E-11	5.41E-11	6.52E-06	6.52E-06	6.52E-06	6.52E-06	6.52E-06	8.24E-05
17	rs8066532*	9.00E-07	1.12E-06	0.1567	0.1567	0.1451	0.1451	0.06404	0.8097
10	rs17102732*	1.10E-06	1.37E-06	0.1921	0.1921	0.1748	0.1748	0.06404	0.8097

CHR	VNP	UNADJ	GC	BONF	HOLM	SIDAK_SS	SIDAK_SD	FDR_BH	FDR_BY
4	rs1485585*	2.72E-06	3.46E-06	0.4734	0.4734	0.3771	0.3771	0.08536	1
17	rs3744589*	2.83E-06	3.33E-06	0.493	0.493	0.3892	0.3892	0.08536	1
2	rs11126024*	2.94E-06	3.60E-06	0.5122	0.5122	0.4008	0.4008	0.08536	1
21	rs2850114*	5.33E-06	6.46E-06	0.9283	0.9283	0.6048	0.6048	0.1183	1
18	rs12970663*	5.44E-06	6.58E-06	0.9464	0.9464	0.6119	0.6119	0.1183	1
7	rs117683238*	6.40E-06	7.73E-06	1	1	0.6719	0.6719	0.1229	1
6	rs2326676*	7.06E-06	8.51E-06	1	1	0.7074	0.7074	0.1229	1

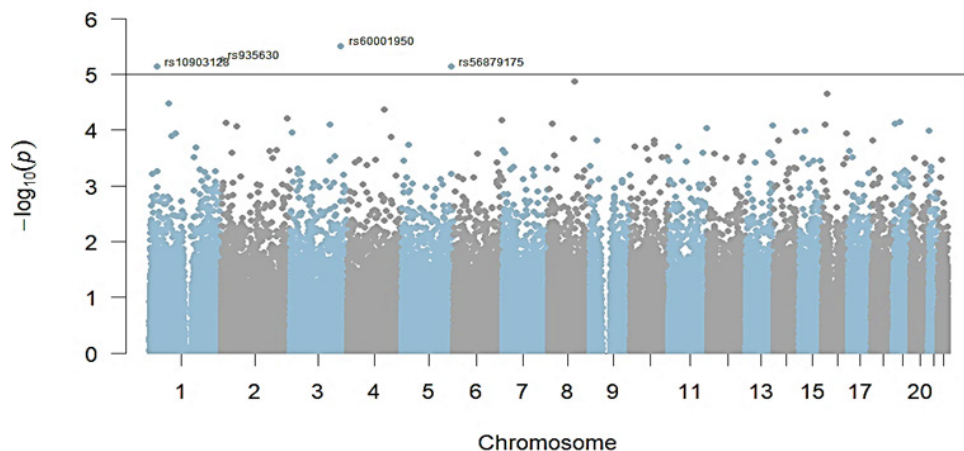
*galimai asocijuoti VNP ($p < 1 \times 10^{-5}$); ** reikšminga VNP asociacija su fenotipu ($p < 5 \times 10^{-8}$).

CHR – chromosoma; VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; GC - Genominės kontrolės koreguota reikšmingumo vertė; BONF – Bonferroni koreguota reikšmingumo vertė, HOLM – Holm pakopinio mažinimo koreguota reikšmingumo vertė; SIDAK_SS - Sidako vieno žingsnio pakoreguota reikšmingumo vertė, SIDAK_SD - Sidako pakopinio mažinimo pakoreguota reikšmingumo vertė; FDR_BH - Benjamini ir Hochberg pakopinė FDR kontrolė; FDR_BY – Benjamini ir Yekutieli pakopinė FDR kontrolė.

Vertinant VNP sąsaja su tiriamųjų raumenų jėga, nustatytas vienas reikšmingai asocijuotas VNP – rs75652203, kuris yra išsidėstęs 6 chromosomos reguliacinėje srityje ENSR00001362624. Kiti 3-je lentelėje pateikti VNP yra galimai asocijuoti su raumenų jėga, iš jų rs3744589 yra ACACA (angl., *Acetyl-CoA Carboxylase Alpha*) gene, kuris koduoja svarbų riebalų rūgščių biosintezės fermentą acetilkarboksilazę; rs2850114 yra CLDN14 (angl., *Claudin 14*) gene, kuris koduoja membraninį baltymą, dalyvaujantį trapijaujamame jonų pernešime; rs1485585 yra ANK2 (angl., *Ankyrin-2*) gene, kuris koduoja citoskeleto baltymą, rs117683238 – PHF14 (angl., *PHD Finger Protein 14*) gene, kuris koduoja baltymą, dalyvaujantį chromatinio pertvarkyme ir transkripcijos reguliavime.

VNP asociacijos su fenotipu analizės rezultatus galima atvaizduoti *Manhattan* grafike naudojant R programinio įrankio paketą. *Manhattan* grafiko pavyzdys (VNP asociacijos su eisenos greičiu) patektas 4 paveiksle.

Siekiant patvirtinti rs75652203 VNP asociacijos reikšmingumą su raumenų jėga, atlikta permutacijų (tvarkingų duomenų išdėstymo) analizė su 10000 permutacijų. Šios analizės rezultatai pateikti 4 lentelėje. Nustatyta, kad varianto rs75652203 taškinė empirinė p vertės reikšmė yra mažesnė už 0,05, todėl galima teigti, kad rs75652203 genomo variantas yra reikšmingai susijęs su senyvo amžiaus asmenų raumenų jėga (7 lentelė).



4 pav. VNP asociacija su tiriamųjų eisenos greičiu atvaizduota Manhattan grafiku

7 lentelė. Dešimties labiausiai asocijuotų VNP permutacijų analizės rezultatai

Chromosoma	VNP	EMP1	EMP2
6	rs75652203*	1.00E-04	0.0014
17	rs8066532	1.00E-04	0.6288
10	rs17102732	1.00E-04	0.6728
17	rs3744589	1.00E-04	0.8786
4	rs1485585	1.00E-04	0.8826
2	rs11126024	1.00E-04	0.895
21	rs2850114	1.00E-04	0.9667
18	rs12970663	1.00E-04	0.9694
7	rs117683238	0.0004	0.9796
6	rs2326676	1.00E-04	0.9849

CHR – chromosoma; EMP1 – empirinė p reikšmė; EMP2 - taškinė empirinė p vertė



Apibendrinant galima teigti, kad taikant GWAS ir vertinant senyvo amžiaus tiriamųjų genomo architektūrą bei genetinių variantų asociaciją su fenotipu, nustatyta statistiškai reikšminga asociacija tarp reguliacinės genomo srities rs75652203 ir raumenų (plaštakos) jėgos, taip pat nustatyti galimai asocijuoti 4 genomo variantai su eisenos greičiu, 5 – su raumenų mase ir 10 – su jėga.

Plataus masto viso metilomo asociacijos tyrimo rezultatai

DNR metilinimas yra pagrindinis DNR modifikacijos mechanizmas, kuris gali keisti genų raišką, veikiant aplinkai ir/arba sergant tam tikromis lygomis, ypač su senėjimu susijusiomis ligomis. Citozino metilinimas genų promotorių CpG salelėse yra pagrindinė transkripcijos slopinimo priežastis, kuri gali keisti genų raišką ir biologinius procesus žmogaus organizme.

GEPITEL projekto metu buvo atlikta senyvo amžiaus asmenų su sarkopenija ir išsekimo sindromu (62 tiriamieji, t.y. 43 moterys $85,5 \pm 6,1$ metų ir 19 vyrų $82,9 \pm 8,8$ metų) plataus masto viso genomo metilinimo analizė, taip pat buvo siekiama nustatyti asociaciją tarp metilintų genomo sričių ir tiriamųjų fenotipo [33]. Viešai prieinamose eksperimentinių duomenų bazėse kitų tyrimų, atitinkančių GEPITEL tyrimo sąlygas ir turinčių kontrolinių asmenų grupę, skaičius ir tyrimų esmė nebuvo pakankami kad šiame etape suformuoti kontrolinę grupę naudojant viešos prieigos eksperimentinius metilomo duomenų rinkinius.

Atlikome diferencinę metilinimo lygmens sąsają su tiriamųjų amžiumi, lytimi ir santykinio telomerų ilgiu analizę ir identifikavome skirtingai metilintus regionus (DMR, angl., differentially methylated regions) pažymėdami CpG zondus (su R paketo DMRcate v3.2.1 funkcijomis). Pažymėti CpG zondai turintys klaidingo aptikimo tikėtinumą (angl. False discovery rate FDR) p reikšmę mažesnę nei 0,01 nustato genomines metilinimo sričių reikšmingai susijusių su leukocitų telomerų ilgiu koordinates. UCSC Genome naršyklėje (UCSC, University of California Santa Cruz, <https://genome.ucsc.edu/>) buvo išanalizuota šių, su telomerų ilgiu susijusių metilinimo sričių genomo aplinka, bei jų asociacija su tiriamųjų fenotipu, pasitelkiant viso genomo asociacijų registro duomenis (NHGRI-EBI GWAS <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>).

Tyrimo rezultatai parodė, kad DNR metilinimo lygis nėra susijęs su amžiumi ar lytimi. Tačiau metilintos CpG salelės reikšmingai susiję su santykinio telomerų ilgiu ir apima 49 DMR (esant 95% FDR patikimumo lygiui $<0,05$), iš jų galima išskirti genomo vietas kur išsidėsto pagrindiniai 7 genai:

1. *FPGT* genas esantis 1 chromosomos 1p31.1 srityje ir koduojantis fermentą fukozės-1-fosfat guanililtransferazę (angl. Fucose-1-Phosphate Guanylyltransferase);
2. *LRR1Q3* genas iš 1p31.1 srities (Leucino turtingi pakartojimai ir IQ motyvas 3, angl., Leucine-rich repeats and IQ motif containing 3);
3. *MPL* genas iš 1p34.2 srities (Mieloproliferacinės leukemijos / trombopoetino receptoriaus genas, angl., Myeloproliferative Leukemia Protein / Thrombopoietin Receptor);

4. *TNFSF9* genas esantis 19 chromosomos (19p13.3) srityje (Naviko nekrozės faktoriaus ligando superšeimos narys 9, angl., TNF Superfamily Member 9);
5. *ZDHHC14* genas esantis 6 chromosomos (6q25.3) srityje (Cinko pirštelio DHHC tipo palmitoiltransferazė 14, angl., Zinc Finger DHHC-Type Palmitoyltransferase 14);
6. *LINC00240* genas koduojantis RNR iš 6p22.2 srities (Ilga tarpgeninė baltymus koduojanti RNR 240, angl., Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 240);
7. *SH3RF3* genas esantis 2 chromosomos 2q13 srityje – (SH3 domenas su žiediniu pirštu 3, angl., SH3 Domain Containing Ring Finger 3).

Šių genetinių sričių metilintų CpG salelių artimoje genomo aplinkoje yra genų raišką reguliuojantys sekų elementai anotuoti funkcinį genomo elementų ENCODE projekto enciklopedijoje (<https://www.encodeproject.org/>), kaip *CELF2-AS1* reguliacinis elementas esantis 10 chromosomos 10p14 srityje (angl., CELF2 Antisense RNA 1). Greta yra ir didelio intensyvumo *H3K27Ac* histonų modifikacijos žymenys. Šie elementai rodo jog tose genomo srityse gali būti padidėjęs transkripcijos aktyvumas ir genų raiška. Padidėjęs metilinimo lygmuo asocijuotų genų srityse slopina tų genų raišką. Metilinimas gali blokuoti transkripcijos faktorių prisijungimą prie DNR arba pakeisti chromatiną struktūrą, todėl genai tampa mažiau prieinami transkripcijai. Tai reiškia, kad padidėjęs metilinimo lygmuo gali sumažinti arba visiškai užblokuoti genų raišką. Tuo tarpu sumažėjęs meti-

8 lentelė. Pakitusių metilinimo sričių charakteristika.

Genas	CpG salelės genominės koordinatės	Metilinimo lygmuo	Asociacija su santykiu telomerų ilgiu
<i>MPL</i>	chr1:43348635-43349606	Padidintas (hipermetilinimas)	Neigiama
<i>FPGT</i>	chr1:74198143-74198351	Sumažėjęs (hipometilinimas)	Teigiama
<i>SH3RF3</i>	chr2:109128130-109130377	Sumažėjęs (hipometilinimas)	Teigiama
<i>LINC00240</i>	chr6:27019820-27020295	Sumažėjęs (hipometilinimas)	Teigiama
<i>ZDHHC14</i>	chr6:157592781-157593224	Padidintas (hipermetilinimas)	Neigiama
<i>CELF2-AS1</i>	chr10:11344304-11344876	Padidintas (hipermetilinimas)	Neigiama
<i>TNFSF9</i>	chr19:6534749-6535068	Padidintas (hipermetilinimas)	Neigiama

linimo lygmuo gali skatinti genų raišką. Tokiu būdu metilinimo lygmens pokyčiai per genų raiškos reguliavimą įtakoja fenotipą. Nustatyti metilinimo lygmens pokyčiai genų srityse sąsajoje su santykinio telomerų ilgio dinamika sarkopenijos ir senatvinio išsekimo pacientų grupėje atskleidžia galimą tų genų įtaką ir dalyvavimą sarkopenijos ir senatvinio išsekimo patogenezės procesuose. Pažymėtina tai, kad šioje tiriamųjų grupėje leukocitų telomerų ilgis buvo ženkliai mažesnis negu kontrolinėje asmenų grupėje. Pakitusių metilinimo sričių charakteristikos yra pateiktos 8 lentelėje.

Metilinimo srities asociacijos su leukocitų telomerų ilgiu pobūdis:

- ♦ *MPL*, *ZDHHC14*, *CELF2-AS1* ir *TNFSF9* genetinių sričių neigiama asociacija su telomerų ilgiu, t.y. aukštas metilinimo lygmuo (hipermetilinimas) koreliuoja su telomerų trumpėjimu;
- ♦ *FPGT*, *SH3RF3* ir *LINC00240* teigiama asociacija reiškia – mažas metilinimo lygmuo (hipometilinimas) koreliuoja su telomerų trumpėjimu.

Metilinimo lygmens pokyčiai dažnai atsiranda kaip organizmo atsakas į išorinius veiksnius ir gyvenimo būdą. Sarkopenija ir senatvinio išsekimo sergančių grupėje rasta reikšminga sąsaja tarp metilintų CpG salelių ir santykinio telomerų ilgio parodo tuos genus, kurie galimai įtakoja fenotipus stebimus tiriamųjų grupėje. Tačiau apibūdinti nustatytų genų dalyvavimą sarkopenijos ir senatvinio išsekimo vystymosi biologiniuose keliuose ir mechanizmuose šiuo metu dar nėra pakankamos informacijos. Pažymėtina, kad *LINC00240* hipometilinimas buvo reikšmingai susijęs su tiriamųjų fenotipu ir leukocitų santykinio telomerų trumpėjimu. Atlikus bioinformacinę genominių duomenų bazių analizę (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/> viso genomo asociacijų tyrimų duomenimis) paaiš-

9 lentelė. Specifinės asociacijos tarp nustatytų genų (su skirtingai metilintu profiliu) ir fenotipų pagal viso genomo asociacijų registro duomenis (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>).

Genas	Susiję fenotipai
<i>MPL</i>	Gebėjimas mokytis, smegenų morfologija, trombocitų skaičius
<i>FPGT</i>	KMI, kūno svoris, rūkymas, nutukimas, gebėjimas mokytis, išsilavinimas
<i>SH3RF3</i>	Pažintinė veikla, smegenų morfologija, kaulų mineralų tankis, ūgis, KMI
<i>LNC00240</i>	KMI, klubų apimtis, raumenų masė, intelektas, polinkis į neurotiškumą, pasitenkinimas gyvenimu, geležies lygis, depresijos simptomai, leukocitų telomerų ilgis, išeminė širdies liga, alkoholio vartojimas, rūkymas
<i>ZDHHC14</i>	Rūkymas, gebėjimas mokytis, išsilavinimas, kaulų mineralų tankis, geležies lygis, depresijos simptomai, alkoholio vartojimas, kūno riebalų masė
<i>TNFSF9</i>	Medžiagų apykaita ir metabolitai, morfologinis veido pokytis (lūpos ir gomurio nesuaugimas)

kėjo, kad genai, kurių srityse buvo nustatytas sąryšis tarp metilinimo lygmens ir leukocitų telomerų ilgo, yra susiję su žmogaus gyvensena bei su kūno sudėties ir fiziologiniais parametrais. Nustatytų genų (su skirtingai metilintu profiliu) ir jų sąsaja su fenotipiniais rodikliais pateikti 9 lentelėje.

Galima teigti, kad egzistuoja abipusis ryšys tarp nustatytų skirtingai metilintų genotipinių sričių ir tiriamųjų su sarkopenija ir išsekimo sindromu fenotipo parametrais, kaip KMI, kūno riebalų ir raumenų masė, kaulų mineralinis tankis, rūkymas, alkoholio vartojimas, išsilavinimas, polinkis į depresiją.



Apibendrintai galima teigti, kad Lietuvos senyvo amžiaus asmenų su sarkopenija ir išsekimo sindromu DNR metilinimo profilis, fiziologiniai parametrai, telomerų ilgis ir gyvenimo būdo ypatumai yra reikšmingai susiję.

Leukocitų telomerų ilgio tyrimo rezultatai

Chromosomų galuose esančių telomerų ilgio trumpėjimas gali būti viena iš molekulinė priežasčių, lemiančių su amžiumi susijusių patologijų atsiradimo riziką. Todėl GEPITEL projekto metu buvo siekiama įvertinti senyvo amžiaus asmenų periferinio kraujo leukocitų STI ypatumus esant sarkopenijai ir išsekimo sindromui. Tyrime dalyvavo 197 asmenys (43 vyrai ir 153 moterys, amžiaus vidurkis $82,04 \pm 7,56$), iš jų 121 asmuo buvo su patvirtinta sarkopenijos ir/arba senatvinio išsekimo sindromo diagnoze (26 vyrai ir 95 moterys, amžiaus vidurkis $84,36 \pm 6,85$) ir 75 asmenys neturintys sarkopenijos ir/arba išsekimo sindromo (kontrolinė grupė, 17 vyrų ir 58 moterys, amžiaus vidurkis $78,28 \pm 7,20$).

Tirtos senyvo amžiaus asmenų grupės $STI_{vid.}$ buvo $0,41 \pm 0,24$. Statistiškai reikšmingas STI skirtumas tarp lyčių nenustatytas: moterų $STI_{vid.}$ $0,42 \pm 0,25$, vyrų $STI_{vid.}$ $0,38 \pm 0,20$. Nustatyta reikšminga neigiama koreliacija tarp STI ir tiriamųjų amžiaus tiek visoje imtyje, tiek atskirai pagal lytis ($r = -0,45$, $p < 0,001$). Sergančiųjų $STI_{vid.}$ ($0,30 \pm 0,15$) buvo reikšmingai mažesnis nei kontrolinės grupės asmenų ($0,48 \pm 0,26$; $p < 0,001$). Senyvo amžiaus tiriamieji, kurių STI mažesnis nei vidutinis, pasižymi didesniu šansu turėti sarkopeniją ir/arba išsekimo sindromą nei asmenys, kurių STI didesnis nei vidutinis ($OR = 4,51$; 95 % PI 2,22–9,18).

STI skirtumų analizėje tarp sergančiųjų ir kontrolinės grupės atlikta ANCOVA taikant trys modelius, koreguotus pagal tiriamųjų amžių ir lytį. Rezultatai parodė, kad STI yra trumpesnis esant sarkopenijai ir išsekimo sindromui ($F(1,192) = 12,498$, $p < 0,001$) lyginant su kontrole, taip pat esant tik sarkopenijai ($F(1,164) = 9,617$; $p = 0,002$) ir esant

tik išsekimo sindromui ($F(1,161) = 19,106$; $p < 0,001$). Kadangi tiriamųjų grupės nepasižymėjo homogeniškumu, todėl STI vidurkiai buvo koreguoti pagal tiriamųjų amžių ir lytį (10 lentelė).

10 lentelė. Santykinio telomerų ilgio vidutinės reikšmės sergančiųjų sarkopenija ir/arba senatviniu išsekimo sindromu ir kontrolinėje grupėje

	Santykinio telomerų ilgio vidurkis			
	Nekoreguotas (95 % PI)	p-reikšmė	Koreguotas 95 % PI)*	p-reikšmė
Sarkopenija ir senatvinio išsekimo sindromas (n=121)	0,345 (0,310–0,380)	0,002	0,360 (0,311–0,410)	0,051
Kontrolinė grupė (n=75)	0,469 (0,398–0,539)		0,435 (0,373–0,497)	
Sarkopenija (n=93)	0,347 (0,304–0,391)	0,004	0,368 (0,311–0,425)	0,126
Kontrolinė grupė (n=75)	0,469 (0,398–0,539)		0,434 (0,368–0,500)	
Senatvinio išsekimo sindromas (n=90)	0,308 (0,274–0,342)	$p < 0,001$	0,330 (0,275–0,385)	0,005
Kontrolinė grupė (n=75)	0,469 (0,398–0,539)		0,446 (0,384–0,509)	

* vidurkis koreguotas pagal tiriamųjų amžių ir lytį

Rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad tiek sarkopenija, tiek senatvinio išsekimo sindromas yra susiję su trumpesniu STI, tačiau reikšmingumas priklauso nuo koregavimo pagal amžių ir lytį. Didžiausias STI sutrumpėjimas stebimas ypač išsekimo sindromo grupėje.

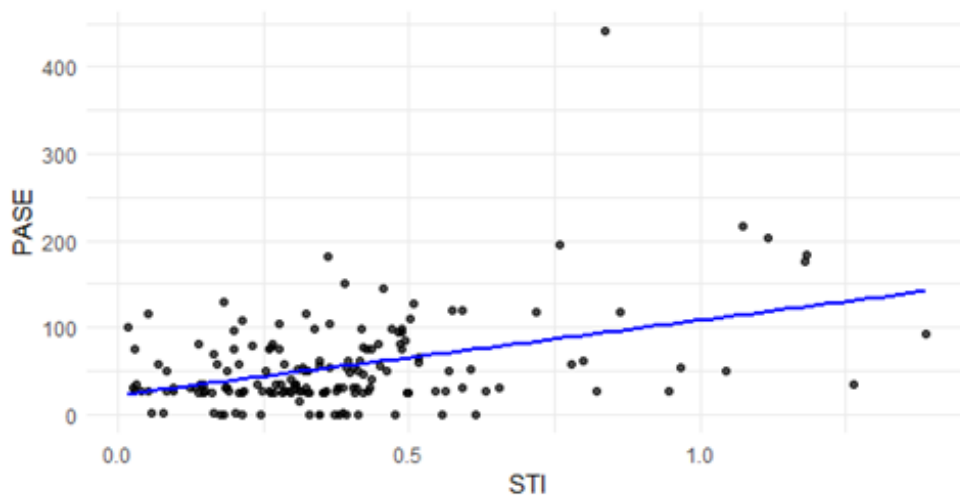
Pasitelkus logistinės regresijos modeliu, buvo siekta įvertinti, kaip sarkopenijos ir senatvinio išsekimo statusą prognozuoja šie kintamieji: STI, amžius, lytis ir jų sąveikos. Iš visų į modelį įtrauktų kintamųjų, tik vyresnis amžius buvo susijęs su didesne sarkopenijos arba senatvinio išsekimo tikimybe. Rezultatai rodo, kad STI nėra reikšmingas rodiklis sergamumo sarkopenija ar senatviniu išsekimu prognozei (11 lentelė).

11 lentelė. Sarkopenijos ir senatvinio išsekimo sindromo prognozė pagal santykinį telomerų ilgį, amžių, lytį ir šių kintamųjų sąveikas (STI:amžius, STI:lytis).

Sarkopenija				
	Koeficiento įvertis	Standartinė paklaida	Z-įvertis	p-reikšmė
Laisvasis narys	-9,744	3,768	-2,586	0,001 **
STI	2,403	7,897	0,304	0,761
Amžius	0,129	0,046	2,797	0,005 **
Lytis	-0,159	0,745	-0,214	0,831
STI:amžius	-0,038	0,098	-0,386	0,699
STI:lytis	-0,697	1,521	-0,459	0,646
Senatvinis išsekimas				
	Koeficiento įvertis	Standartinė paklaida	Z-įvertis	p-reikšmė
Laisvasis narys	-10,707	4,206	-2,546	0,011*
STI	5,665	10,344	0,548	0,584
Amžius	0,144	0,052	2,782	0,005 **
Lytis	0,172	0,827	0,208	0,835
STI:amžius	-0,087	0,127	-0,682	0,496
STI:lytis	-1,883	1,838	-1,024	0,306

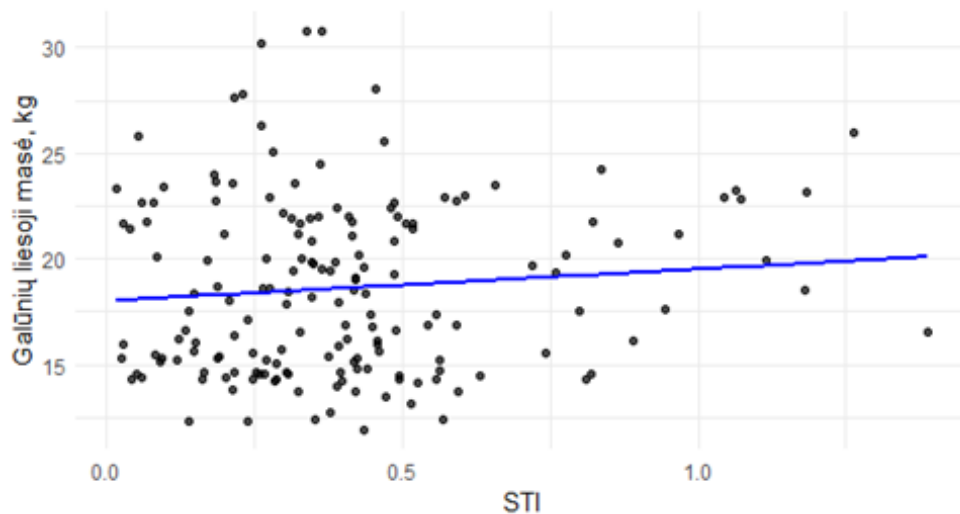
* žymi $p < 0,05$, ** žymi $p < 0,01$; logistinės regresijos modelio formulė: sarkopenija/išsekimo sindromas ~ STI + amžius + lytis + STI:amžius + STI:lytis

Santykinio telomerų ilgio asociacijų su fenotipu analizė. Fenotipinių rodiklių ir STI asociacija nagrinėta pasitelkiant daugialypius tiesinius regresijos modelius. Fenotipinių rodiklių priklausomybė nuo STI tirta į regresijos analizę įtraukiant amžių, lytį ir šių kintamųjų tarpusavio sąveikas (STI:amžius, STI:lytis). Rezultatai parodė, kad dauguma fenotipinių rodiklių, naudojamų senatvinio išsekimo sindromui įvertinimui, įskaitant nuovargį, kūno masės mažėjimą, eisenos greitį ir raumenų jėgą, neturėjo statistiškai reikšmingos sąsajos su STI. Tačiau pastebėta, kad senyvo amžiaus asmenų fizinio aktyvumo skalė (PASE) turėjo reikšmingą sąsają su STI ($p < 0,05$), atspindinčią telomerų ilgio ir fizinio aktyvumo teigiamą koreliaciją (5 pav.).



5 pav. Santykinio telomerų ilgio ir senyvo amžiaus asmenų fizinio aktyvumo skalės (PASE) sklaidos diagrama

Analizuojant sarkopenijos fenotipinius kriterijus (raumenų jėga, SRMI, eisenos greitis), nustatyta statistiškai reikšminga SRMI priklausomybė nuo STI ($p < 0,001$), pavaizduota 6 paveiksle.



6 pav. Santykinio telomerų ilgio ir skersaruožių raumenų masės indekso sklaidos diagrama

- ➡ *Apibendrinus galima teigti, kad STI neigiamai koreliuoja su tiriamųjų amžiumi. Tiriamieji su trumpesnėmis telomeromis turi daugiau nei keturis kartus didesnę tikimybę sirgti sarkopenija ir/arba išsekimo sindromu. Nepaisant amžiaus ir lyties, sumažėjęs telomerų ilgis koreliuoja su sarkopenija ir senatviniu išsekimo sindromu. Be to, senyvo amžiaus tiriamųjų sumažėjęs telomerų ilgis reikšmingai susijęs su žemesniu fizinio aktyvumo lygiu esant išsekimo sindromui ir su mažesne raumenų mase esant sarkopenijai. Nors STI, kaip atskiras rodiklis, nėra reikšmingas prognozuojant sarkopenijos ar senatvinį išsekimą, tačiau kompleksiškai jis rodo sąsają su fenotipu ir koreliaciją su epigenomu (tarp 49 genomo metilintų sričių).*

V. SARKOPENIJOS IR IŠSEKIMO SINDROMO PREVENCIJA

Sarkopenijos ir senatvinio išsekimo sindromo prevencija bei profilaktika yra svarbi sveikatos palaikymo sritis, siekiant išlaikyti senyvo amžiaus žmonių gyvenimo kokybę ir savarankiškumą. Yra žinoma keletas pagrindinių prevencijos strategijų:

Fizinis aktyvumas. Šiuo metu yra daugybė įrodymų, patvirtinančių fizinių pratimų naudą sveikatai bei siekiui išsaugoti senyvo amžiaus žmonių funkcinių rezervą, kartu tai veikia kaip apsauginis veiksnys ir terapinė priemonė nuo nerimo, depresijos ir nemigos. Reguliarūs jėgos pratimai padeda išlaikyti raumenų masę ir jėgą, o aerobiniai pratimai gerina raumenų kraujotaką, širdies ir kraujagyslių sistemą, fizinį pajėgumą ir bendrą sveikatą. Pusiausvyros, koordinacijos ir jėgos pratimai padeda stiprinti raumenis ir mažina griuvimų riziką bei prisideda prie traumų prevencijos. Yra rekomenduojama, kad per savaitę būtų atliekama nuo 150 iki 300 min vidutinio intensyvumo (pvz.: vaikščiojimas, važiavimas dviračiu, plaukimas) aerobinio fizinio aktyvumo arba ne mažiau nei 75-150 min. didelio intensyvumo (pvz.: bėgimas, lipimas laiptais) aerobinio fizinio aktyvumo arba lygiavertis vidutinio ir didelio intensyvumo aktyvumo derinys per visą savaitę. Taip pat rekomenduojama mažiausiai du kartus per savaitę atlikti jėgos arba pasipriešinimo pratimus ir daugiau nei 3 kartus per savaitę atlikti koordinaciją ir pusiausvyrą lavinančius pratimus. Molekuliniame lygyje fizinis aktyvumas įtakoja miokino išsiskyrimą, kurie užtikrina viso organizmo homeostazę, metabolizmą ir sveikatą. Taip pat fiziniai pratimai yra svarbūs palaikyti telomerų ilgį ir užtikrinti teigiamas epigenetines modifikacijas skatinant tam tikrų genų (kaip miokinus koduojančių genų, pvz., *IL-6*, *BDNF*, irizino ir kt.) raišką raumenyse.

Subalansuota mityba. Pakankamas baltymų kiekis mityboje padeda išlaikyti raumenų masę ir yra būtinas raumenų atstatymui bei palaikymui. Per dieną rekomenduojama suvalgyti 1-1,2 g/kg baltymų. Vitaminai ir mikroelementai, tokie kaip kalcis, magnis, vitaminas D, omega-3 riebalų rūgštys padeda palaikyti ne tik kaulų-raumenų sistemos funkcionalumą bet ir bendrąją sveikatą.

Hormonų pusiausvyra. Hormonų terapija gali būti taikoma tam tikrais atvejais, tikslu kompensuoti su amžiumi susijusius hormonų pokyčius.

Medicininė priežiūra. Reguliarūs sveikatos patikrinimai padeda anksti nustatyti ir spręsti problemas, susijusias su raumenų nykimu.

Socialinė veikla. Dalyvavimas bendruomenės veiklose ir socialinė sąveika mažina izoliaciją ir depresijos riziką, kurios gali prisidėti prie išsekimo sindromo.

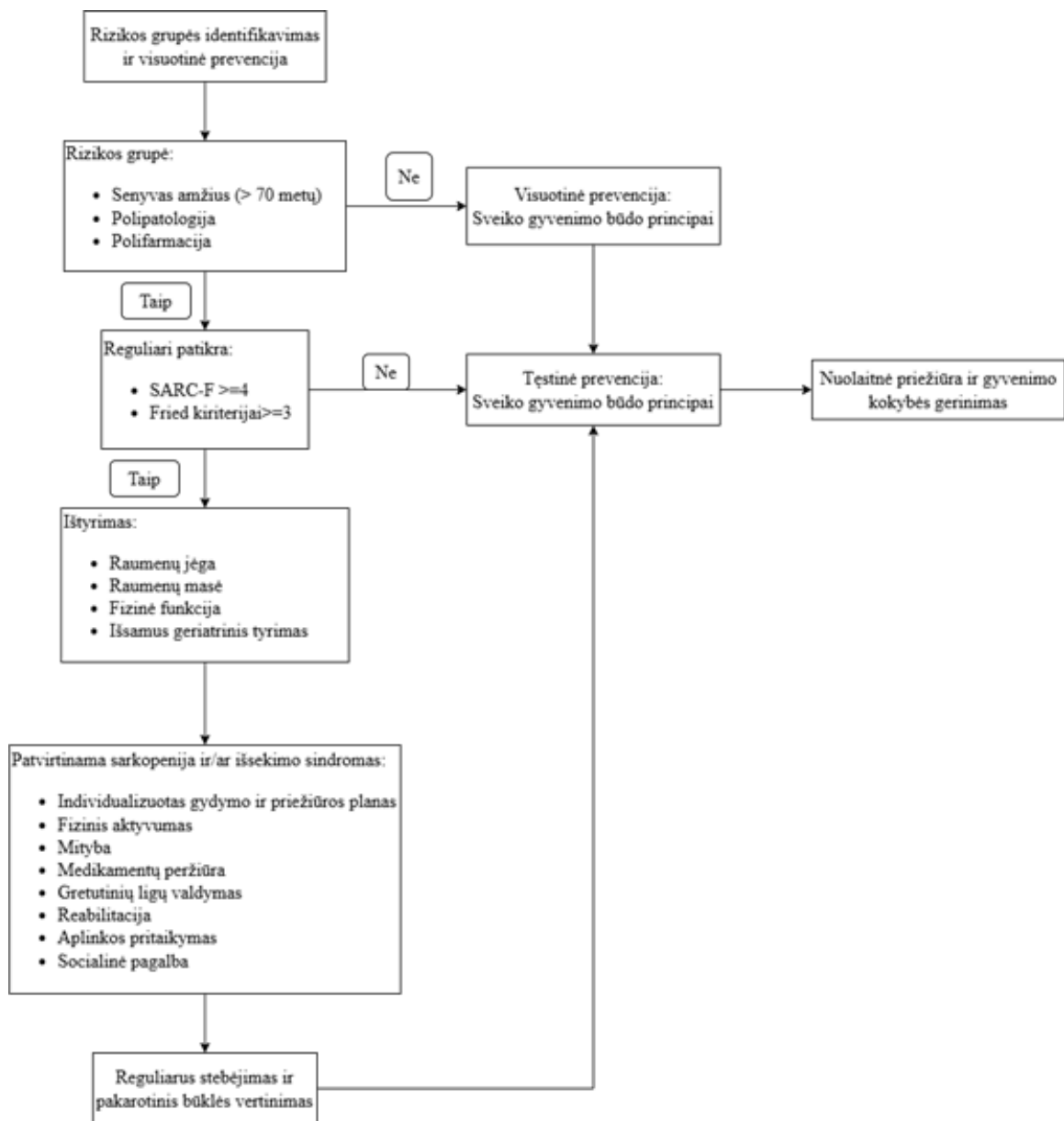
Kai kurie rizikos veiksniai gali būti modifikuojami, t.y. juos galima pakeisti taikant konkrečias intervencijas, pvz., fizinį aktyvumą. Siekiant pagerinti senyvo amžiaus asme-

nų funkcinę būklę, itin reikšminga yra daugiadisciplininė rehabilitacija, orientuota į asmenų mobilumo ir savarankiškumo kasdienėse veiklose didinimą bei griuvimų rizikos mažinimą. Svarbios individualios fizinių pratimų programos ir tinkama mityba. Esant sumažėjusiai kūno masei, skiriamos gydytojo dietologo konsultacijos, o esant padidėjusiam nuovargio lygiui, asmenį konsultuoja gydytojas psichiatras arba medicinos psichologas. Konsultacijų metu aptiriamos galimybės, skatinančios šių asmenų socialinį aktyvumą. Sumažėjusio energijos sunaudojimo bei padidėjusio nuovargio problema sprendžiama skiriant kognityvinę elgesio terapiją, akcentuojamas įsitraukimo į įvairias veiklas skatinimas. Esant poreikiui, asmuo nukreipiamas pas kitus daugiadisciplininės rehabilitacijos komandos narius, pvz., fizinės medicinos ir rehabilitacijos gydytoją, kineziterapeutą, ergoterapeutą.

VI. SARKOPENIJOS IR SENATVINIO IŠSEKIMO SINDROMO ANKSTYVOJO VERTINIMO MODELIS

Šiuolaikiniai tyrimai rodo, kad genomo ir epigenomo biožymenys, kartu su fenotipo vertinimo rodikliais, gali būti naudojami kaip nepriklausomi kintamieji kuriant sarkopenijos ir senatvinio išsekimo sindromo predikcinius vertinimo modelius. Šiose metodinėse rekomendacijose pateikiamas sarkopenijos ir senatvinio išsekimo sindromo klinikinis – predikcinis – profilaktinis vertinimo modelis 70 metų ir vyresnio amžiaus žmonėms bei išplėstinis ankstyvojo vertinimo algoritmas 60 metų ir vyresnio amžiaus žmonėms, kuris pagrįstas klinikinių ir genetinių rizikos veiksnių vertinimu (žr. p. 56–57).

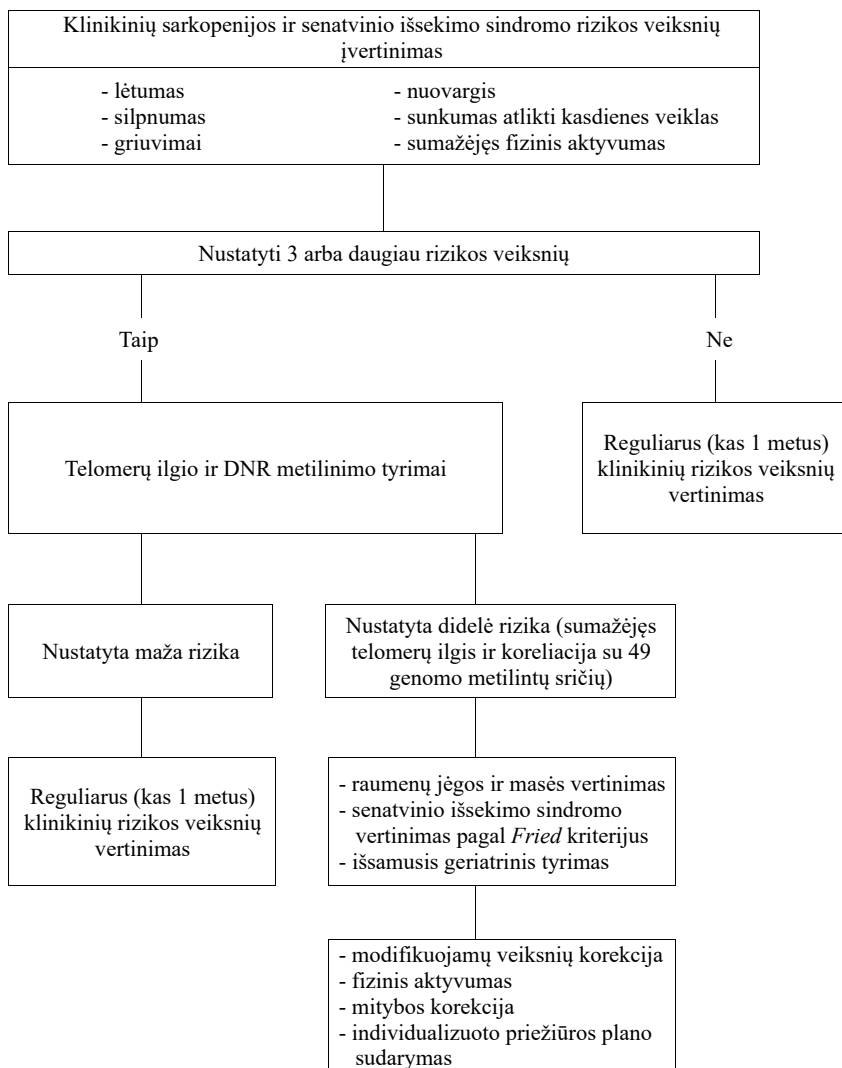
**SARKOPENIJOS IR SENATVINIO IŠSEKIMO SINDROMO
KLINIKINIS – PEDIKINIS - PROFILAKTINIS VERTINIMO MODELIS**
70 metų ir vyresnio amžiaus žmonėms



SARC-F – sarkopenijos atrankos klausimynas (ang., *Strength, Ambulation, Rising from a chair, Stair climbing and history of Falling*)

SARKOPENIJOS IR SENATVINIO IŠSEKIMO SINDROMO ANKSTYVOJO VERTINIMO ALGORITMAS

65 metų ir vyresnio amžiaus žmonėms



Literatūra

1. Dodds RM, Syddall HE, Cooper R, Kuh D, Cooper C, Sayer AA. Global variation in grip strength: a systematic review and meta-analysis of normative data. *Age and Ageing*. 2016 Mar 1;45(2):209–16.
2. Bauer JM, Sieber CC. Sarcopenia and frailty: A clinician's controversial point of view. *Experimental Gerontology*. 2008 Jul 1;43(7):674–8.
3. Picca A, Coelho-Junior HJ, Calvani R, Marzetti E, Vetrano DL. Biomarkers shared by frailty and sarcopenia in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews*. 2022 Jan 1;73:101530.
4. Ginevičienė V, Pranckevičienė E, Kilaitė J, Mastavičiūtė A, Dadelienė R, Jamontaitė IE, et al. Bibliometric and scientometric analysis on biomarkers and molecular mechanisms for physical frailty and sarcopenia. *Frontiers in Medicine* [Internet]. 2024;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2024.1326764>
5. Orentaitė D, Mastavičiūtė A, Ginevičienė V, Kilaitė J, Dadelienė R, Jamontaitė IE, et al. The associations of depressive symptoms, physical activity and activities of daily living in community-dwelling older adults. *PhysAgeNet & EGRAPA conference 2024 “Evidence based physical activity in old age”* [Internet]. April 18-19, Kaunas, Lithuania; Available from: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpglclefindmkaj/https://indico.uni-muenster.de/event/2277/attachments/1413/3217/Book%20of%20Abstracts_PhysAgeNet%20and%20EGRAPA%20Conference.pdf
6. Dadelienė R, Jamontaitė IE, Ginevičienė V, Mastavičiūtė A, Pranckevičienė E, Kilaitė J, et al. Relationship between physiological characteristics and cumulative incidence of falls in overweight older women (WCO-IOF-ESCEO 2024). *Aging Clinical and Experimental Research*. 2024 Aug 20;36(1):174.
7. Kilaitė J, Ginevičienė V, Mastavičiūtė A, Dadelienė R, Jamontaitė IE, Alekna V, et al. Lower limb strength association with increased risk of frailty and falls in older adults (WCO-IOF-ESCEO 2024). *Aging Clinical and Experimental Research*. 2024 Aug 20;36(1):174.
8. Danilova J, Ginevičienė V, Kilaitė J, Dadelienė R, Jamontaitė IE, Mastavičiūtė A, et al. Association between frailty status and risk of falls in community-dwelling older women. *PhysAgeNet & EGRAPA conference 2024 “Evidence based physical activity in old age”* [Internet]. 2024 Apr 18; Available from: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpglclefindmkaj/https://indico.uni-muenster.de/event/2277/attachments/1413/3217/Book%20of%20Abstracts_PhysAgeNet%20and%20EGRAPA%20Conference.pdf
9. Kilaitė J, Ginevičienė V, Mastavičiūtė A, Dadelienė R, Jamontaitė IE, Pranckevičienė E, et al. Association of physical performance with hypertension and frailty in older adults.

- PhysAgeNet & EGRAPA conference 2024 “Evidence based physical activity in old age” [Internet]. 2024 Apr 18; Available from: https://indico.uni-muenster.de/event/2277/attachments/1413/3217/Book%20of%20Abstracts_PhysAgeNet%20and%20EGRAPA%20Conference.pdf
10. Dadelienė R, Kilaitė J, Ginevičienė V, Jamontaitė IE, Mastavičiūtė A, Pranckevičienė E, et al. Muscle oxygenation characteristics of healthy and sarcopenic frail elderly people [Accepted poster]. WCO-IOF-ESCEO 2025 Rome. 2025 Apr 9;
 11. Jones G, Trajanoska K, Santanasto AJ, Stringa N, Kuo CL, Atkins JL, et al. Genome-wide meta-analysis of muscle weakness identifies 15 susceptibility loci in older men and women. *Nature Communications*. 2021 Jan 28;12(1):654.
 12. Shafiee G, Asgari Y, Soltani A, Larijani B, Heshmat R. Identification of candidate genes and proteins in aging skeletal muscle (sarcopenia) using gene expression and structural analysis. *PeerJ*. 2018;6(e5239).
 13. Sathyan S, Verghese J. Genetics of frailty: A longevity perspective. *Translational Research*. 2020 Jul 1;221:83–96.
 14. Voisin S, Harvey NR, Haupt LM, Griffiths LR, Ashton KJ, Coffey VG, et al. An epigenetic clock for human skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2020 Aug 1;11(4):887–98.
 15. Wang D, Li C, Zhang X, Li Y, He J, Guo X. Leukocyte telomere length and sarcopenia-related traits: A bidirectional Mendelian randomization study. *PLoS ONE*. 2024;19(1):e0296063.
 16. Mekli K, Nazroo JY, Marshall AD, Kumari M, Pendleton N. Proinflammatory genotype is associated with the frailty phenotype in the English Longitudinal Study of Ageing. *Aging Clinical and Experimental Research*. 2016 Jun 1;28(3):413–21.
 17. Mekli K, Marshall A, Nazroo J, Vanhoutte B, Pendleton N. Genetic variant of Interleukin-18 gene is associated with the Frailty Index in the English Longitudinal Study of Ageing. *Age and Ageing*. 2015 Nov 1;44(6):938–42.
 18. Mourtzi N, Ntanasi E, Yannakoulia M, Kosmidis M, Anastasiou C, Dardiotis E, et al. Apolipoprotein ε4 allele is associated with frailty syndrome: results from the hellenic longitudinal investigation of ageing and diet study. *Age and Ageing*. 2019 Nov 1;48(6):917–21.
 19. Viña J, Tarazona-Santabalbina FJ, Pérez-Ros P, Martínez-Arnau FM, Borrás C, Olaso-Gonzalez G, et al. Biology of frailty: Modulation of ageing genes and its importance to prevent age-associated loss of function. *Molecular Aspects of Medicine*. 2016 Aug 1;50:88–108.
 20. Semenova EA, Pranckevičienė E, Bondareva EA, Gabdrakhmanova LJ, Ahmetov II. Identification and Characterization of Genomic Predictors of Sarcopenia and Sarcopenic Obesity Using UK Biobank Data. *Nutrients*. 2023;15(3).
 21. Cardoso AL, Fernandes A, Aguilar-Pimentel JA, de Angelis MH, Guedes JR, Brito MA,

- et al. Towards frailty biomarkers: Candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews*. 2018 Nov 1;47:214–77.
22. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda S, et al. Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Molecular Cell*. 2013 Jan 24;49(2):359–67.
23. Voisin S, Jacques M, Landen S, Harvey NR, Haupt LM, Griffiths LR, et al. Meta-analysis of genome-wide DNA methylation and integrative omics of age in human skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2021 Aug 1;12(4):1064–78.
24. Lee KH, Kim DY, Kim W. Regulation of Gene Expression by Telomere Position Effect. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(23).
25. Lee J, Pellegrini MV. Biochemistry, Telomere And Telomerase. In: StatPearls [Internet] [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK576429/>
26. Sanders JL, Newman AB. Telomere Length in Epidemiology: A Biomarker of Aging, Age-Related Disease, Both, or Neither? *Epidemiologic Reviews*. 2013 Jan 1;35(1):112–31.
27. Araújo Carvalho AC, Tavares Mendes ML, da Silva Reis MC, Santos VS, Tanajura DM, Martins-Filho PRS. Telomere length and frailty in older adults—A systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews*. 2019 Sep 1;54:100914.
28. Salinas-Rodriguez A, Manrique-Espinoza B, Rivera-Almaraz A, Sánchez-López JM, Rosas-Vargas H. Telomere Length is Associated with the Prevalence, Persistence, and Incidence of Sarcopenia. *Archives of Medical Research*. 2024 Jun 1;55(4):103007.
29. Bountziouka V, Nelson CP, Codd V, Wang Q, Musicha C, Allara E, et al. Association of shorter leucocyte telomere length with risk of frailty. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2022 Jun 1;13(3):1741–51.
30. Liu J, Siegmund KD. An evaluation of processing methods for HumanMethylation450 BeadChip data. *BMC Genomics*. 2016 Jun 22;17(1):469.
31. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*. 2015 Apr 20;43(7):e47–e47.
32. Joglekar MV, Satoor SN, Wong WKM, Cheng F, Ma RCW, Hardikar AA. An Optimised Step-by-Step Protocol for Measuring Relative Telomere Length. *Methods and Protocols*. 2020;3(2).
33. Pranckevičienė E, Ginevičienė V, Urnikytė A, Jurkūnaitė L, Anikevičiūtė G, Dadelienė R, et al. Genome-Wide Methylation Signature Of Relative Telomere Length In A Cohort Of Sarcopenia And Frailty Patients Of Lithuanian Ancestry [Accepted poster]. WCO-IOF-ESCEO 2025 Rome. 2025 Apr 9;

Valentina Ginevičienė, Justina Kilaitė, Erinija Prancėvičienė, Alina Urnikytė, Rūta Dadelienė, Asta Mastavičiūtė, Ildus I. Ahmetov, Vidmantas Alekna. Genomo, epigenomo ir telomerų ilgio ypatumai esant sarkopenijai ir senatviniam išsekimo sindromui / Metodinės rekomendacijos. – Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 2025. – 61 p.

ISBN 978-609-07-1148-4 (skaitmeninis PDF)

Metodinės rekomendacijos „Genomo, epigenomo ir telomerų ilgio ypatumai esant sarkopenijai ir senatviniam išsekimui“ skirtos gydytojams, gydytojams rezidentams, sveikatos priežiūros specialistams, medicinos genetikams siekiantiems suprasti ir daugiau žinoti apie ankstyvąją sarkopenijos ir išsekimo sindromo prevenciją ir diagnostiką. Šios metodinės rekomendacijos taip pat skirtos mokslininkams-tyrėjams, atliekantiems genetinius ir kitus šiuolaikinius genomikos tyrimus, siejamus su žmogaus senėjimo procesais ir patologija senatvėje.

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Knygos internete *knygynas.vu.lt*
Mokslo periodikos žurnalai *zurnalai.vu.lt*
2,9 aut.l.
Maketuotoja Nijolė Bukantienė