



The influence of rs2273773 and rs7895833 SIRT1 gene polymorphisms on life expectancy in context of metabolic factors in Silesian population

Wpływ polimorfizmów rs2273773 i rs7895833 genu SIRT1 na długość życia w kontekście czynników metabolicznych w populacji śląskiej

Łukasz Woźny, Magdalena Stefanowicz, Marta Danikiewicz, Władysław Grzeszczak

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

ABSTRACT

INTRODUCTION: Currently, increasingly more genetic variants with an influence on longevity are being sought. One of these is the SIRT1 gene which codes proteins called sirtuins. Regulating transcription, maintaining genomic stability and affecting carbohydrate-lipid metabolism, sirtuins are thought to be longevity enzymes.

AIM OF THE STUDY: The aim of the study is to demonstrate the potential relationship between rs2273773 and rs7895833 SIRT1 gene polymorphisms and longevity in the context of metabolic disorders.

MATERIAL AND METHODS: The study encompassed a total of 448 consecutive patients from Southern Poland. The subjects were divided into 2 groups based on age and metabolic disorders. Genotyping of SIRT1 gene polymorphisms was performed using fluorescence-labelled probes and ready-to-use single nucleotide polymorphism determination sets - the TaqMan Pre-designed SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems). The Statistica 9.0 program was used for statistical computations.

RESULTS: In the case of the rs2273773 polymorphism, the prevalence of the TT genotype in the study group was 86.93%, CT 13.07%, CC 0.00%, and TT 91.19%, CT 8.47%, CC 0.34% in the control group. In the case of the rs7895833 polymorphism, the distribution of genotypes in the study group was as follows: AA 67.32%, AG 28.76%, GG 3.92%, and AA 68.47%, AG 28.47% GG 3.05% in the control group.

CONCLUSIONS: No relationship was demonstrated between SIRT1 gene polymorphisms and life expectancy in the Upper Silesian residents.

KEY WORDS

SIRT1, sirtuins, life expectancy

Received: 21.03.2016

Revised: 07.06.2016

Accepted: 11.07.2016

Published online: 09.06.2017

Address for correspondence: Prof. dr hab. n. med. Władysław Grzeszczak, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. 3 Maja 13/15, 41-800 Zabrze, tel. +48 32 271 25 11, e-mail: wgrzeszczak@sum.edu.pl

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
www.annales.sum.edu.pl

**STRESZCZENIE**

WSTĘP: Obecnie coraz częściej poszukuje się różnych wariantów genetycznych mających wpływ na długowieczność. Jednym z nich jest gen SIRT1, który koduje białka zwane sirtuinami. Sirtuiny, działając poprzez regulację transkrypcji, utrzymywanie stabilności genomu i wpływ na metabolizm węglowodanowo-lipidowy, są uważane za enzymy długowieczności.

CEL PRACY: Celem pracy było wykazanie potencjalnego związku między polimorfizmami rs2273773 i rs7895833 genu SIRT1 a długowiecznością w kontekście zaburzeń metabolicznych.

MATERIAŁ I METODY: Badaniem objęto łącznie kolejnych 448 pacjentów z rejonu Polski południowej. Badanych podzielono na 2 grupy na podstawie ich wieku i zaburzeń metabolicznych. Genotypowanie polimorfizmów genu SIRT1 przeprowadzono z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie sond, używając gotowych zestawów do oznaczania polimorfizmu pojedynczego nukleotydu – TaqMan Pre-designed SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems). Do obliczeń poszczególnych parametrów w ujęciu statystycznym zastosowano program Statistica 9.0.

WYNIKI: W grupie badanej w obrębie polimorfizmu rs 2273773 częstość występowania genotypu TT wyniosła 86,93%, CT 13,07%, CC 0,00%, natomiast w grupie kontrolnej TT była równa 91,19%, CT 8,47%, CC 0,34%. W obrębie polimorfizmu rs 7895833 w grupie badanej rozkład genotypów przedstawiał się następująco: AA 67,32%, AG 28,76%, GG 3,92%, natomiast w grupie kontrolnej AA wynosił 68,47%, AG 28,47%, GG 3,05%.

WNIOSKI: Nie wykazano związku między polimorfizmami genu SIRT1 a wydłużeniem życia u osób zamieszkujących teren Górnego Śląska.

SŁOWA KLUCZOWE

SIRT1, sirtuiny, długość życia

INTRODUCTION

For centuries, scientists around the world have strived to answer the question how to prolong human life and provide immortality. The mechanisms of the secret to longevity are based on ageing processes that are genetically programmed, but are subject to numerous regulations throughout life. Many theories try to explain on different biological levels – evolutionary, molecular, cellular and systemic – how over time the human organism successively becomes self-destructive [1]. Efforts are made to explain the importance of molecular damage accumulation, shortening of telomeres and oxidative metabolism, but changes in the expression of genes responsible for the development and processes of ageing are also relevant [2].

One of the key genes is SIRT1, located on the long arm of chromosome 10, and consisting of 11 exons and 10 introns, the first of seven representative genes (SIRT 1–7) having a sequence homologous with the Sir2 protein family present in *Saccharomyces cerevisiae* [3,4]. These genes encode proteins called sirtuins, which through NAD⁺-dependent deacetylation of N-acetylated lysine residues, interact with many transcription regulators. This reaction proceeds in two stages: first, lysing of the glycosidic bond linking ADP-ribose to nicotinamide with the participation of water, and then transferring the acyl group from sirtuin to the ADP-ribose residue to form 2' and 3'-O-acetyl-ADP-ribose and releasing nicotinamide [5]. The transcription factors regulated by SIRT1 include: PPAR α

WSTĘP

Od wieków naukowcy z całego świata próbują odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób wydłużyć życie człowieka i zapewnić mu nieśmiertelność. Mechanizmy sekretu długowieczności opierają się na procesach starzenia, które są genetycznie zaprogramowane, ale podczas życia człowieka podlegają licznym regulacjom. Istnieje wiele teorii, które na różnych płaszczynach biologicznych – ewolucyjnej, molekularnej, komórkowej i systemowej – próbują wyjaśnić, w jaki sposób ludzki organizm z czasem sukcesywnie podlega autodestrukcji [1]. Poszukuje się znaczenia akumulacji uszkodzeń molekularnych, skracania telomerów, metabolizmu oksydacyjnego, jednak nie bez znaczenia pozostają zmiany w ekspresji genów odpowiedzialnych za rozwój i procesy starzenia [2].

Jednym z kluczowych genów jest SIRT1, zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 10, składający się z 11 eksonów i 10 intronów, będący pierwszym z reprezentantów siedmiu genów (SIRT 1–7) wykazujących homologię sekwencyjną z białkami rodziny Sir2, występujących u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [3,4]. Geny te kodują białka zwane sirtuinami, które poprzez NAD⁺-zależną deacetylację N-acetylowanych reszt lizyny oddziałują z wieloma czynnikami regulującymi transkrypcję. Reakcja ta przebiega dwuetapowo: najpierw dochodzi do lizy wiązania glikozydowego łączącego ADP-rybozę z nikotynamidem z udziałem wody, a następnie do przeniesienia grupy acylowej z sirtuiny na resztę ADP-rybozy z utworze-



and γ (peroxisome α and γ proliferator activated receptors), PGC-1 α (PPAR- γ coactivator-1 α), FoxO (forkhead box O protein) and nuclear factor κ B (NF- κ B). In this way, the gene participates in a large spectrum of physiological processes, such as apoptosis, carbohydrate-lipid metabolism and neurodegeneration [6,7,8,9]. Sirtuins are produced both by the simplest single-celled forms of life and by mammals, including the human body [10]. They are expressed in many tissues, including the brain, myocardium, kidney, liver, vascular endothelium and white adipose tissue [11]. The clinical effects of sirtuins, which have been observed in many studies conducted in various organisms, depended on their activity. For example, deletions, which abolish sirtuin deacetylation activity, shorten the life of yeasts by about 50%, while overexpression of this protein increases their survival by 30%. A similar effect was observed in the study on Sir2 homologue overexpression conducted in *Caenorhabditis elegans* [12]. The important fact is in which metabolic context these proteins have the greatest activity. It occurs that calorie intake is an important factor regulating their work. This phenomenon called caloric restriction, modulates the energy state within the cell by altering the NAD⁺/NADH ratio while providing a pool of free NAD⁺ coenzymes, which can then be utilized by the Sir2 family proteins. This effect does not occur if organisms have damaged genes responsible for encoding sirtuins. A decrease in the number of calories in the diet is accompanied by increased activity of these enzymes [13].

In addition, a wide range of sirtuin action was discovered in the context of carbohydrate-lipid metabolism. In pancreatic beta cells, the action of sirtuins 1 reduces the expression of the UCP2 membrane mitochondrial protein, thereby enhancing the secretion of insulin [14]. They also inhibit the PPAR- γ receptor adhering to its cofactors – NCoR (nuclear receptor co-repressor) and SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors) – thus regulating the storage of free fatty acids, i.e. increasing the differentiation of adipose tissue, lipolysis reduces the amount of visceral fat [15]. In calorie restriction periods, SIRT1 also inhibits transcriptional coactivators regulated by CREB: CRTC2 and TORC2, weakening hepatic gluconeogenesis [16]. In the liver, it activates the LXR receptor, which inhibits intestinal absorption, and stimulates inverted cholesterol transport [17].

Taking into account the relationship of metabolism with ageing processes and the regulatory role of sirtuins in both these processes, we have made an attempt to evaluate the impact of selected polymorphisms on life expectancy. We have chosen these two specific polymorphisms (rs7895833 A > G, rs2273773 C > T) in order to broaden our knowledge on their connections with longevity. Current literature indicates their role in the pathogenesis of obesity, type 2 diabetes and cardio-

niem 2' i 3'-O-acetylo-ADP-rybozy i uwolnieniem nikotynamidu [5]. Do czynników transkrypcyjnych regulowanych przez SIRT1 należą: PPAR α i γ (receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów α i γ), PGC-1 α (PPAR- γ koaktywator-1 α), FoxO (białko forkhead box O) oraz czynnik jądrowy κ B (NF- κ B). W ten sposób gen ten uczestniczy w dużym spektrum fizjologicznych procesów, takich jak apoptoza, gospodarka węglowodanowo-lipidowa oraz neurodegeneracja [6,7,8,9].

Sirtuiny są produkowane zarówno przez najprostsze jednokomórkowe formy życia, jak i ssaki, w tym organizm ludzki [10]. Do ich ekspresji dochodzi w wielu tkankach m.in. w mózgu, mięśniu sercowym, nerkach, wątrobie, śródbłonku naczyniowym czy białej tkance tłuszczowej [11]. W wielu badaniach na różnych organizmach zaobserwowano kliniczny efekt ich działania zależny od ich aktywności. Na przykład delekcje, znoszące aktywność deacetylacji sirtuin, skracają okres życia drożdży o około 50%, natomiast nadekspresja tego białka zwiększa ich przeżywalność o 30%. Podobny efekt stwierdzono w badaniach nadekspresji homologa Sir2 u *Caenorhabditis elegans* [12]. Istotnym zjawiskiem jest fakt, w jakim kontekście metabolicznym białka te mają największą aktywność. Okazało się bowiem, że istotnym czynnikiem regulującym ich pracę jest ilość przyjmowanych kalorii z pożywieniem. Zjawisko to zwane restrykcją kalorii moduluje stan energetyczny wewnątrz komórki, zmieniając stosunek NAD⁺/NADH, udostępniając zarazem pulę wolnych koenzymów NAD⁺, które następnie mogą być wykorzystane przez białka rodziny Sir2. Efekt ten nie występuje, jeśli organizmy mają uszkodzone geny kodujące sirtuiny. Zmniejszeniu liczby kalorii w diecie towarzyszy zwiększenie aktywności tych enzymów [13].

Ponadto poznano szeroki zakres działania sirtuin w kontekście gospodarki węglowodanowo-lipidowej. W komórkach beta trzustkowych działanie sirtuiny 1 prowadzi do zmniejszonej ekspresji błonowego białka mitochondrialnego UCP2, potęgując tym samym sekrecję insuliny [14]. Hamuje też receptor PPAR- γ przyczepiając się do jego kofaktorów – NCoR (*nuclear receptor co-repressor*) i SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*) – regulując w ten sposób magazynowanie wolnych kwasów tłuszczowych, tj. zwiększa różnicowanie komórek tkanki tłuszczowej, lipoliza zmniejsza zawartość trzewnej tkanki tłuszczowej [15]. W okresach restrykcji kalorii SIRT1 hamuje też koaktywatory transkrypcji regulowane przez CREB: CRTC2 i TORC2, osłabiając wątrobową glukoneogenezę [16]. W wątrobie aktywuje receptor LXR, co powoduje zahamowanie jelitowej absorpcji, i stymuluje odwrócony transport cholesterolu [17].

Biorąc pod uwagę związek przemian metabolicznych z procesami starzenia i rolę regulatorową sirtuin w obu



vascular disease, and only few studies suggest their association with prolonged life [18].

MATERIAL

The study encompassed 448 individuals. 153 subjects qualified for the study group while 295 people who consecutively reported to the primary care clinic, were enrolled in the control group. They answered health surveys which were later verified on the basis of prior medical records. The criterion of qualification to the study group was an age of at least 90 years. The control group included patients based on a BMI that exceeded 25. The study excluded people with endocrine diseases, eating disorders, steroid therapy, and disseminated malignancies. Genetic tests were performed in a laboratory belonging to the Chair of Internal Diseases, Diabetology and Nephrology of the Medical University of Silesia. The study was approved by the Bioethical Committee of the Silesian Medical Chamber in Katowice (Resolution No. 20/2010).

The study group consisted of 106 women (69.28%) and 47 men (30.72%), and the mean group age was 92.57 years. 162 women (54.92%) and 133 men (45.08%) with the mean age of 55.28 years and an average BMI of 28.63 were included in the control group. BMI in the study group was not taken into account.

METHODS

Genetic DNA isolation was performed from peripheral blood leukocytes using a DNA isolation kit from Epicentre Technologies at the molecular biology laboratory of the Chair of Internal Diseases, Diabetology and Nephrology of the Medical University of Silesia. Optimization of the isolated DNA concentrations to 15 ng/μl was carried out on the basis of measurements taken by a NanoDrop spectrometer from Thermo Scientific. Two fluorescence-labelled probes, complementary to each of the alleles for the respective polymorphisms, were used to genotype rs2273773 and rs7895833 polymorphisms using the ready-to-use kit – TaqMan Pre-designed SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems). Polymerase chain reaction and allele identification were performed using the 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

tych procesach, podjęliśmy w naszej pracy próbę oceny wpływu wybranych polimorfizmów na długość życia. Motywem wyboru tych konkretnych dwóch polimorfizmów (rs7895833 A > G, rs2273773 C > T) była chęć poszerzenia wiedzy na temat ich powiązań z długowiecznością. Dotychczasowa literatura wskazuje na ich rolę w patogenezie otyłości, cukrzycy typu 2 czy chorób sercowo-naczyniowych, a jedynie nieliczne prace wskazują na ich związek z wydłużeniem życia [18].

MATERIAL

Badaniem objęto 448 osób. Do grupy badanej zakwalifikowano 153 osoby, a do kontrolnej 295 osób kolejno zgłaszających się do poradni podstawowej opieki zdrowotnej. Przeprowadzono wśród nich ankiety dotyczące stanu zdrowia, które następnie zweryfikowano na podstawie wcześniejszej dokumentacji medycznej. Kryterium kwalifikacji pacjenta do grupy badanej był wiek co najmniej 90 lat. Do grupy kontrolnej włączono pacjentów na podstawie wskaźnika BMI, którego wartość przekraczała 25. Z badania wykluczono osoby z chorobami endokrynologicznymi, zaburzeniami odżywiania, będące w trakcie terapii sterydami oraz z rozsiałą, złośliwą chorobą nowotworową. Badania genetyczne wykonano w laboratorium należącym do Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii SUM. Na prowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiej Izby Lekarskiej w Katowicach (Uchwała nr 20/2010).

Grupa badana składała się z 106 kobiet (69,28%) i 47 mężczyzn (30,72%), a średnia wieku grupy wynosiła 92,57 roku. Do grupy kontrolnej włączono 162 kobiety (54,92%) i 133 mężczyzn (45,08%), gdzie średnia wieku wynosiła 55,28 roku, a średnia wartość BMI 28,63. Wskaźnik BMI w grupie badanej nie był brany pod uwagę.

METODY

Izolację genomowego DNA przeprowadzono z leukocytów krwi obwodowej zestawem do izolacji DNA firmy Epicentre Technologies w pracowni biologii molekularnej Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii SUM. Optymalizację stężeń wyizolowanego DNA do wartości 15 ng/μl wykonano na podstawie pomiaru spektrofotometrem NanoDrop



Table I. Sequences of primers for tested SIRT1 gene polymorphisms
Tabela I. Sekwencje starterów dla badanych polimorfizmów genu SIRT1

| Polymorphism/ Polimorfizm | Sequences of primers/Sekwencja starterów |
|------------------------------|--|
| rs7895833 A > G | F1: CCCAGGGTTCAACAAATCTATGTTG F2: GGTGGTAAAAGGCCTACAGGAAA R1: GCTTCCTAATCTCCATTACGTTGAC R2: CCTCCCAGTCAACGACTTTATC |
| rs2273773 C > T | F1: GTGTGTCGCATCCATCTAGATAC F2: CTCTCTGTCACAAATTCATAGCCT R1: GTAGTTTTCTTCCTTATCTGACAG R2: CTGAAGTTTACTAACCATGACACTG |

Statistical analysis

Statistical analysis of the results was performed using the Statistica 8.0 program for Windows. Clinical data and information on the incidence of individual genotypes and alleles of the studied polymorphisms were collected in a Microsoft Excel database. For all the analysed values, the following parameters were calculated: mean, standard deviation, normal distribution minimum and maximum. Qualitative data is presented in percentages. The normality of the results distribution was evaluated using the Shapiro-Wilk test. Multivariate ANOVA variance analysis (for data with normal distribution and meeting the assumptions of the analysis) was used to examine the influence of factors (independent variables) on the dependent variable. The next step in the analysis of variance was to perform post-hoc comparisons using the Scheffe test. The statistical significance between the alleles was assessed using Pearson's Chi-square test and the chi-square test of independence. The variables for which significance level p was less than 0.05 were considered statistically significant parameters.

RESULTS

Taking into account the distribution of genotype frequencies, the statistical analysis of rs2273773 and rs7895833 SIRT1 gene polymorphisms did not show a statistical significance between them and life expectancy in the studied population. The distribution of allele frequencies between the control and study group was not statistically significant either (Table II). The rs2273773 polymorphism analysis showed dominance of the TT genotype (86.27%) and a minimal share of CC genotype (0.34%), a more frequent incidence of allele T (55.56%) was found in the study group. Analysis of the rs7895833 polymorphism showed a higher incidence of AA genotype (67.32%) and a A (64.56%) in the study group.

w genie SIRT1 wykorzystano dwie znakowane fluorescencyjnie sondy, komplementarne do każdego z alleli dla odpowiedniego polimorfizmu, używając gotowego zestawu – TaqMan Predesigned SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems). Reakcję łańcuchowej reakcji polimerazy i identyfikację alleli przeprowadzono w aparacie 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników uzyskanych w pracy przeprowadzono za pomocą programu Statistica 8.0 PL dla systemu Windows. W bazie danych programu Microsoft Excel zgromadzono parametry kliniczne pacjentów, częstość występowania poszczególnych genotypów i alleli badanych polimorfizmów. Dla wszystkich analizowanych wartości zostały obliczone takie parametry, jak średnia, odchylenie standardowe, minimum i maksimum rozkładu normalnego. Dane jakościowe przedstawiono w postaci wartości procentowych. Oceny normalności rozkładu otrzymanych wyników dokonano na podstawie testu Shapiro-Wilka. Do badania wpływu czynników (zmiennych niezależnych) na zmienną zależną zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji ANOVA (dla danych o rozkładzie normalnym i spełniających założenia analizy). Kolejnym krokiem analizy wariancji było wykonanie porównań post-hoc testem Scheffe. Znacmiennosć statystyczną między badanymi allelami oceniono na podstawie testu χ^2 Pearsona oraz testu χ^2 NW. Za parametry istotne statystycznie uznawano zmienne, dla których poziom istotności p był mniejszy niż 0,05.

WYNIKI

Analiza statystyczna polimorfizmów rs 2273773 i rs 7895833 genu SIRT1, z uwzględnieniem rozkładu częstości genotypów, nie wykazała istotności statystycznej pomiędzy nimi a długością życia badanej populacji. Rozkład częstości alleli między grupami badaną a kontrolną również nie był istotny statystycznie (tab. II). W analizie polimorfizmu rs2273773 stwierdzono dominację genotypu TT (86,27%) i minimalny udział genotypu CC (0,34%), wykazano również częstsze występowanie allelu T (55,56%) w grupie badanej. Analiza polimorfizmu rs7895833 wykazała częstsze występowanie genotypu AA (67,32%) i większy udział allelu A (64,56%) w grupie badanej.



Table II. Results of comparative analyses of genotype distributions and allelic frequencies between control and study group for individual polymorphisms
Tabela II. Wyniki analiz porównawczych rozkładów genotypów oraz częstości alleli pomiędzy grupami badaną i kontrolną dla poszczególnych polimorfizmów

| Polymorphism/ Polimorfizm | Group/ Grupa | Genotypes/Genotypy | | | | Chi ² | df | P | Alleles/Allele | | P |
|------------------------------|-----------------------|--------------------|----------------|-----------|------------------------------|------------------|----|-------|----------------|-----------------|-------|
| | | TT | CT | CC | unspecified/ nieokreślony | | | | T | C | |
| rs2273773 | control/ kontrolna | 257 (87.12%) | 25 (8.47%) | 1 (0.34%) | 12 (4.07%) | 2.84 | 2 | 0.241 | 565 (66.39%) | 25 (33.61%) | 0.135 |
| | study/ badana | 132 (86.27%) | 20 (13.07%) | 0 (0%) | 1 (0.66%) | | | | 286 (55.56%) | 20 (44.44%) | |
| rs7895833 | control/ kontrolna | AA | AG | GG | unspecified/ nieokreślony | 0.25 | 2 | 0.882 | A | G | 0.706 |
| | study/ badana | 195 (66.10%) | 80 (27.12%) | 9 (3.05%) | 11 (3.73%) | | | | 488 (66.12%) | 102 (33.88%) | |
| | | 103 (67.32%) | 41 (26.80%) | 6 (3.92%) | 3 (1.96%) | | | | 250 (64.56%) | 56 (35.44%) | |

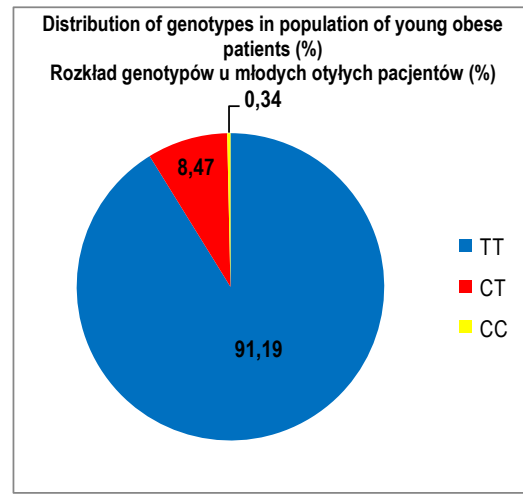
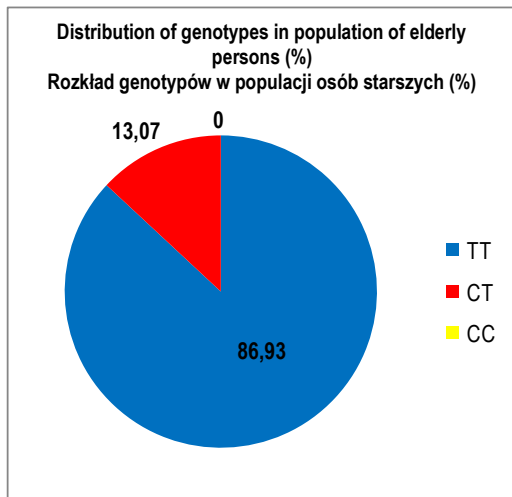


Fig. 1. Distribution of genotypes with polymorphism rs2273773 in individual groups of patients.
Ryc. 1. Rozkład genotypów z polimorfizmem rs2273773 w poszczególnych grupach pacjentów.

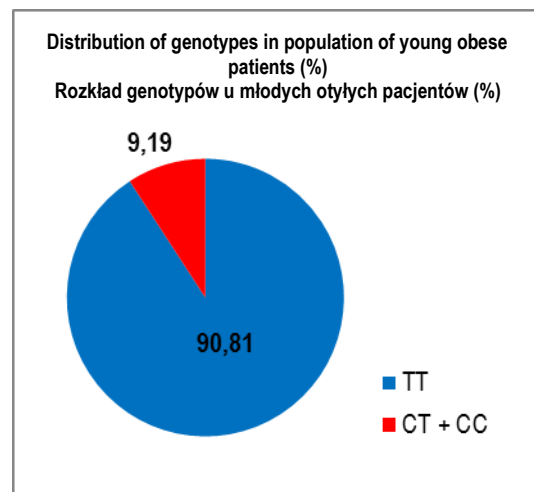
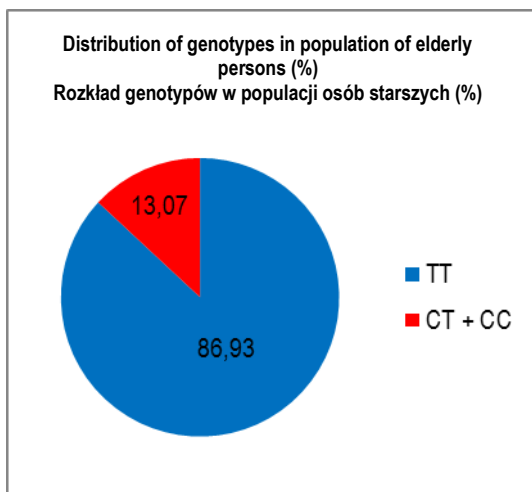


Fig. 2. Ratio of dominant genotypes to other genotypes in patients with rs2273773 polymorphism.
Ryc. 2. Stosunek genotypów dominujących do pozostałych genotypów u pacjentów z polimorfizmem rs2273773.

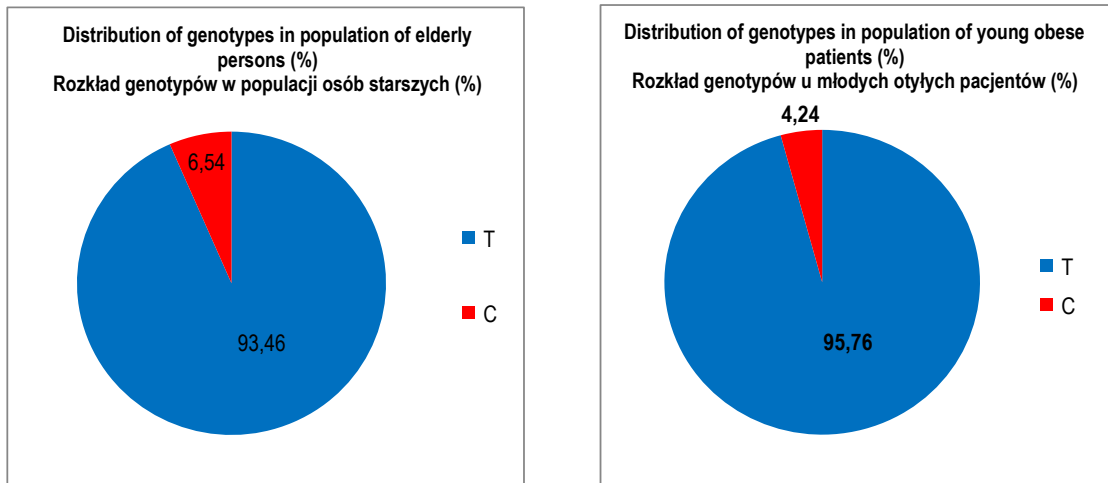


Fig. 3. Alleles distribution in individual groups of patients with rs2273773 polymorphism.
Ryc. 3. Rozkład alleli w poszczególnych grupach pacjentów z polimorfizmem rs2273773.

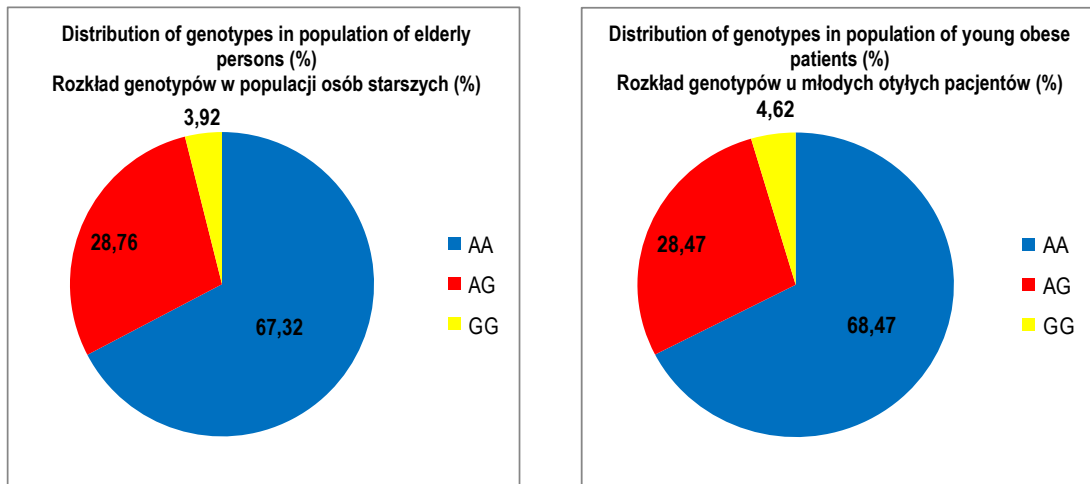


Fig. 4. Distribution of genotypes with rs7895833 polymorphism in individual groups of patients.
Ryc. 4. Rozkład genotypów z polimorfizmem rs7895833 w poszczególnych grupach pacjentów.

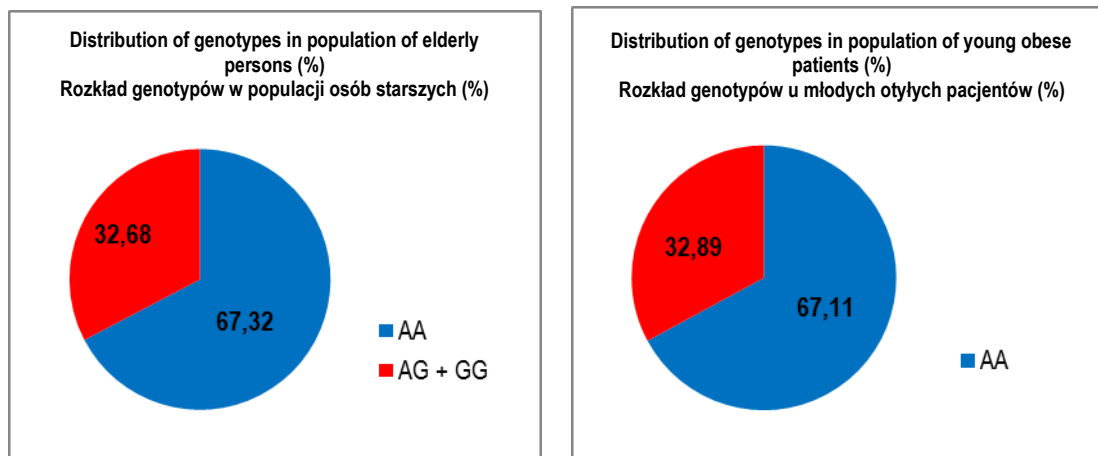


Fig. 5. Ratio of dominant genotypes to other genotypes in patients with rs7895833 polymorphism.
Ryc. 5. Stosunek genotypów dominujących do pozostałych genotypów u pacjentów z polimorfizmem rs7895833.

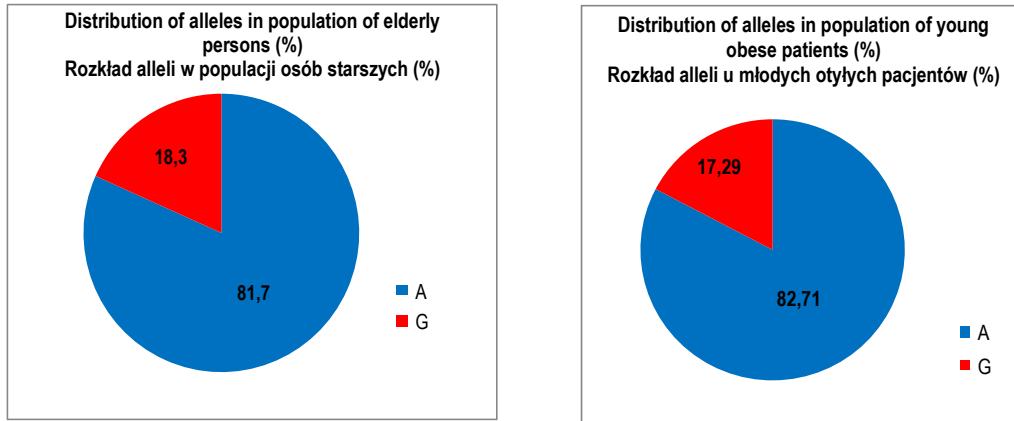


Fig. 6. Distribution of alleles in individual groups of patients with rs7895833 polymorphism.
Ryc. 6. Rozkład alleli w poszczególnych grupach pacjentów z polimorfizmem rs7895833.

DISCUSSION

With the advancement of medicine, the development of effective pharmacotherapy and widespread prevention, increasingly more people live to a ripe old age; in many developed countries this social group is dominant. The World Health Organization estimates that in 2020 the number of the elderly will exceed 20%. As predicted by demographic forecasts, in our country the birth rate in 2030 will also be negative and the population aged 65 and over will continue to grow until it reaches its peak in 2030 when it will be over 8.5 million [19]. Still, there are cases of people or even entire populations (Japan, Sardinia, Nicoya Peninsula) of so-called centenarians, whose ageing mechanisms seem to be limited and delayed [20]. Therefore, currently, thanks to the rise of molecular biology, the importance of different variants of genes in the modification of ageing processes is increasingly pointed out as well as their impact on the prolongation of human life. One of the leading representatives is the SIRT1 gene, whose polymorphisms (rs7895833 A > G, rs2273773 C > T) are indirectly related to ageing by affecting cholesterol metabolism, body mass, obesity and atherosclerosis, as well as directly by causing cognitive impairment or increasing the amount and activity of sirtuins [18,21,22,23,24].

In our study, patients who had a BMI of 25 or more constituted the control group as scientific evidence indicates they live significantly shorter than those with a normal body mass. A broad prospective study of over 57.000 centres in Europe and North America with nearly 900.000 subjects has shown that any increase in BMI by 5 kg/m² is associated with a rise in mortality by 30%. People with a BMI in the range of 30–35 kg/m² live on average 2–4 years shorter and those with huge obesity and a BMI between 40 and

DYSKUSJA

Wraz z postępowaniem medycyny, rozwojem skutecznej farmakoterapii i szeroko pojętej profilaktyki coraz więcej osób na świecie dożywa sędziwego wieku i w wielu rozwiniętych krajach grupa ta stanowi dominującą warstwę społeczną. Światowa Organizacja Zdrowia szacuje, że w 2020 r. liczba osób w wieku podeszłym przekroczy 20%. Jak przewidują prognozy demograficzne, również w naszym kraju przyrost naturalny w 2030 r. będzie ujemny, a populacja osób powyżej 65 r.ż. będzie nadal rosła, aż osiągnie szczyt w 2030 r., kiedy to liczyć będzie ponad 8,5 mln [19]. Mimo to cały czas zagadką pozostają przypadki osób czy nawet całe populacje (Japonia, Sardinia, półwysep Nicoya) tzw. stulatków, u których mechanizmy starzenia wydają się nad wyraz ograniczone i opóźnione [20]. Dlatego obecnie, dzięki rozkwitowi biologii molekularnej, coraz częściej wskazuje się na znaczenie różnych wariantów genów w modyfikacji procesów starzenia i ich wpływ na wydłużenie życia człowieka. Jednym z czołowych przedstawicieli jest gen SIRT1, którego polimorfizmy (rs7895833 A > G, rs2273773 C > T) powiązane są pośrednio ze starzeniem poprzez wpływ na metabolizm cholesterolu, masę ciała, powstanie otyłości i miażdżycy oraz bezpośrednio przez upośledzenie procesów poznawczych czy wzrost ilości i aktywności sirtuin [18,21,22,23,24]. W naszym badaniu za próbę kontrolną przyjęto pacjentów, których BMI wynosi powyżej 25, gdyż jak dowodzą badania naukowe, osoby te żyją znacząco krócej od tych z prawidłową masą ciała. W szerokim badaniu prospektywnym, obejmującym ponad 57 ośrodków z Europy i Ameryki Północnej, liczącym prawie 900 000 uczestników, wykazano, że każdy wzrost wartości BMI o 5 kg/m² wiąże się ze wzrostem śmiertelności o 30%. Osoby z BMI w granicach 30–



45 kg/m² live up to 8–10 years shorter [25]. Another large 15-year prospective study of 220.000 Chinese people also demonstrated the impact of an increased BMI on life expectancy. It was estimated that any increase in BMI by 5 kg/m² gives a mortality risk of 14–27% [26]. It is difficult to choose a control group based on such a parameter which will inevitably indicate that the group will not live to a specific age. It seems logical to create a control group of young oncology patients whose probability of longevity is significantly lower, but the low number of SIRT1 gene linkages with carcinogenesis excluded this possibility. Our observation did not show a relationship between SIRT1 gene polymorphisms and life longevity, which may be due to incorrect classification to the control group or too small size of the study group. It seems advisable in future studies to create three groups – children, adults and elderly – and to analyse the distribution of genotypes in a wider time frame as well as evaluate the level of sirtuins in their sera. Undoubtedly, this topic requires further exploration. Currently, there are only few works in world literature on the direct relationship between polymorphisms and prolonged life. Recent reports by Kilica et al. [18] indicated a significant increase in sirtuin levels in the elderly (73.5 ± 1.0, 56–92 years) and a correlation between the incidence of the rs7895833 polymorphism AG genotype in individuals from this group and the control group, where the mean age was 46.9 ± 0.5 years. This genotype occurred in 33.3% of children (control group), in 27.0% of adults (control group) and in 45.6% of the elderly (study group) (p = 0.014) [18].

In a study of 1279 Japanese [27], three SIRT1 gene polymorphisms, rs7895833, rs7069102, and rs2273773 were evaluated, looking for a link between them and obesity and hypertension. It was reported that in the case of the rs7895833 polymorphism, AA genotype male carriers had a significantly higher BMI and fat content than those of other genotypes, while AA female carriers had a significantly higher statistically significant diastolic blood pressure. In the case of the rs2273773 polymorphism, men with the TT genotype had a significantly higher fasting blood glucose, body fat content, systolic and diastolic blood pressure than other genotypes. No significant differences were observed for this polymorphism in women.

To sum up the study results, we can conclude that allele A for the rs7895833 polymorphism and allele T for the rs2273773 are likely to be risk factors for obesity in males, while allele A rs7895833 carriage in women and allele C rs2273773 carriage in men are likely risk factors for hypertension [27]. Given the fact that metabolic disorders significantly accelerate the ageing process, and that the contribution of these polymorphisms is linked to both problems, further research is needed to show the indirect role of the

–35 kg/m² żyją krócej średnio o 2–4 lata, a z otyłością olbrzymią i BMI między 40 a 45 kg/m² aż o 8–10 lat krócej [25]. W innym dużym, 15-letnim badaniu prospektywnym na populacji 220 000 Chińczyków również wykazano wpływ zwiększonego BMI na długość życia. Oszacowano, że każdy wzrost BMI o 5 kg/m² daje ryzyko śmiertelności w granicach 14–27% [26]. Trudno dobrać grupę kontrolną opartą na takim parametrze, który w sposób pewny wskaże, że grupa ta nie dożyje konkretnego wieku. Logiczne wydaje się stworzenie grupy kontrolnej złożonej z młodych pacjentów z chorobą nowotworową, których prawdopodobieństwo długowieczności jest istotnie niższe, jednak mała liczba powiązań genu SIRT1 z kancerogenezą wykluczyła tę możliwość. Nasze obserwacje nie wykazały związku między badanymi polimorfizmami genu SIRT1 a długością życia, co może wynikać z niewłaściwej klasyfikacji osób do grupy kontrolnej lub zbyt małej liczebności grupy badawczej. Wskazane wydaje się stworzenie w kolejnych badaniach trzech grup – dzieci, dorośli, osoby w podeszłym wieku – i przeanalizowanie rozkładu genotypów w szerszej ramie czasowej oraz dokonanie oceny poziomu sirtuin w ich surowicach. Bez wątpienia temat ten wymaga dalszych poszukiwań.

W literaturze światowej istnieje obecnie tylko kilka prac odnoszących się do bezpośredniego związku między badanymi polimorfizmami a przedłużonym życiem. Najnowsze doniesienia Kilica i wsp. [18] informują o znaczącym wzroście poziomu sirtuin u osób w wieku podeszłym (73,5 ± 1,0; zakres 56–92 lat) oraz korelacji między częstością występowania genotypu AG polimorfizmu rs7895833 u osób z tej grupy a grupą kontrolną, gdzie średnia wieku wyniosła 46,9 ± 0,5 roku. U dzieci (grupa kontrolna) genotyp ten występował z częstością 33,3%, u dorosłych (grupa kontrolna) – 27,0%, a u osób starszych (grupa badawcza) – 45,6% (p = 0,014) [18].

W badaniu grupy 1279 Japończyków [27] oceniano trzy polimorfizmy genu SIRT1 rs7895833, rs7069102, i rs2273773, poszukując związku między nimi a otyłością i nadciśnieniem tętniczym. Dowiedziono, że dla polimorfizmu rs7895833 nosiciele genotypu AA płci męskiej mieli znacząco statystycznie wyższe BMI i zawartość tkanki tłuszczowej niż nosiciele innych genotypów, natomiast kobiety nosicielki genotypu AA wykazywały znacząco statystycznie wyższe rozkurczowe ciśnienie tętnicze. W przypadku polimorfizmu rs2273773 zaobserwowano, że u mężczyzn nosicieli genotypu TT wartość glikemii na czczo, zawartość tkanki tłuszczowej, wartość ciśnienia skurczowego i rozkurczowego były istotnie bardziej podwyższone niż w przypadku innych genotypów. U kobiet nie zaobserwowano dla tego polimorfizmu znaczących odrębności. Podsumowując wyniki badań stwierdzono, że posiadanie allelu A w obrębie polimorfizmu rs7895833 i allelu T dla rs2273773 prawdopodobnie stanowi



SIRT1 gene in accelerating ageing through biochemical carbohydrate-lipid metabolic pathways.

Another study, which was conducted in the Chinese population of the Yongfu region, analysed the following 5 polymorphisms of the SIRT1 gene: rs3758391, rs3740051, rs2273773, rs4746720 and rs10997870. A cohort of 500 patients was divided into a study group with mean age span of 93.17 years and a control group consisting of healthy people whose average age was 46.92 years. The results for only one polymorphism showed a statistically significant correlation for the CT rs4746720 genotype, which was significantly more common than the other homozygotes, CC and TT ($P = 0.000$, OR = 2.098, 95% CI: 1.412–4.117). No relationship was found between life expectancy and the rs2273773 polymorphism which we have studied [28].

To sum up the results of our work, we can conclude that there was no statistically significant correlation between the chosen polymorphisms and the length of life in the Upper Silesian population. This may be due to population differences or not entirely optimal control group selection. However, given the clinical background of ageing processes and their complex mechanisms, it seems reasonable to extend the study by measuring carbohydrate-lipid metabolism and blood pressure parameters together with serum sirtuin levels and then perform comparative analyses in significantly different age groups. Undoubtedly, the search for genetic determinants of ageing is an indispensable element of modern diagnostics, early prevention and treatment of the elderly, whose numbers will continue to grow systematically in the coming years.

czynnik ryzyka otyłości u mężczyzn zaś nosicielstwo allelu A rs7895833 u kobiet i allelu C rs2273773 u mężczyzn jest prawdopodobnym czynnikiem ryzyka nadciśnienia tętniczego [27]. Biorąc pod uwagę fakt, że schorzenia metaboliczne znacząco przyspieszają procesy starzenia, a udział wspomnianych polimorfizmów jest wiązany z obydwojoma problemami, nie bez przyczyny potrzebne są dalsze badania, które być może ujawnią pośrednią rolę genu SIRT1 w przyspieszaniu starzenia na drodze szlaków biochemicznych gospodarki węglowodanowo-lipidowej.

W innej próbie na chińskiej populacji regionu Yongfu poddano analizie 5 polimorfizmów genu SIRT1: rs3758391, rs3740051, rs2273773, rs4746720 i rs10997870. Kohortę 500 pacjentów podzielono na grupy badawczą ze średnią długością życia 93,17 roku i kontrolną, złożoną ze zdrowych osób, których średni wiek wyniósł 46,92 roku. W wynikach tylko dla jednego z polimorfizmów wykazano znaczącą statystycznie korelację, mianowicie genotyp CT rs4746720 okazał się istotnie częstszy niż pozostałe homozygoty CC i TT ($P = 0,000$, OR = 2,098, 95% CI: 1,412–4,117). Nie udowodniono żadnego związku między długością życia a badanym przez nas polimorfizmem rs2273773 [28].

Reasumując wyniki naszej pracy, nie wykazano istotnie statystycznej korelacji między wybranymi polimorfizmami a długością życia w populacji pacjentów z rejonu Górnego Śląska. Być może wynika to z różnic populacyjnych lub nie do końca optymalnego doboru grupy kontrolnej. Jednak biorąc pod uwagę kliniczne tło procesów starzenia i ich złożone mechanizmy, racjonalne wydaje się poszerzenie badania o pomiar parametrów gospodarki węglowodanowo-lipidowej i ciśnienia tętniczego wraz z oceną stężenia poziomu sirtuin w surowicy, a następnie wykonanie analizy porównawczej w grupach istotnie różniących się pod względem wieku. Bez wątpienia poszukiwanie genetycznych uwarunkowań regulujących starzenie jest nieodzownym elementem nowoczesnej diagnostyki, wczesnej profilaktyki i leczenia osób w wieku podeszłym, których liczba w kolejnych latach będzie systematycznie rosła.

REFERENCES

1. Weinert B.T., Timiras P.S. Invited review: Theories of aging. *J. Appl. Physiol.* 2003; 95(4): 1706–1716.
2. Blagosklonny M.V., Campisi J., Sinclair D.A. Aging: past, present and future. *Aging (Albany NY)* 2009; 1(1): 1–5.
3. Duan W. Sirtuins: from metabolic regulation to brain aging. *Front. Aging Neurosci.* 2013; 5: 36. doi: 10.3389/fnagi.2013.00036.
4. Afshar G., Murnane J.P. Characterization of a human gene with sequence homology to *Saccharomyces cerevisiae* SIR2. *Gene* 1999; 234(1): 161–168.
5. Frye R.A. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 260(1): 273–279.
6. Wilson B.J., Tremblay A.M., Deblois G., Sylvain-Drolet G., Giguère V. An acetylation switch modulates the transcriptional activity of estrogen-related receptor alpha. *Mol. Endocrinol.* 2010; 24(7): 1349–1358. doi: 10.1210/me.2009-0441.
7. Rodgers J.T., Lerin C., Haas W., Gygi S.P., Spiegelman B.M., Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 2005; 434(7029): 113–118. doi: 10.1038/nature03354.
8. Nemoto S., Fergusson M.M., Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(16): 16456–16460. doi:10.1074/jbc.M501485200.
9. Motta M.C., Divecha N., Lemieux M., Kamel C., Chen D., Gu W., Bulisma Y., McBurney M., Guarente L. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 2004; 116(4): 551–563.



10. Haigis M.C., Guarente L.P. Mammalian sirtuins – emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* 2006; 20(21): 2913–2921. doi: 10.1101/gad.1467506.
11. Gong H., Pang J., Han Y., Dai Y., Dai D., Cai J., Zhang T.M. Age-dependent tissue expression patterns of Sirt1 in senescence-accelerated mice. *Mol. Med. Res.* 2014; 10(6): 3296–3302.
12. Blander G., Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu. Rev. Biochem.* 2004; 73: 417–435.
13. Wang J., Ho L., Qin W., Rocher A.B., Seror I., Humala N., Manjar K., Dolios G., Wang R., Hof P.R., Pasinetti G.M. Caloric restriction attenuates beta-amyloid neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2005; 19(6): 659–661. doi: 10.1096/fj.04-3182fje.
14. Bordone L., Motta M.C., Picard F., Robinson A., Jhala U.S., Apfeld J., McDonagh T., Lemieux M., McBurney M., Szilvasi A., Easlson E.J., Lin S.J., Guarente L. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 2006; 4(2): e31.
15. Picard F., Kurtev M., Chung N., Topark-Ngarm A., Senawong T., Machado De Oliveira R., Leid M., McBurney M.W., Guarente L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 2004; 429(6993): 771–776.
16. Liu Y., Dentin R., Chen D., Hedrick S., Ravnskjaer K., Schenk S., Milne J., Meyers D.J., Cole P., Yates J. 3rd, Olefsky J., Guarente L., Montminy M. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* 2008; 456(7219): 269–273.
17. Li X., Zhang S., Blander G., Tse J.G., Krieger M., Guarente L. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell.* 2007; 28(1): 91–106.
18. Kilic U., Gok O., Erenberk U., Dundaroz M.R., Torun E., Kucukardali Y., Elibol-Can B., Uysal O., Dundar T. A Remarkable Age-Related Increase in SIRT1 Protein Expression against Oxidative Stress in Elderly: SIRT1 Gene Variants and Longevity in Human. *PLoS One* 2015; 10(3): e0117954.
19. Wiczerowska-Tobis K., Grześkowiak E. Farmakoterapia geriatryczna. *Czasopismo Aptekarskie* 2008; 2(170): 12–15.
20. Mishra B.N. Secret of eternal youth; Teaching from the centenarian hot spots (“blue zones”). *Indian J. Community Med.* 2009; 34(4): 273–275.
21. Bodden I.P., Zillikens M.C., de Rooij S.R., Langendonk J.G., Danser A.H. Sijbrands E.J., Roseboom T.J. Variants in the SIRT1 gene may affect diabetes risk in interaction with prenatal exposure to famine. *Diabetes Care* 2012; 35(2): 424–426. doi: 10.2337/dc11-1203.
22. Clark S.J., Falchi M., Olsson B., Jacobson P., Cauchi S., Balkau B., Marre M., Lantieri O., Andersson J.C., Jernäs M., Aitman T.J., Richardson S., Sjöström L., Wong H.Y., Carlsson L.M., Froguel P., Walley A.J. Association of sirtuin 1 (SIRT1) gene SNPs and transcript expression levels with severe obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2012; 20(1): 178–185. doi: 10.1038/oby.2011.200.
23. Cui Y., Wang H., Chen H., Pang S., Wang L., Liu D., Yan B. Genetic analysis of the SIRT1 gene promoter in myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 426(2): 232–236. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.071.
24. Harris S., E. Fox H., Wright A.F., Hayward C., Starr J.M., Whalley L.J., Deary I.J. A genetic association analysis of cognitive ability and cognitive ageing using 325 markers for 109 genes associated with oxidative stress or cognition. *BMC Genet.* 2007; 8: 43.
25. Prospective Studies Collaboration. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009; 373(9669): 1083–1096.
26. Chen Z., Yang G., Offer A., Zhou M., Smith M., Peto R., Ge H., Yang L., Whitlock G. Body mass index and mortality in China: a 15-year prospective study of 220 000 men. *Int. J. Epidemiol.* 2012; 41(2): 472–481.
27. Shimoyama Y., Suzuki K., Hamajima N., Niwa T. Sirtuin 1 gene polymorphisms are associated with body fat and blood pressure in Japanese. *Transl. Res.* 2011; 157(6): 339–347.
28. Huang J., Sun L., Liu M., Zhou L., Lv Z.P., Hu C.Y., Huang Z.Z., Zheng C.G., Zhou L., Yang Z. Association between SIRT1 gene polymorphisms and longevity of populations from Yongfu region of Guangxi. *Chinese Journal of Medical Genetics* 2013; 30(1): 55–59.