

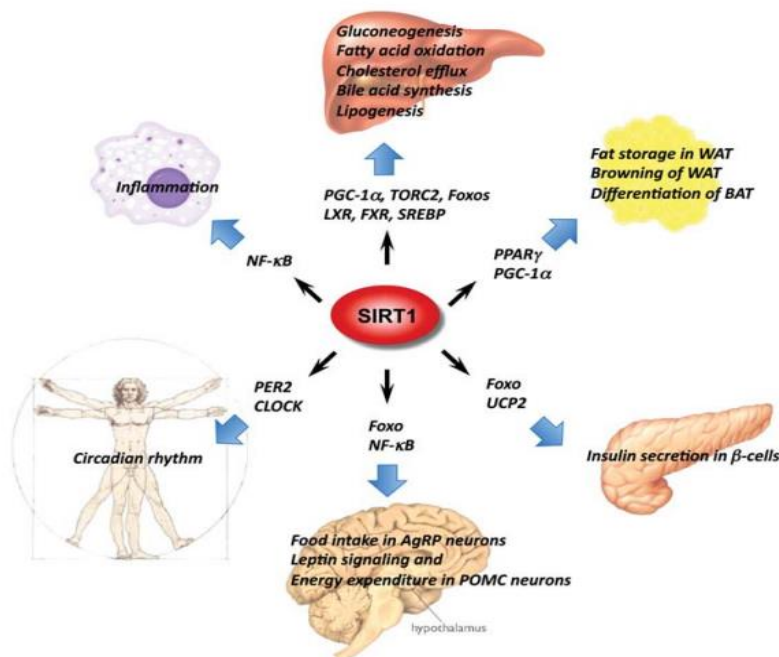


Σχολή Επιστημών Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
**ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
**Οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί της SIRT1 ως δείκτες στην εμφάνιση  
του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2**

MSc Thesis  
**SIRT1 functional polymorphisms as genetic markers of  
susceptibility to type 2 diabetes mellitus**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Προύντζου Ειρήνη  
Prountzou Eirini

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Χούχουλα Δήμητρα  
Houhoula Dimitra

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022





Faculty of Food Sciences  
Department of Food Science and Technology

Master of Science  
**FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY**

MSc THESIS

**SIRT1 functional polymorphisms as genetic markers of  
susceptibility to type 2 diabetes mellitus**

PROUNTZOU EIRINI  
A.M. 20024  
eirinipro87@hotmail.com

SUPERVISOR  
HOUHOULA DIMITRA

AIGALEO 2022

Έγινε δεκτή

Ο Διευθυντής του ΠΜΣ:

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο **‘Οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί της SIRT1 ως δείκτες στην εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2** ’ που παρουσιάστηκε από την **ΠΡΟΥΝΤΖΟΥ ΕΙΡΗΝΗ**, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην **ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Όνομα επιβλέποντος

30/05/2022

Χούχουλα Δήμητρα

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

30/05/2022

Ζουμπουλάκης Παναγιώτης

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

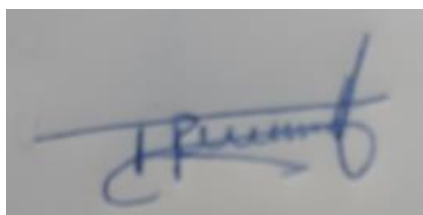
30/05/2022

Μπατρίνου Ανθιμία

#### Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Προύντζου Ειρήνη

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored background. The signature is cursive and appears to read 'Eirini Prunzou'.



## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτριά μου κυρία Χούχουλα Δήμητρα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της διπλωματικής μου μελέτης καθώς και για τη συνεχή της καθοδήγηση και ενθάρρυνση για τη διεκπεραίωση αυτής. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δέσποινα Βουγιουκλάκη και την Αλίκη Τσάκνη για τη συμπαράστασή τους στο απαιτητικό αυτό εγχείρημα και τις συμβουλές τους.





## Αφιερώσεις

Αφιερωμένο στον Κώστα και την οικογένειά μου που ήταν δίπλα μου και με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.



## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Το γενετικό υπόβαθρο αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου στην παθογένεση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Η σιρτουΐνη 1 (SIRT1) είναι μία NAD<sup>+</sup> - εξαρτώμενη αποακετυλάση η οποία ανήκει στην οικογένεια των ρυθμιστών σιωπηλής πληροφορίας 2 (Sir2). Ο ρόλος της έχει επισημανθεί σε μονοπάτια που συνδέονται με ευαισθησία σε αλλαγές στη θρέψη και τη σηματοδότηση ινσουλίνης και αλλά και στη ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης. Πρόσφατες έρευνες έχουν μελετήσει το ρόλο κλειδί της SIRT1 στην αντίσταση στην ινσουλίνη και την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

**Σκοπός:** Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η συχνότητα εμφάνισης δύο λειτουργικών πολυμορφισμών μιας βάσης, των rs12778366 (C/T) και rs3758391 (C/T), σε πληθυσμό υγιών ατόμων και ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη και την πιθανότητα συσχέτισής τους με την εμφάνιση της ασθένειας.

**Μέθοδος:** Το δείγμα της μελέτης ήταν συνολικά 49 συμμετέχοντες και αποτελούνταν από 32 εγκυμονούσες ( n=7 με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 , n=12 με σακχαρώδη διαβήτη κύησης, n=4 με προεκλαμψία και n=9 χωρίς κάποια πάθηση) και 17 ασθενείς (n=15 με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και n=2 χωρίς την πάθηση). Απομονώθηκε αρχικά DNA από τον σκελετικό μυ των εγκυμονουσών και ολικό αίμα από τους ασθενείς. Οι αλληλουχίες – στόχοι των 2 πολυμορφισμών πολλαπλασιάστηκαν μέσω της μεθόδου PCR με την προσθήκη των εκκινητών για τον rs12778366 : forward primer 5'-TAAGGCTTCTAGGACTGGAGATGA-3' (STR1) και reverse primer 5'-GTCCCTTAAGCCTAGTATGGGTTC-3' (STR2) και για τον rs3758391 εκκινητές: forward primer 5'-GTCACGCAGGTAATTGATGCAG-3' (STR3) και reverse primer 5'-GGCTTAGTGGAAAGCCCTTC-3' (STR4). Ακολούθησε, σε επόμενο στάδιο, χρήση των περιοριστικών ενζύμων HpyCH4III για τον rs12778366 και N1aIII για τον rs3758391. Υπολογισμοί και στατιστικές αναλύσεις με τη χρήση του  $\chi^2$  τεστ (chi-square test) διεξήχθησαν προκειμένου να εξεταστεί η συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών γονοτύπων και η αλληλεπίδραση των αλληλόμορφων με την παρουσία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

**Αποτελέσματα:** Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs12778366, η πλειονότητα των ατόμων της μελέτης έφερε τον γονότυπο TT χωρίς όμως να υπάρχει διαφορά

ανάμεσα στα άτομα που είχαν διαβήτη τύπου 2 και σε αυτά που δεν έφεραν τη νόσο (77,3% vs 66.6%) ενώ παρόμοια τάση παρατηρήθηκε και για τους ετεροζυγώτες στις δύο ομάδες (22,7% vs 33.4%). Επιπροσθέτως, δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία του αλληλόμορφου C και την ευαισθησία στη νόσο ( $p - value = 0.221 < 0,05$ ). Για τον πολυμορφισμό rs3758391, ο γονότυπος CT εμφανίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά στα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη σε σχέση με όσους δεν έχουν διαβήτη (54,5% vs 33,4%) ενώ ο γονότυπος CC σε μεγαλύτερο ποσοστό στα άτομα που δεν φέρουν τη νόσο συγκριτικά με τους νοσούντες (55,5% vs 36,3%). Ο γονότυπος TT εμφανίζεται σε παρόμοια ποσοστά στις 2 ομάδες, με σακχαρώδη διαβήτη και μη, σε ποσοστά 9.1% και 11.1% αντίστοιχα. Παρ' όλα αυτά το αλληλόμορφο T δεν συνδέεται με ευαισθησία στην εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 ( $p - value = 0.225 < 0.05$ ).

**Συμπεράσματα:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία των αλληλόμορφων και τον κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη για τους δύο πολυμορφισμούς rs12778366 και rs3758391.

**Λέξεις – κλειδιά:** σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, σιρτουΐνη 1 (SIRT1), πολυμορφισμοί



## Abstract

**Introduction:** Genetic background is an important risk factor for the pathogenesis of diabetes mellitus type 2. Sirtuin 1 (SIRT1) is a nicotinamide adenosine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) dependent deacetylase which belongs to the silent information regulator 2 (Sir2) family of sirtuin histone deacetylases. Its role has been demonstrated in nutrient – sensing and insulin signaling pathways as well as in the regulation of glucose homeostasis. Recent studies have examined the key - role of SIRT1 in insulin resistance and type 2 diabetes.

**Aim:** In the present study we examined the frequency of different genotypes of the one basis polymorphisms rs12778366 (C/T) and rs3758391 (C/T) and investigated potential correlation of the studied variants with the presence of type 2 diabetes mellitus.

**Methodology:** The sample of the study was overall 49 subjects and consisted of 32 pregnant women (n=4 with diabetes mellitus type 2, n=15 with gestational diabetes, n=4 with preeclampsia και n=9 healthy subjects) και 17 patients (n=15 with diabetes mellitus type 2 και n=2 non diabetics). Genomic DNA was isolated from skeletal muscle of the pregnant women and from total blood of the patients. The target sequences of the two SNPs were multiplied via polymerase chain reaction (PCR) method using the following primers: for the rs12778366, forward primer 5'-TAAGGCTTCTAGGACTGGAGATGA-3' (STR1) and reverse primer 5'-GTCCCTTAAGCCTAGTATGGGTTC-3' (STR2) and for the rs3758391, forward primer 5'-GTCACGCAGGTAATTGATGCAG-3' (STR3) and reverse primer 5'-GGCTTAGTGAAAGCCCTTC-3' (STR4). For the next step, the PCR products were digested using HpyCH4III (rs12778366) and N1aIII (rs3758391) restriction enzymes. Assessments and statistical analyses were performed using chi – square test to determine the frequency of the studied variants and potential interactions with the presence of type 2 diabetes mellitus.

**Results:** Regarding rs12778366 polymorphism, the vast majority of subjects carried genotype TT in both groups, diabetes and non-diabetes, without difference between them (77.3% vs 66,6%) and same rate was observed for the heterozygous in both groups (22.7% and 33,4% respectively). We found no

significant association between rs12778366 polymorphism and an enhanced risk of diabetes mellitus type 2 under allelic C vs. T genetic models ( $p$  – value = 0.221 < 0.05). Regarding rs3758391 polymorphism, genotype CT is present to diabetes mellitus group in higher rates compared to non-diabetes group (54.5% vs 33,4%), while genotype CC is present in higher rates to non – diabetes group when compared to diabetes group (55,5% vs 33,4%). Genotype TT is present in same rates to both groups, diabetes and non-diabetes (9,1% and 11,1% respectively). Nevertheless, no significant association was found between T allele and susceptibility to type 2 diabetes mellitus ( $p$  – value = 0.225 < 0.05).

**Discussion:** Our results showed no significant association of the studied variants and alleles of the rs12778366 and rs3758391 polymorphisms with the presence of type 2 diabetes mellitus.

**Keywords:** Diabetes mellitus type 2, sirtuin 1 (SIRT1), polymorphisms

## Περιεχόμενα

<i>Ευχαριστίες</i> .....	5
<i>Αφιερώσεις</i> .....	7
<b>Περίληψη</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	12
<b>Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή</b> .....	2
<b>Κεφάλαιο 2</b> .....	4
<b>2.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ - ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ</b> .....	4
<i>2.1.1 Περιβάλλον και επιγενετική</i> .....	6
<i>2.1.2 Γενετικό υπόβαθρο σακχαρώδη διαβήτη</i> .....	9
<b>2.2 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ SIRT1</b> .....	10
<i>2.2.1 Λειτουργία της SIRT1 πρωτεΐνης</i> .....	12
<i>2.2.2 Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ SIRT1</i> .....	13
<i>2.2.2.1 Ο ρόλος της SIRT1 στην ενεργειακή ομοιόσταση</i> .....	15
<i>2.2.2.2 Ο ρόλος της SIRT1 στην έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας</i> .....	16
<i>2.2.2.3 Ο ρόλος της SIRT1 στον διαβήτη κύησης</i> .....	18
<i>2.2.2.4. Ο ρόλος της SIRT1 στην προεκλαμψία</i> .....	19
<i>2.2.3. Η SIRT1 ως θεραπευτικός στόχος</i> .....	20
<b>2.3. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ SIRT1 ΣΤΟΝ ΔΙΑΒΗΤΗ</b> .....	20
<i>2.3.1. Ο πολυμορφισμός rs12778366</i> .....	22
<i>2.3.2. Ο πολυμορφισμός rs3758391</i> .....	24
<b>Κεφάλαιο 3: Υλικά &amp; Μέθοδοι</b> .....	27
<b>3.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b> .....	27
<b>3.2 ΥΛΙΚΑ</b> .....	28
<b>Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα &amp; Συζήτηση</b> .....	37
<b>4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	37
<i>4.1.1. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs12778366</i> .....	37
<i>4.1.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs3758391</i> .....	40
<b>4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	44
<b>5. Συμπεράσματα &amp; Μελλοντικές έρευνες</b> .....	47
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ -ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b> .....	48





## Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες ανησυχίες στην παγκόσμια δημόσια υγεία τον 21<sup>ο</sup> αιώνα λόγω των σοβαρών επιπλοκών που συνδέονται με τη νόσο. Το γεγονός αυτό, καθιστά απαραίτητο να ερευνηθεί η παθογένεση της ασθένειας και να αναπτυχθούν καινοτόμες στρατηγικές για την αντιμετώπιση αυτής και των συνοδών επιπλοκών. Παρά το γεγονός ότι η κατανόηση του γενετικού υποβάθρου στην εμφάνιση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 έχει εξελιχθεί ταχύτατα, το πεδίο έρευνας προσφέρεται για περαιτέρω μελέτη. Ο τρόπος με τον οποίο τα γονίδια αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον και οδηγούν στην πρόκληση προοδευτικής μείωσης της δράσης των β – κυττάρων παραμένει ασαφής. Περιβαλλοντικοί παράγοντες και η υπεργλυκαιμία πιθανόν συνεισφέρουν στις επιγενετικές αλλαγές στο DNA και τις ιστόνες και συνεπώς ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων σε όργανα που εμπλέκονται στην παθογένεση και την εξέλιξη του σακχαρώδη διαβήτη, συμπεριλαμβανομένων και των β – κυττάρων.

Τα τελευταία χρόνια, η κατανόηση του ρόλου της σιρτουΐνης 1 (SIRT1) έχει επεκταθεί από τον αρχικό της χαρακτηρισμό ως μια μία NAD<sup>+</sup> - εξαρτώμενη αποακετυλάση η οποία ανήκει στην οικογένεια των σιωπηλών ρυθμιστών 2 (silent information regulators, Sir2) και είναι υπεύθυνη για την μακροβιότητα των ζυμών. Ειδικότερα, η SIRT1 αποκετυλιώνει όχι μόνο ιστόνες αλλά και πολλούς μεταγραφικούς ρυθμιστικούς παράγοντες και πρωτεΐνες και συνεπώς ρυθμίζει αντιστρεπτές βιολογικές διαδικασίες. Θεωρείται ένας από τους πιο σημαντικούς αισθητήρες θρέψης με αξιοσημείωτες επιγενετικές δυνατότητες. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυξάνονται σε κατάσταση θερμιδικού περιορισμού ενώ παρατηρείται αρνητική ρύθμιση (down – regulation) στην παχυσαρκία και τον διαβήτη. Η SIRT1 εμπλέκεται στην κυτταρική απόκριση κατά την αλλαγή της ενεργειακής κατάστασης μέσω ρύθμισης της δράσης πολλών ενζύμων αλλά και μεταγραφικών παραγόντων και συμπαραγόντων. Όσον αφορά την ομοιόσταση της γλυκόζης, έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη δρα ως κύριος μηχανισμός δράσης στη λειτουργία των β-κυττάρων, στη ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης και τη ρύθμιση της δραστηριότητας μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στα παγκρεατικά β- κύτταρα (Leibiger IB, 2005). Πληθώρα δεδομένων έχει δείξει ότι η

πρωτεΐνη ρυθμίζει τον μεταβολισμό γλυκόζης και λιπιδίων μέσω της άμεσης και έμμεσης εμπλοκής της στην σηματοδότηση ινσουλίνης (insulin signaling) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ινσουλινοαντίσταση και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Colak Y., 2011).

Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι η SIRT1 είναι ιδανική υποψήφια πρωτεΐνη για την συμμετοχή της στην ανάπτυξη και εξέλιξη των επιπλοκών του διαβήτη. Πολυμορφισμοί του γονιδίου της SIRT1 έχουν μελετηθεί σε πληθυσμούς όπως Ινδούς και Κινέζους, και ενώ ορισμένες έρευνες πρότειναν σημαντικά στατιστική συσχέτιση πολυμορφισμών με τον διαβήτη τύπου 2 και τις επιπλοκές του, κάποιες άλλες δεν έδειξαν σύνδεση των πολυμορφισμών με την εμφάνιση της νόσου. Με βάση τα δεδομένα αυτά, η παρούσα έρευνα μελέτησε 2 λειτουργικούς πολυμορφισμούς που βρίσκονται στην περιοχή του εκκινητή του γονιδίου, τον rs12778366 και τον rs3758391 και ειδικότερα τη συχνότητα εμφάνισής τους στον υπό μελέτη πληθυσμό και την πιθανή σύνδεση των αλληλόμορφων των γονοτύπων με τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

## Κεφάλαιο 2.

### 2.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ - ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Ο σακχαρώδης διαβήτης ορίζεται ως ένα σύνολο μεταβολικών διαταραχών και χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η νόσος οφείλεται σε διαταραχή είτε της έκκρισης, είτε της δράσης της ινσουλίνης είτε σε συνδυασμό αυτών των δύο, και έχει ως συνέπεια την πρόκληση σχετικής ή απόλυτης έλλειψης ινσουλίνης. Διάφορες παθογενετικές διαδικασίες εμπλέκονται στην ανάπτυξη της ασθένειας που περιλαμβάνουν από αυτοάνοση καταστροφή β – κυττάρων στο πάγκρεας με συνεπαγόμενη ανεπάρκεια ινσουλίνης, μέχρι και ανωμαλίες που οδηγούν σε αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης (Association, 2011). Στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων, η νόσος διαχωρίζεται σε διαβήτη τύπου 1 (λόγω αυτοάνοσης καταστροφής των β κυττάρων που εκκρίνουν ινσουλίνη) και σε διαβήτη τύπου 2 που χαρακτηρίζεται από ινσουλινοαντίσταση και ανεπαρκή απόκριση στην έκκριση ινσουλίνης και έχει χαρακτηριστικά μεταβολικού συνδρόμου. Ο διαχωρισμός αυτός ωστόσο, είναι υπεραπλουστευμένος και αδυνατεί να περιγράψει στην πραγματική του διάσταση το εύρος της ασθένειας. Η έννοια του διαβήτη έχει διευρυνθεί τις τελευταίες δεκαετίες λόγω των διαφορετικών μηχανισμών που οδηγούν στη νόσο και εξαιτίας της τροποποίησης των μηχανισμών αυτών και της έκφρασης της νόσου από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες. Ειδικότερα, ο διαβήτης μπορεί να προκληθεί από καταστροφή των παγκρεατικών β κυττάρων ως αποτέλεσμα αυτοάνοσης επίθεσης που οδηγεί σε απόλυτη έλλειψη ινσουλίνης ενώ λιγότερο σοβαρή έλλειψη ινσουλίνης εμφανίζεται σε άτομα που πάσχουν από παγκρεατίτιδα. Ο γενετικός χαρακτηρισμός μονογονιδιακών μορφών διαβήτη όπως ο διαβήτης που έχει την έναρξή του στην εφηβεία (maturity - onset diabetes in the young [MODY]), συνεπάγεται την ύπαρξη ενός άλλου τύπου έλλειψης ινσουλίνης και χαρακτηρίζεται από ελαττωματικό έλεγχο της έκκρισης ινσουλίνης. Συγκεκριμένα, τα β κύτταρα επιβιώνουν και παράγουν ινσουλίνη αλλά έχουν μικρή ανταπόκριση στην αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο πλάσμα. Μηχανισμοί ελαττωματικού ελέγχου εμφανίζονται και σε νεογνικό και μιτοχονδριακό διαβήτη. Όσον αφορά τους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, εκκρίνεται μεγάλη ποσότητα ινσουλίνης, δεν υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στην ευαισθησία στην ινσουλίνη και την έκκριση αυτής με αποτέλεσμα η

αυξημένη έκκριση ινσουλίνης να μην ανταποκρίνεται στις αυξημένες απαιτήσεις λόγω παχυσαρκίας και ινσουλινοαντίστασης. Το βασικότερο κοινό χαρακτηριστικό όλων των μορφών σακχαρώδη διαβήτη είναι η δυσλειτουργία ή η καταστροφή των β – κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά δεν είναι δυνατόν να «αντικατασταθούν» εφόσον το ανθρώπινο πάγκρεας δείχνει να αδυνατεί να ανανεώσει τα β – κύτταρα έπειτα από την ηλικία των 30 ετών. Πολλοί μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της λειτουργίας ή την ολοκληρωτική καταστροφή των β – κυττάρων όπως η γενετική προδιάθεση, επιγενετικές διαδικασίες, αντίσταση στην ινσουλίνη, αυτοάνοσες ασθένειες, φλεγμονή, συνυπάρχουσες ασθένειες και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Λαμβάνοντας υπόψιν όσα προαναφέρθησαν, η ελαττωματική δράση των β κυττάρων είναι υπεύθυνη για την πλειονότητα, αν όχι για όλες, των μορφών διαβήτη (Tiinamaija Tuomi, 2014). Τα άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη αντιμετωπίζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προβλημάτων υγείας που οδηγούν σε χαμηλή ποιότητα ζωής και αυξημένη πιθανότητα θανάτου. Η χρόνια υπεργλυκαιμία που χαρακτηρίζει τον διαβήτη, προκαλεί καταστροφικές μακροαγγειακές επιπλοκές (καρδιαγγειακά νοσήματα) και μικροαγγειακές επιπλοκές σε πολλά όργανα και ιδιαίτερα στους νεφρούς, τον αμφιβληστροειδή, την καρδιά και τα νεύρα, οδηγώντας σε διάφορες επιπλοκές στην υγεία (World Health Organization, 2009). Οι μακροχρόνιες αυτές επιπλοκές καθιστούν τον σακχαρώδη διαβήτη σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία καθώς απαιτεί φροντίδα και θεραπεία καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ασθενούς. Σύμφωνα με τα δεδομένα βιβλιογραφικής μελέτης του IDF, το 2017 424,9 εκατομμύρια άνθρωποι ηλικίας 20-79 ετών ή 451 εκατομμύρια άτομα ηλικίας 18-99 ετών νοσούσαν με σακχαρώδη διαβήτη ενώ οι προβλέψεις για το 2045 αναφέρουν αύξηση των ατόμων που νοσούν με σακχαρώδη διαβήτη σε 629 εκατομμύρια (ηλικία 20-79 ετών) ή σε 693 εκατομμύρια άτομα ηλικίας 18 -99 ετών. (N.H. Cho, 2018). Στον παγκόσμιο χάρτη κατανομής του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 που παρουσιάζεται (βλ. Εικόνα 1), απεικονίζεται ο συνεχώς αυξανόμενος επιπολασμός της νόσου επιβεβαιώνοντας ότι η νόσος αποτελεί παγκόσμια πρόκληση για τη δημόσια υγεία αλλά και την ποιότητα ζωής των ατόμων, των οικογενειών και των κοινωνιών. Η θεραπεία για τον σακχαρώδη διαβήτη αλλά και οι σχετιζόμενες με την ασθένεια επιπλοκές, προκαλούν βαθύτερες οικονομικές επιπτώσεις, καθιστώντας την πρόληψη ως προτεραιότητα της δημόσιας υγείας. Υπάρχει ακόμα

ανησυχία όσον αφορά τη φτωχή διάγνωση της νόσου, καθιστώντας περίπου 193 εκατομμύρια διαβητικούς παγκοσμίως, μη διαγνωσμένους και συνεπώς επιρρεπείς σε μακροπρόθεσμες οργανικές βλάβες λόγω της υπεργλυκαιμίας.

### Diabetes around the world in 2021



**Εικόνα 1.** Ο επιπολασμός του σακχαρώδη διαβήτη στον παγκόσμιο χάρτη. Πηγή: (IDF Diabetes Atlas, Tenth Edition).

#### 2.1.1 Περιβάλλον και επιγενετική

Ο πιο κοινός τύπος σακχαρώδη διαβήτη είναι ο τύπου 2 σακχαρώδης διαβήτης. Η πλειονότητα των ατόμων που εμφανίζουν τη νόσο είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι, μια κατάσταση που είτε προκαλεί είτε επιταχύνει την αντίσταση στην ινσουλίνη. Πολλοί από τους ασθενείς που δεν χαρακτηρίζονται παχύσαρκοι βάσει του κριτηρίου του BMI, έχουν δηλαδή  $BMI < 30\text{kg} / \text{m}^2$ , παρατηρείται ότι έχουν αυξημένη κατανομή λίπους στην κοιλιακή χώρα συγκριτικά με άτομα που δεν έχουν τη νόσο. Εκτός από την προφανή αύξηση στη θερμιδική πρόσληψη και τα μειωμένα επίπεδα ενεργειακής κατανάλωσης, και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι εξίσου σημαντικοί στην εμφάνιση της νόσου (Steven E Kahn, 2014). Η θρεπτική σύσταση της διατροφής και ειδικότερα η αυξημένη πρόσληψη διαιτητικού λίπους (κυρίως κορεσμένου λίπους) συμβάλλουν στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας, την αντίσταση στην ινσουλίνη, τη δυσλειτουργία των  $\beta$  – κυττάρων και την δυσανοχή στη γλυκόζη. Επιπροσθέτως, η

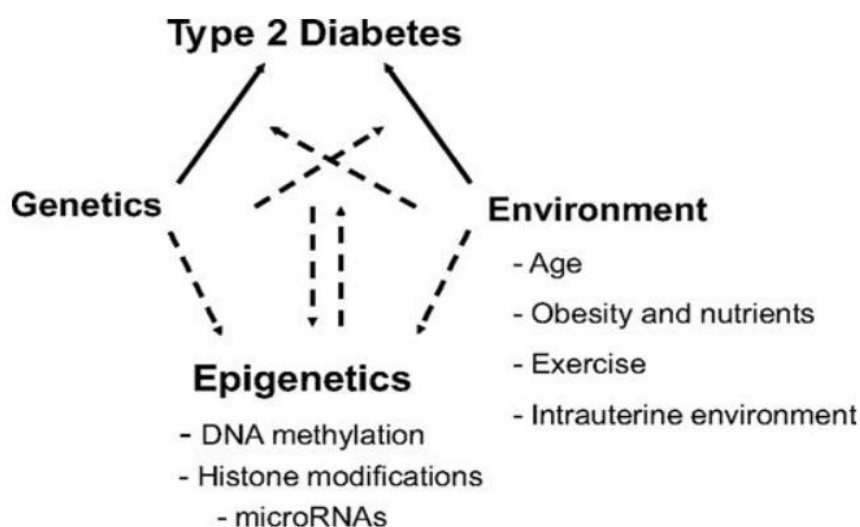
μειωμένη ανταπόκριση των β- κυττάρων στους υδατάνθρακες λόγω ηλικίας, υπογραμμίζει την πτώση στην ανοχή στη γλυκόζη συναρτήσει της ηλικίας. Στον παρακάτω πίνακα (βλ. Πίνακας 1) παρουσιάζονται οι πιο κοινοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου (WHO, 2020).

**Πίνακας 1.** Παράγοντες κινδύνου στην εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Πηγή: WHO (World Health Organization) 2020.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΣΤΟΝ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 2
<ul style="list-style-type: none"><li>• Υπερβάλλον βάρος / παχυσαρκία</li><li>• Καθιστική ζωή</li><li>• Ηλικία</li><li>• Σακχαρώδης διαβήτης σε συγγενείς πρώτου βαθμού (γενετική προδιάθεση)</li><li>• Ιστορικό διαβήτη κύησης</li><li>• Καρδιαγγειακά νοσήματα και συνοδοί παράγοντες κινδύνου</li><li>• εθνικότητα</li></ul>

Παρ' όλα αυτά, πολλοί άνθρωποι που έχουν τους προαναφερόμενους παράγοντες κινδύνου, δεν εμφανίζουν τη νόσο και τις συνοδές επιπλοκές. Στην πραγματικότητα, έρευνες προτείνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ περιβάλλοντος και γονιδίων διαμέσου επιγενετικών τροποποιήσεων, επηρεάζουν την τάση των ατόμων να εμφανίσουν τη νόσο. Το περιβάλλον στη μήτρα κατά τη διάρκεια της κύησης, που ορίζεται μερικώς από το βάρος της μητέρας, μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων που επιδρούν στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου για το νεογνό (Justyna Strycharz, 2018). Ειδικότερα, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (βλ. Εικόνα 2), περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να ενεργοποιήσουν ενδοκυτταρικά μονοπάτια που οδηγούν σε αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων (C. Ling, 2009). Αν και δεν υπάρχει καθολική απόδοση του όρου, η επιγενετική χαρακτηρίζεται από σταθερές και κληρονομήσιμες

αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων ή στους κυτταρικούς φαινοτύπους χωρίς αλλαγές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Περιλαμβάνει μεθυλίωση DNA, τροποποιήσεις στις ιστόνες και σε κυτταρικά μονοπάτια που δεν εκφράζονται (non-coding RNA – mediated pathways) (Ganesan, 2018) και μπορεί να εξηγήσει τον τρόπο με τον οποίο κύτταρα με πανομοιότυπο DNA μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους με διαφορετικούς φαινοτύπους. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα επιγενετικά αποτελέσματα επηρεάζονται από το περιβάλλον καθιστώντας τα δυνητικούς παθογενετικούς μηχανισμούς σε σύνθετες πολυπαραγοντικές ασθένειες όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης (Al-Haddad, 2016). Μέχρι στιγμής οι επιγενετικές αλλαγές που σχετίζονται με τον σακχαρώδη διαβήτη δεν είναι επαρκώς κατανοητές. Παρ' όλα αυτά μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην αυξανόμενη εμφάνιση της νόσου και αποτελεί πρόκληση η απομόνωση του ρόλου των τροποποιήσεων των ιστονών και της μεθυλίωσης του DNA στην παθογένεση του σακχαρώδη διαβήτη και των επιπλοκών αυτού.



**Εικόνα 2.** Επιγενετική, ένας μοριακός σύνδεσμος ανάμεσα στους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τα γονίδια στον διαβήτη τύπου 2. Πηγή: American Diabetes Association, 2009



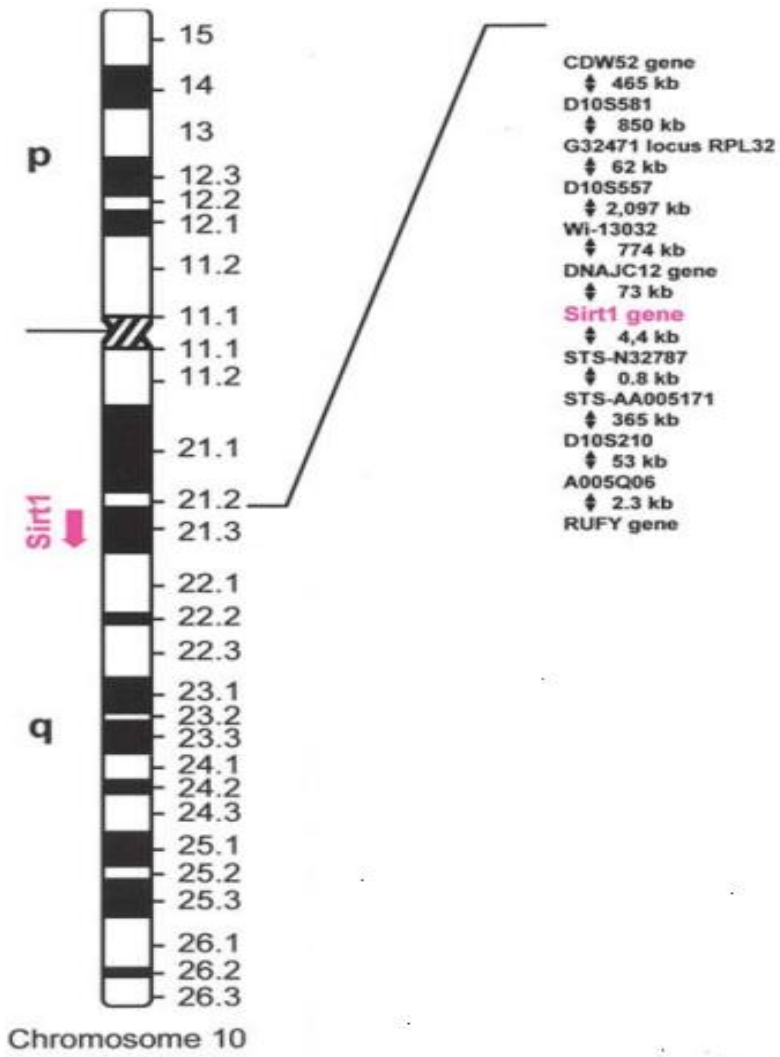
### 2.1.2 Γενετικό υπόβαθρο σακχαρώδη διαβήτη

Ο σακχαρώδης διαβήτης ορίζεται ως μια πολυπαραγοντική ασθένεια με περιβαλλοντικές και γενετικές συνιστώσες, με διαφορετικό βαθμό επίδρασης που αλληλεπιδρούν ανάμεσα στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, τη ρύθμιση της όρεξης, την αποθήκευση λίπους και τη βλάβη των  $\beta$  – κυττάρων. (Langenberg C, 2018). Οι πρώτες γενετικές μελέτες για τη συσχέτιση γονιδίων με την ασθένεια εστίασαν σε μικρής κλίμακας έρευνες υποψήφιων γονιδίων, συχνά προερχόμενων από αναλύσεις συσχέτισης που βασίζονται σε οικογένειες και σε μονογονιδιακές μορφές της νόσου. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών ήταν δύσκολο να επικυρωθούν και η ταυτοποίηση ήταν περιορισμένη σε συγκεκριμένα γονίδια με το γονίδιο PPAR $\gamma$  να είναι το πρώτο που ταυτοποιήθηκε. Αντιθέτως, η καλύτερη κατανόηση του γενετικού υπόβαθρου του σακχαρώδη διαβήτη έχει τη βάση της στη μελέτη υποψήφιων γονιδίων μέσω GWAS (genome-wide association studies) οι οποίες κάνουν χρήση μιας προσέγγισης που λαμβάνει υπόψιν πολλούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) μέσα στο γονιδίωμα ορίζοντας τα τυπικά να έχουν συχνότητα πολυμορφισμού, δηλαδή συχνότητα εμφάνισης διαφορετικών αλληλουχιών DNA, τουλάχιστον 5% (Morris, 2018). Ειδικότερα, οι εξελίξεις στην τεχνολογία και αναλυτικές προσεγγίσεις έχουν ταυτοποιήσει πολλούς μόνο – νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και τη σοβαρότητα άλλων συνοδών παθήσεων όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, υπέρταση, νεφροπάθεια. Η μεγαλύτερη GWAS μέχρι σήμερα όσον αφορά τον διαβήτη τύπου 2 είναι μια μετα-ανάλυση 32 ευρωπαϊκών μελετών κοορτής (cohort studies) 72.000 ασθενών και 824.000 ατόμων αναφοράς (Mahajan, 2018). Η μελέτη αυτή ταυτοποίησε 243 γενετικούς τόπους με ευρεία γονιδιακή (genome – wide) σημαντικότητα και περιλαμβάνουν 403 διακριτά γονίδια συσχέτισης, 152 γενετικούς τόπους ύστερα από προσαρμογή με το BMI (231), 135 μοναδικά γενετικά σημεία και 56 χαμηλής συχνότητας εμφάνισης (συχνότητα <5%) και 24 πολύ μικρής συχνότητας εμφάνισης (συχνότητα < 0,5%) 14 από τα οποία έχουν κίνδυνο εμφάνισης (odds ratio) OR > 2. Τα γονίδια λειτουργούν ρυθμίζοντας διαφορετικές παραμέτρους όπως την πρόσληψη γλυκόζης στον σκελετικό μυ (TBC1D4 γονίδιο), την ικανότητα παραγωγής νέων λιποκυττάρων και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε αυτά τα

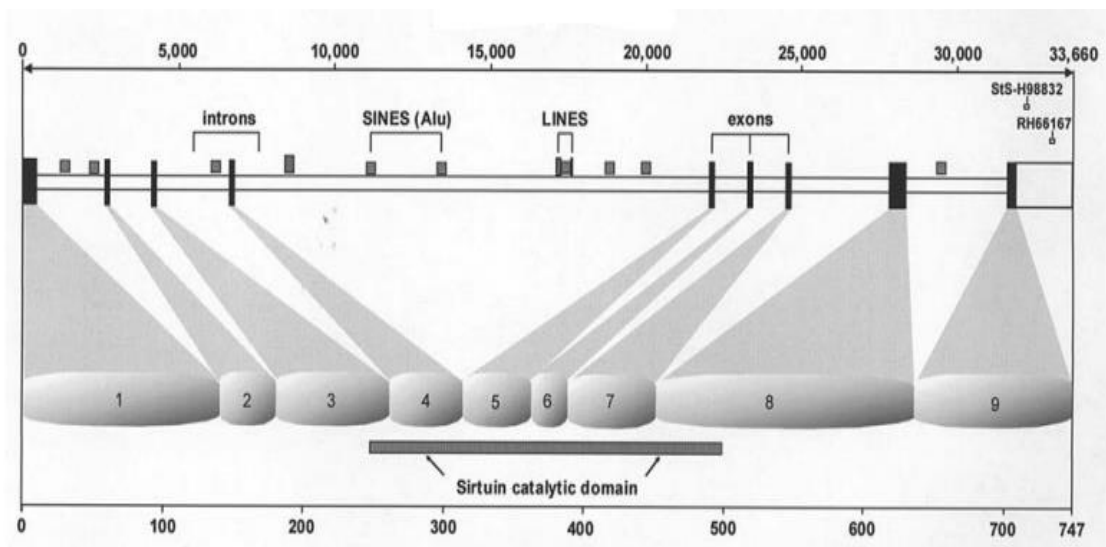
κύτταρα (π.χ. PPARG, KLF14, IRS1 γονίδια), τη λιπόλυση που ρυθμίζεται από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση και την έκκριση ινσουλίνης είτε εξαιτίας της δυσλειτουργίας των β-κυττάρων είτε εξαιτίας μειωμένης ανάπτυξης των β – κυττάρων (KCNJ11, ABCC8 γονίδια) (Tonio, 2018).

## **2.2 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ SIRT1**

Οι σιρτουΐνες είναι μέλη της οικογένειας της Sir2 (silent information regulator 2) που περιλαμβάνει NAD<sup>+</sup> - εξαρτώμενες πρωτεϊνικές αποακετυλάσες. Ταυτοποιήθηκαν πρώτη φορά σε ζύμες και αργότερα σε οργανισμούς από βακτήρια έως και θηλαστικά. Ανάμεσα στις 7 σιρτουΐνες που κωδικοποιούν το γονιδίωμα των θηλαστικών, η SIRT1 είναι, στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το ομόλογο της Sir2 πρωτεΐνης που υπάρχει στις ζύμες και είναι μια πυρηνική NAD<sup>+</sup> - εξαρτώμενη πρωτεϊνική αποακετυλάση. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την SIRT1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10q21.3 (βλ. Εικόνα 3) σε έκταση 33,660 kb και αποτελείται από 9 εξόνια με εύρος σε μέγεθος από 80 βάσεις (εξόνιο 6) έως 2,120 βάσεις (εξόνιο 9) στα οποία παρεμβάλλονται 8 εσόνια (βλ. Εικόνα 4). Συγκεκριμένα, ανάμεσα στα εσόνια 1, 3, 8 και 4, ταυτοποιήθηκε μια σειρά διάσπαρτων επαναλαμβανόμενων στοιχείων, SINEs και LINEs. Η καταλυτική περιοχή της σιρτουΐνης η οποία διατηρείται σε όλες τις σιρτουΐνες των θηλαστικών, βρίσκεται ανάμεσα στα υπολείμματα των αμινοξέων 244 και 498, δηλαδή ανάμεσα στα εξόνια 3 και 8 της πρωτεΐνης (Susanne Voelter-Mahlknecht, 2006). Η πρωτεΐνη αν και βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου, σε ορισμένες περιπτώσεις, προκαλείται μετακίνησή της ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτοσόλιο (Tanno, Sakamoto, Miura, Shimamoto, & Horio, 2007). Η παρουσία της σχεδόν σε όλους τους ιστούς του οργανισμού την καθιστά απαραίτητη στην λειτουργία της ομοιόστασης (Nogueiras, Habegger, Chaudhary, & al, 2012).



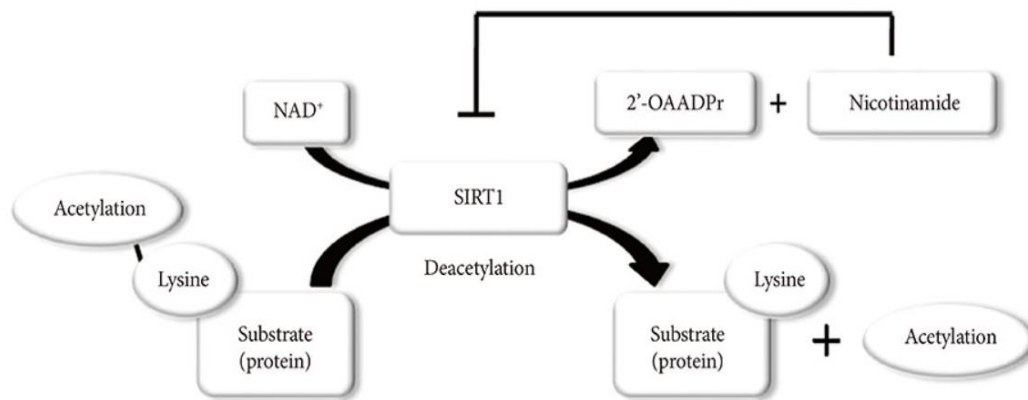
Εικόνα 3. Χρωμοσωμική απεικόνιση του γονιδίου της SIRT1 στο χρωμόσωμα 10.



Εικόνα 4. Γονιδιωματική οργάνωση του γονιδίου της SIRT1 σε μήκος 33,7 kB στην οποία απεικονίζονται οι σχετικές θέσεις των εξονίων και των εσονίων.

### 2.2.1 Λειτουργία της SIRT1 πρωτεΐνης

Η SIRT1 λειτουργεί όπως όλες οι αποακετυλάσες ιστονών 3<sup>ης</sup> τάξης συνδεδεμένη με  $\text{NAD}^+$  και ακετυλολυσίνη με τη βοήθεια πρωτεϊνικών παραγόντων, και παράγει λυσίνη, 2' - O- ακέτυλο - ADP - ριβόζη και νικοτιναμίδιο ως δευτερογενή ενζυμικά προϊόντα (βλ. Εικόνα 5), ενώ το νικοτιναμίδιο λειτουργεί ως ανασταλτικός παράγοντας δράσης της SIRT1 (Kitada & Koya, 2013). Έχει ποικιλία πρωτεϊνικών υποστρωμάτων και λειτουργεί μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος σε απόκριση συγκεκριμένων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Παρ' όλα αυτά, ανεξάρτητα από τη διαφορετικότητα των πρωτεϊνικών υποδοχέων, η δράση της SIRT1 ελέγχεται αυστηρά από τα κυτταρικά επίπεδα ενός εκ των υποστρωμάτων της, του  $\text{NAD}^+$  που αποτελεί απαραίτητο συνένζυμο όλων των ζωντανών κυττάρων. Στον μεταβολισμό, το  $\text{NAD}^+$  εμπλέκεται σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω των οποίων μπορεί να εναλλάσσεται από τη μορφή ως δέκτης ηλεκτρονίων  $\text{NAD}^+$  (οξειδωτική), στη μορφή ως δότης ηλεκτρονίων (αναγωγική)  $\text{NADH}$  και αντίστροφα (Houtkooper RH, 2010). Συνεπώς, τα  $\text{NAD}^+$  και  $\text{NADH}$  χρησιμοποιούνται σε μια σειρά μεταβολικών αντιδράσεων και το κυτταρικό επίπεδο του  $\text{NAD}^+$  είναι σημαντικός δείκτης της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου (Bordone & Guarente, 2005). Η έκφραση και δράση της πρωτεΐνης, επιπρόσθετα από τα κυτταρικά επίπεδα του  $\text{NAD}^+$ , ελέγχεται από ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο σε απόκριση διατροφικών, ορμονικών και περιβαλλοντικών σημάτων. Για το λόγο αυτό, η SIRT1 αποτελεί τον μοριακό σύνδεσμο ανάμεσα στην ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου και τις προσαρμοστικές μεταγραφικές αποκρίσεις. Συχνά αναφέρεται ως κύριος μεταβολικός ρυθμιστής εξαιτίας της ικανότητάς της να επηρεάζει διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες που συμμετέχουν στη μεταβολική ομοιόσταση (Xiaoling, 2013). Ο ρόλος της έχει επισημανθεί σε μονοπάτια που συνδέονται με ευαισθησία σε αλλαγές στη θρέψη και τη σηματοδότηση ινσουλίνης και αλλά και στη ρύθμιση αποκρίσεων στο στρες που καθορίζουν την κυτταρική επιβίωση, την απόπτωση και πολλαπλασιασμό (Yang T, 2006).



**Εικόνα 5.** Οι ενζυματικές δράσεις της SIRT1. Το NAD<sup>+</sup> καταναλώνεται ως υπόστρωμα για την αποκετυλίωση των πρωτεϊνών - στόχων. Τα υπολείμματα της ακετυλο-λυσίνης των πρωτεϊνών- στόχων λειτουργούν ως υπόστρωμα για την αποκετυλίωση της SIRT1.

### 2.2.2 Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ SIRT1

Η SIRT1 ρυθμίζει μια ευρεία γκάμα κυτταρικών λειτουργιών (βλ. Πίνακας 2) όπως μεταβολικά μονοπάτια που συνδέονται με τον μεταβολισμό γλυκόζης – λιπιδίων, της μιτοχονδριακής βιογένεσης, της φλεγμονής, αυτοφαγία, τους κιρκάδιους ρυθμούς και άλλους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την αντίσταση στο στρες (stress resistance), την απόπτωση και την καταστολή / αποσιώπηση ( silencing ) της χρωματίνης (Kitada M, 2013). Δρα σε πληθώρα μη ιστονικών πρωτεϊνών όπως μεταγραφικούς παράγοντες, μεταγραφικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες και ιστόνες. Συμμετέχει στον έλεγχο του μεταβολισμού μέσω ρύθμισης της ομοιόστασης της γλυκόζης και της ινσουλίνης αποκετυλιώνοντας πληθώρα στόχων. Ο PGC-1α είναι σημαντικός παράγοντας στη μιτοχονδριακή βιογένεση και λειτουργία και ρυθμίζεται από μια αντίδραση ακετυλίωσης / αποακετυλίωσης. Η SIRT1 διεγείρει τα γονίδια που σχετίζονται με τη μιτοχονδριακή οξειδωση λιπαρών οξέων μέσω του PGC-1α στο σκελετικό μυ και συνεπώς προωθεί την ευαισθησία στην ινσουλίνη (Gerhart-Hines Z, 2007). Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXO1 εμπλέκεται στον έλεγχο του μεταβολισμού γλυκόζης – λιπιδίων και την αντίσταση στο στρες. Η SIRT1 ρυθμίζει απευθείας την έκκριση αντιπνεκτίνης από τα λιποκύτταρα μέσω αποακετυλίωσης του FOXO1 που μπορεί να βελτιώσει σε συκώτι και μυς την ευαισθησία τους στην ινσουλίνη. Επιπροσθέτως, η SIRT1 ρυθμίζει συστατικά / συνιστώσες (components) του κιρκάδιου ρυθμού όπως το (BMAL1) και (PER2) και συγκεκριμένα ρυθμίζει το εύρος και τη διάρκεια της έκφρασης των γονιδίων του κιρκάδιου κύκλου μέσω

αποακετυλίωσης του PER2 ή/και BMAL1 (Asher G, 2008), (Nakahata Y, 2008). Επίσης, όσον αφορά τον συντονισμό του κirkάδιου κύκλου με τον μεταβολισμό, έρευνα έδειξε ότι η SIRT1 είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική κirkάδια αλλαγή της ευαισθησίας της ηπατικής ινσουλίνης και ρυθμίζει την ηπατική ινσουλινοευαισθησία που ρυθμίζεται από τους παράγοντες CLOCK/BMAL1 (Zhou, 2014). Επίσης, η πρωτεΐνη συνδέεται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων μέσω ενεργοποίησης πυρηνικών υποδοχέων όπως το PPAR- $\alpha$ , ηπατικός υποδοχέας X (LXR), farnesoid X receptor, και μέσω της αρνητικής ρύθμισης της (SREBP). Τέλος, αποακετυλιώνει μεταγραφικούς παράγοντες όπως το p53, την πολυ-ADP-ριβωσωμική πολυμεράση - 1, hypoxia inducive factors (HIFs) – 1 $\alpha$  και HIF-2 $\alpha$ , τον πυρηνικό παράγοντα (NF) –  $\kappa$ B, γονίδια σχετιζόμενα με την αυτοφαγία (Atg)5, Atg7 και ελαφριά αλύσου 3. Η πρωτεΐνη συνδέεται, αποκετυλιώνει και περιορίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του p53 μέσω αποακετυλίωσης των καρβοξυτελικών λυσινών (Lee & Gu, 2013) και τις λειτουργίες που ρυθμίζονται από το p53, μια επίδραση που αναστέλλεται από το νικοτιναμίδιο (βιταμίνη B3). Ο p53 είναι μείζονος σημασίας για την ινσουλινοαντοχή και το διαβήτη καθώς ελέγχει τον μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων ενώ είναι γνωστό ότι επιμηκύνει το χρόνο ζωής του κυττάρου και είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση και το γήρας (Strycharz, Drzewoski, Szemraj, & Sliwinska, 2017). Επιπλέον, η SIRT1 αποκετυλιώνει και καταστέλλει τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3A και μειώνει την απόπτωση που οφείλεται στην καταστροφή του DNA και το οξειδωτικό stress (Motta MC, 2004). Οι λειτουργίες αυτές ρυθμίζουν την αντίσταση στο στρες, την απόπτωση, την υποξία, τον έλεγχο της φλεγμονής και την αυτοφαγία ως φυσιολογική απόκριση σε περιβαλλοντική τοξικότητα. Το οξειδωτικό stress είναι αποδεδειγμένα παράγοντας που συμβάλλει στην ανάπτυξη και την πρόοδο της υπεργλυκαιμίας στον διαβήτη και τις επιπλοκές αυτού καθώς η νόσος αποτελεί συνθήκη αυξημένου οξειδωτικού stress.

**Πίνακας 2.** Βιολογικές λειτουργίες της SIRT1. Η SIRT1 συμμετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού γλυκόζης / λιπιδίων, μιτοχονδριακή βιογένεση, αυτοφαγία, φλεγμονή, κιρκάδιο ρυθμό, απόπτωση, αντίσταση στο stress και αποσιώπηση χρωματίνης. Πηγή: (Kitada M, 2013)

	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	ΣΤΟΧΟΙ
<b>ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ</b>	Μεταβολισμός γλυκόζης	PGC-1a, IRS2, PTP1B, UCP2, LKB1
	Μεταβολισμός λίπους	PGC-1a, PPAR-a, SREBP, LXR, FXR
	Μιτοχονδριακή βιογένεση	PGC-1a
	Αυτοφαγία	Atg5, Atg7, LC3, FOXOs,
	Φλεγμονή	NF-κB (p65)
	Κιρκάδιος ρυθμός	BMAL1, PER2
<b>ΑΛΛΑ</b>	Απόπτωση	FOXOs, p53, Smad7
	Αντίσταση στο stress	FOXOs, PARP1, HIF
	Αποσιώπηση χρωματίνης	H3K9, H3K14, H4K16, H1K26

### 2.2.2.1 Ο ρόλος της SIRT1 στην ενεργειακή ομοιόσταση

Η SIRT1 εμπλέκεται στην κυτταρική απόκριση κατά την αλλαγή της ενεργειακής κατάστασης μέσω ρύθμισης της δράσης πολλών ενζύμων αλλά και μεταγραφικών παραγόντων και συμπαραγόντων και η δραστηριότητα της ελέγχεται στενά από διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που μπορούν να αλλάξουν την κυτταρική διαθεσιμότητα του NAD<sup>+</sup>. Ειδικότερα, σε χαμηλής ενέργειας καταστάσεις όπου αυξάνονται τα κυτταρικά επίπεδα του NAD<sup>+</sup>, ενεργοποιείται η δραστηριότητα της SIRT1. Αντιθέτως, σε καταστάσεις αυξημένης ενέργειας όπως σε διατροφές αυξημένης θερμιδικής πρόσληψης ή σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις όπου μειώνονται τα επίπεδα του NAD<sup>+</sup> στο κύτταρο, μειώνεται η δραστηριότητα της SIRT1. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυξάνονται σε κατάσταση θερμιδικού περιορισμού ενώ παρατηρείται αρνητική ρύθμιση (down – regulation) στην παχυσαρκία και τον διαβήτη. Κατά τη διάρκεια της νηστείας ή σε θερμιδικό περιορισμό, η SIRT1 ενεργοποιείται και ρυθμίζει τον μεταβολισμό γλυκόζης / λιπιδίων διαμέσου της αποακετυλίωσης σε

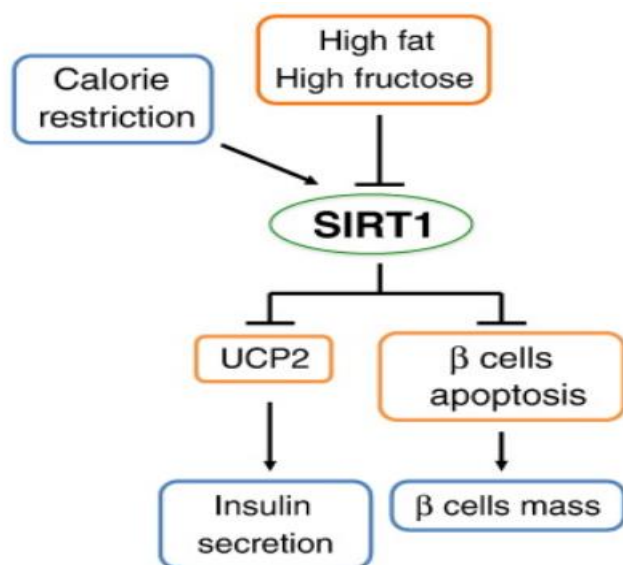
διάφορα υποστρώματα. Αναφέροντας κάποια από αυτά, εμπλέκεται σε ρυθμιστικά μονοπάτια με διαφορετικό τρόπο στους ιστούς, με θετική ρύθμιση στο συκώτι (αυξημένη παραγωγή γλυκόζης μέσω γλυκονεογένεσης) και τον λευκό λιπώδη ιστό (απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων) και αρνητική ρύθμιση στα παγκρεατικά β – κύτταρα (μικρότερη έκκριση ινσουλίνης) (Gomez-Cabrera MC, 2007).

#### **2.2.2.2 Ο ρόλος της SIRT1 στην έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας**

Τα παγκρεατικά β- κύτταρα είναι εξειδικευμένα ενδοκρινικά κύτταρα που λειτουργούν ως μεταβολικοί αισθητήρες που συνθέτουν και αποθηκεύουν την ινσουλίνη, και την απελευθερώνουν σε απόκριση της αύξησης των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Η καταστροφή των κυττάρων αυτών είναι η κύρια αιτία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και η δυσλειτουργία τους σε ένα βαθμό συμβάλλει στην παθογένεση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Η SIRT1 είναι παρούσα τόσο στον πυρήνα όσο και το κυτόπλασμα των β – κυττάρων και η έκφρασή της σε αυτά μπορεί να αυξηθεί σημαντικά ως απόκριση σε θερμιδικό περιορισμό και να μειωθεί σε δίαιτες υψηλές σε λίπος και φρουκτόζη (Y.R. Chen, 2013). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν την συσχέτιση της πρωτεΐνης με τη λειτουργία και την επιβίωση των β- κυττάρων. Επίσης, η SIRT1 αποτελεί θετικό ρυθμιστή της έκκρισης παγκρεατικής ινσουλίνης, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρόσληψη γλυκόζης και την χρήση αυτής ενώ η μείωση της πρωτεΐνης στα β – κύτταρα οδηγεί σε εξασθενημένη ανίχνευση της γλυκόζης και έκκρισης ινσουλίνης. Έρευνα σε ποντίκια έδειξε ότι αυξημένη δόση της SIRT1 σε παγκρεατικά β- κύτταρα βελτιώνει την ανοχή στη γλυκόζη και αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης σε απόκριση στη γλυκόζη ενώ η συστηματική διαγραφή (systemic deletion) της SIRT1 αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης που ενεργοποιείται από τη γλυκόζη (Xiaoling, 2013). Τα δεδομένα προτείνουν ότι η SIRT1 καταστέλλει την έκφραση της uncoupling protein – 2 (UCP2), μια μιτοχονδριακή, εσωτερικά της μεμβράνης, πρωτεΐνη η οποία ρυθμίζει αρνητικά την ενεργοποιούμενη από τη γλυκόζη έκκριση ινσουλίνης απελευθερώνοντας την οξειδωτική φωσφορυλίωση (βλ. Εικόνα 6). Επιπροσθέτως, η απόπτωση των β – κυττάρων στον διαβήτη τύπου 2 προκαλεί ελάττωση στην έκκριση ινσουλίνης. Μελέτες δείχνουν ότι η μείωση της SIRT1 μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση των β – κυττάρων, προτείνοντας έτσι ότι αυξάνοντας τα επίπεδα της πρωτεΐνης ή τη δραστηριότητα αυτής, μπορεί να



προληφθεί η μείωση της μάζας των β- κυττάρων. Συνεπώς, η SIRT1 είναι προστατευτικός παράγοντας για τα β – κύτταρα και μείωση της έκφρασης ή της δραστηριότητας αυτής, μπορεί να συμβάλλει σε μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Yue Cao, 2016). Μια επιπρόσθετη επίδραση της SIRT1 στη ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης είναι μέσω της αναστολής του NF-κβ αποκετυλιώνοντας το p65, προστατεύοντας έτσι τα β-κύτταρα από κυτοκίνες. Συμπερασματικά, όσον αφορά την ομοίωση της γλυκόζης εν μέρει από τα β-παγκρεατικά κύτταρα, η SIRT1 έχει προταθεί ότι λειτουργεί ως κύριος «διακόπτης» των λειτουργιών των β- κυττάρων στη ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης και της δραστηριότητας μεταγραφικών παραγόντων και συμπαραγόντων οι οποίοι εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στα β – κύτταρα (Leibiger IB, 2005). Για το λόγο αυτό, SIRT1 θεωρείται σημαντικό υποψήφιο γονίδιο που σχετίζεται σημαντικά με τον μεταβολισμό της γλυκόζης και θα πρέπει να διερευνηθεί η συσχέτισή του με πιθανή ευαισθησία για εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.



**Εικόνα 6.** Η ενεργοποίηση της SIRT1 αναστέλλει την απόπτωση των β-κυττάρων οδηγώντας στη διατήρηση της μάζας τους. Επίσης, αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης αναστέλλοντας τη δράση της UCP2 Πηγή: (Yue Cao, 2016)

### 2.2.2.3 Ο ρόλος της SIRT1 στον διαβήτη κύησης

Ο διαβήτης κύησης χαρακτηρίζεται από δυσανοχή στους υδατάνθρακες και αποτελεί ένα από τους πιο κοινές επιπλοκές στη διάρκεια της εγκυμοσύνης επηρεάζοντας σε ποσοστό από 3% έως 17% όλων των εγκυμοσυνών ανάλογα τον πληθυσμό που μελετάται και τα διαγνωστικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται (Couston, Lowe, Metzger, & Dyer, 2010). Η παρουσία του συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο δυσμενών μητρικών και περιγεννητικών επιπτώσεων όπως πρόωρο τοκετό, προεκλαμψία και σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (Forsbach-Sánchez, Tamez-Peréz, & Vazquez-Lara, 2005). Επιπροσθέτως, οι ασθενείς με διαβήτη κύησης είναι πιο επιρρεπείς να εμφανίσουν διαβήτη τύπου 2 και καρδιαγγειακές παθήσεις συγκριτικά με μη διαβητικές εγκύους (Shah, Retnakaran, & Booth, 2008) ενώ και τα νεογνά έχουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης παχυσαρκίας, μεταβολικού συνδρόμου και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 στην παιδική ηλικία και την εφηβεία (Bellamy, Casas, Hingorani, & Williams, 2009). Μολονότι δεν υπάρχει ομοφωνία ως προς την παθοφυσιολογία του διαβήτη κύησης, ο διαφοροποιημένος μεταβολισμός των λιπιδίων, το αυξημένο οξειδωτικό stress και η προ – φλεγμονώδης κατάσταση είναι σημαντικοί παράγοντες επίδρασης. Αν και η SIRT1 αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο για τους βιολογικούς της ρόλους στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, πολλά πρέπει να διερευνηθούν σχετικά με τις παθοφυσιολογικές επιπτώσεις από τις αλλαγές που παρατηρούνται στον διαβήτη κύησης και εξαρτώνται από την πρωτεΐνη (Katarzyna Mac-Marcjanek, 2018). Μέχρι σήμερα δεν έχουν γίνει συστηματικές μελέτες σχετικά με την έκφραση της πρωτεΐνης στον διαβήτη κύησης αν και δεδομένα δείχνουν αλλαγές στα επίπεδα σιρτουΐνης που σχετίζονται με τη νόσο. Συγκεκριμένα, ο διαβήτης κύησης και in vitro υπεργλυκαιμία έδειξαν ότι μείωσαν την παραγωγή SIRT1 σε εμβρυϊκά ενδοθηλιακά κύτταρα και ανθρώπινα ομφαλικά φλεβικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Gui, και συν., 2016). Από την άλλη μεριά, πρόσφατη μελέτη έδειξε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης μια μέρα μετά τον τοκετό σε γυναίκες με διαβήτη κύησης ως αποτέλεσμα της έκθεσής τους στη υπεργλυκαιμία κατά τη διάρκεια της κύησης (Sultan, Alzahrani, & Al-Sakkaf, 2018).

#### 2.2.2.4. Ο ρόλος της SIRT1 στην προεκλαμψία

Η προεκλαμψία είναι ένα πολυπαραγοντικό σύνδρομο που εμφανίζεται στις εγκύους και χαρακτηρίζεται από εμφάνιση υπέρτασης μετά την 20<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης και συνδυάζεται με πρωτεϊνουρία ή άλλη ενδο-οργανική βλάβη. Ορίζεται ως η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας για τη μητέρα και το έμβρυο επηρεάζοντας το 3-8% των εγκυμοσυνών παγκοσμίως (Z. Armaly, 2018). Οι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν το οικογενειακό ιστορικό, την ηλικία της μητέρας, ήδη υπάρχουσα υπέρταση, κάπνισμα, αριθμός εγκυμοσυνών, διαβήτη και παχυσαρκία. Αν και έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την κατανόηση των ακριβών παθολογικών μηχανισμών της κατάστασης, η πολυπλοκότητα αυτής της διαταραχής παρεμποδίζει την ανακάλυψη συγκεκριμένων βιολογικών διαδικασιών που σχετίζονται με την ασθένεια και μέχρι στιγμής η ακριβής αιτία και θεραπεία δεν έχουν ανακαλυφθεί. Η μη ισορροπία στο οξειδωτικό στρες, μια ασυμμετρία ανάμεσα στα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS και το αντιοξειδωτικό σύστημα, ορίζεται ως ένας από τους κύριους συμμετέχοντες στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας και οδηγεί σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που συνδέεται με μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα μονοξειδίου του αζώτου (NO). Η SIRT1 έχει κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες στο αγγειακό ενδοθήλιο μέσω του αχανούς δικτύου των αλληλεπιδράσεων των αποκετυλίωσεων, επιπρόσθετα με αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του NO μέσω της ενεργοποίησης της συνθάσης του ενδοθηλιακού νιτρικού οξειδίου (eNOS) (W. Zhang, 2017). Ανάμεσα στις έρευνες που έχουν αξιολογήσει τα επίπεδα SIRT1 στην προεκλαμψία, μία έρευνα έδειξε ότι η πρωτεΐνη μειώνεται στους τροφοβλάστες το τελευταίο τρίμηνο (A. J. Broady, 2017), ενώ δεύτερη μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του mRNA της SIRT1 είναι μειωμένη σε πλακούντες γυναικών με προεκλαμψία συγκριτικά με υγιείς εγκύους (D. Poidatz, 2015). Τέλος, η έρευνα των Viana-Mattioli et al. έδειξε ότι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι μειωμένη στο πλάσμα εγκύων με προεκλαμψία συγκριτικά με υγιείς εγκύους και εγκύους με υπέρταση κύησης και προτείνει ότι η μείωση της SIRT1 στις 20-25 εβδομάδες κύησης δείχνουν πιθανή εμφάνιση προεκλαμψίας, αναδεικνύοντας την πρωτεΐνη ως πιθανό βιοδείκτη της παθολογίας της νόσου (Sarah Viana-Mattioli, 2020).

### 2.2.3. Η SIRT1 ως θεραπευτικός στόχος

Η SIRT1 μπορεί να συμμετάσχει στον έλεγχο της ομοιόστασης της γλυκόζης μέσω των παρακάτω μηχανισμών: ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης και προστασία των παγκρεατικών β-κυττάρων, βελτίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη μέσω της ρύθμισης του post insulin υποδοχέα signaling, μείωση της φλεγμονής, κινητοποίηση του λίπους και έκκριση αντιπονεκτίνης, έλεγχο της οξείδωσης λιπαρών οξέων και της μιτοχονδριακή βιογένεση και ρύθμιση της παραγωγής ηπατικής γλυκόζης και των κικαδίων ρυθμών, του σκελετικού μυ, του λιπώδους ιστού, των μακροφάγων και του ήπατος. Για τους λόγους αυτούς, το SIRT1 είναι ένας πολλά υποσχόμενος φαρμακευτικός στόχος για την θεραπεία της ινσουλινοαντίστασης και του συνεπαγόμενου σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Η χρήση των SIRT1 αγωνιστών για την διέγερση της δράσης της πρωτεΐνης είναι η μια καινοτόμα θεραπευτική προσέγγιση για τις επιπλοκές του σακχαρώδη διαβήτη. Αν και στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί οι επιδράσεις των διαφόρων SIRT1 αγωνιστών στις επιπλοκές της νόσου, η εξειδίκευσή τους αποτελεί πεδίο ανησυχίας και χρειάζεται περαιτέρω εξέταση συγκεκριμένων SIRT1 αγωνιστών φέρνοντάς τους πιο κοντά σε κλινική εφαρμογή (Jie Wang, 2021).

### 2.3. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΗΣ SIRT1 ΣΤΟΝ ΔΙΑΒΗΤΗ

Πληθώρα δεδομένων υποδεικνύουν τη συσχέτιση ανάμεσα στις αλλαγές της έκφρασης της SIRT1 και τον σακχαρώδη διαβήτη και υπάρχουν αρκετοί γενετικοί πολυμορφισμοί της πρωτεΐνης που συνδέονται με τη νόσο. Έρευνα πρότεινε ότι οι πολυμορφισμοί rs1059291 και rs7896005 συνδέονται με τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 μέσω της μειωμένης οξείας απόκρισης της ινσουλίνης. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα άτομα με φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη που έφεραν το επικίνδυνο T αλληλόμορφο του rs1059291 και το G αλληλόμορφο του rs7896005 εμφάνισαν μειωμένη οξεία απόκριση στην ινσουλίνη (Yan Dong, 2011). Επιπροσθέτως, τα παιδιά που έχουν γεννηθεί από μητέρες που έχουν εκτεθεί στην πείνα και φέρουν τους μειωμένης συχνότητας γονότυπους της SIRT1 (GG και AG για τον πολυμορφισμό rs7895833 και AA και GA για τον rs1467568) έχουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 στην ενήλικη ζωή τους ενώ το BMI

τους αυξάνεται. Ένας άλλος πολυμορφισμός του γονιδίου, η TT παραλλαγή του rs12778366 είναι επικρατής γονότυπος σε Βόρειους Ινδούς και επικεφαλής της έκφρασης των πολυμορφισμών των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Επιπροσθέτως, οι πολυμορφισμοί rs7895833 A/G, rs706912 C/G και rs2273773 C/T φαίνεται να είναι συχνοί παράγοντες παθογένεσης του διαβήτη και της υπέρτασης. Ο ρόλος κλειδί που έχει η έκφραση της SIRT1 στις λειτουργίες των β – παγκρεατικών κυττάρων είναι η αιτία για περαιτέρω αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης της περιοχής του εκκινητή της πρωτεΐνης. Η SIRT1 έχει τη δυνατότητα να λειτουργεί ως thrifty gene, δηλαδή ως γονίδιο με προδιάθεση στο διαβήτη σε ασιατικούς πληθυσμούς, κυρίως Ινδούς, όπου παρατηρούνται λιγότερες περιπτώσεις παχυσαρκίας αλλά μεγαλύτερος επιπολασμός σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 σε μικρότερες ηλικίες (Yoon KH, 2006), πιθανόν λόγω της σαφούς δυσλειτουργίας στην έκκριση ινσουλίνης σε σχέση με την ινσουλινοαντοχή. Δύο λειτουργικοί πολυμορφισμοί, οι rs12778366 T/C και rs3758391 C/T, βρίσκονται στην περιοχή του εκκινητή του γονιδίου της SIRT1 με ελάχισσα συχνότητα εμφάνισης αλληλόμορφου μεταξύ 0,097 και 0,5 για το rs12778366 T/C, και μεταξύ 0,146 και 0,494 για το rs3758391 C/T (Sherry ST, 1999). Τα τελευταία χρόνια οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί έχουν αποτελέσει πεδίο έρευνας όσον αφορά την πιθανή συσχέτισή τους με εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη και επιπλοκών της νόσου και έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές οι οποίες μελετούν τη συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων γονοτύπων στους πληθυσμούς καθώς και τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης σε υγιείς και σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη λαμβάνοντας υπόψιν διαφόρους παραμέτρους. Στον παρακάτω πίνακα (βλ. Πίνακας 3) αποτυπώνονται οι συχνότερες εμφάνισης των αλληλόμορφων των δύο πολυμορφισμών σύμφωνα με το ALFA Project που παρέχει στο σύνολο των διαφορετικών πληθυσμών τις συχνότερες εμφάνισης των αλληλόμορφων.

**Πίνακας 3.** συχνότητα εμφάνισης αλληλόμορφων στους πολυμορφισμούς rs12778366 και rs3758391. Πηγή: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)

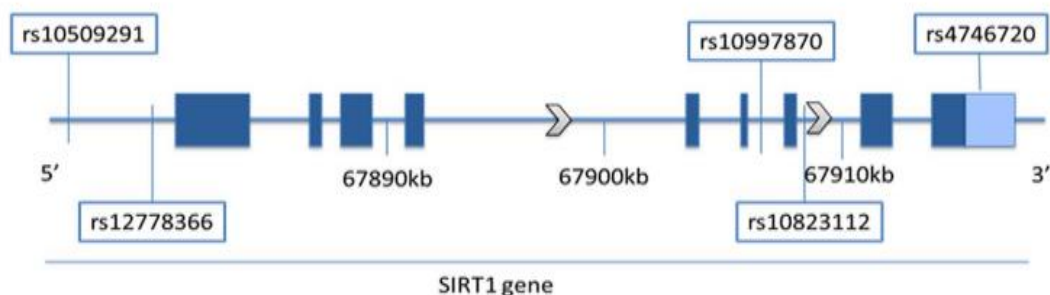
	<b>Sample size</b>	<b>T allele</b>	<b>C allele</b>
<b>rs12778366</b>	99900	0.88720	0.11280
<b>rs3758391</b>	170618	0.337526	0.662474

Εν συνεχεία, συνοψίζονται επιγραμματικά έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για τους προαναφερόμενους πολυμορφισμούς καθώς και τα αποτελέσματα αυτών.

### 2.3.1. Ο πολυμορφισμός rs12778366

Έρευνα των Rai et al που διεξήχθη σε υγιή άτομα και ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, μελέτησε τον πολυμορφισμό rs12778366 που βρίσκεται στην περιοχή του εκκινητή της SIRT1 (βλ. Εικόνα 7 και Εικόνα 8). Η μελέτη πρότεινε ότι ο γονότυπος TT που είναι ο υψηλότερης συχνότητας έκφρασης (high – expressing) γονότυπος στον πολυμορφισμό και παρουσιάζεται στο 80% του πληθυσμού των Βόρειων Ινδών, υπερίσχυσε κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Η υπερίσχυση του γονότυπου TT ευνόησε περαιτέρω χαμηλά επίπεδα έκκρισης ινσουλίνης των β – κυττάρων του παγκρέατος υπό συνθήκες πείνας προκειμένου να εκτραπεί η παροχή ενέργειας περισσότερο σε ινσουλινο-ανεξάρτητους ιστούς (εγκέφαλος, ερυθρά κύτταρα) και λιγότερο σε ινσουλινο-εξαρτώμενους ιστούς (σκελετικό μυ, ήπαρ, λιποκύτταρα και γαστρική κοιλότητα) ή για να καταστεί περισσότερη γλυκόζη διαθέσιμη στον εγκέφαλο ως μια εξελικτική προσαρμογή που προήλθε από αλλαγή στον τρόπο ζωής σε πιο καθιστική. Παρ’ όλα αυτά, η φυσική επιλογή του γονότυπου TT που έγινε σε συνθήκες πείνας, πλέον αποτελεί λόγω ανησυχίας καθώς σε συνθήκες ad libitum, τα β παγκρεατικά κύτταρα παράγουν περισσότερη ινσουλίνη και προκαλούν έναν φαύλο κύκλο υπερινσουλιναϊμίας και υπεργλυκαιμίας σε ένα μη επαρκές παγκρεατικό σύστημα (Ekta Rai, 2012). Η ανάλυση δεν έδειξε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τον σακχαρώδη διαβήτη στον εξεταζόμενο πληθυσμό, Παρ’ όλα αυτά ο συνδυασμός των υψηλού κινδύνου γονότυπων των γονιδίων mt-ND3, PGC1a και UCP2-866 συγκρινόμενα με τους αντίστοιχους προστατευτικούς γονότυπους, κάτω από το κοινό υπόβαθρο του γονότυπου TT του πολυμορφισμού rs12778366 έδειξε επιπρόσθετο

υψηλό κίνδυνο (OR = 6.68,  $p = 6.5 \cdot 10^{-11}$ ) (Ekta Rai, 2012). Σε έρευνα των Figarska et al., τα άτομα που έφεραν το υπολειπόμενο αλληλόμορφο C, είχαν μειωμένο κίνδυνο θνητότητας συγκριτικά με όσους έφεραν τον επικρατή γονότυπο ( $p = 0.025$ ) και καλύτερη ανοχή στη γλυκόζη ( $p = 0.03$ ). Βάσει των δεδομένων αυτών, η μελέτη προτείνει ότι η SIRT1 πιθανόν επιδρά στη μακροζωία μέσω του μονοπατιού της ομοιόστασης της γλυκόζης και ότι ο πολυμορφισμός rs12778366 μπορεί να οδηγεί σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης κυρίως λόγω της τοποθέτησής του σε θέση πρόσδεσης παράγοντα μεταγραφής (TFBS) (Sylwia M. Figarska, 2013). Η έρευνα των Sadeghi et al, παρατήρησε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό rs12778366 και τον κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Ειδικότερα, για αυτόν τον πολυμορφισμό, ο γονότυπος TC ήταν πιο συνήθης σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη συγκριτικά με τους υγιείς. Επίσης, το C αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs12778366 παρέχει 1,5 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 ( $p$ -value = 0.004) (Mohammad Bagher Sadeghi, 2020). Σε έρευνα των Han et al που έγινε σε πληθυσμό Κινέζων, μελετήθηκε μεταξύ άλλων ο πολυμορφισμός rs12778366, παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων και την κατανομή γονοτύπων στις ομάδες ελέγχου και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 χωρίς όμως να παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό και την εμφάνιση της νόσου. (Junfeng Han, 2015). Μια άλλη έρευνα που διεξήχθη σε πληθυσμό Κινέζων (Peng, 2018), μελέτησε τον πολυμορφισμό σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, ασθενείς με διαβητικό πόδι και υγιή άτομα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων του πολυμορφισμού ανάμεσα στις ομάδες που μελετήθηκαν και οι γονότυποι του rs12778366 δεν σχετίζονται με ευαισθησία στην εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη και διαβητικού ποδιού. Οι φορείς του C αλληλόμορφου σε σύγκριση με το T αλληλόμορφο του πολυμορφισμού, εμφάνισαν μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης διαβητικού ποδιού σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό της έρευνας.



**Εικόνα 7.** Θέση πολυμορφισμού rs12778366 στο γονίδιο της SIRT1. Πηγή: (Junfeng Han, 2015)



**Εικόνα 8.** Η αλληλουχία του rs12778366 πολυμορφισμού και η θέση αντικατάστασης των βάσεων T/C. Πηγή: (Mohammad Bagher Sadeghi, 2020)

### 2.3.2. Ο πολυμορφισμός rs3758391

Ο rs3758391 μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός του εκκινητή του γονιδίου της SIRT1 εδράζεται στο σημείο πρόσδεσης του p-53 (βλ. *Εικόνα 9*). Το C αλληλόμορφο του πολυμορφισμού διαρρηγνύει την αλληλουχία πρόσδεσης του p-53 και επηρεάζει την έκφραση της SIRT1 in vitro γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανόν να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη παθοφυσιολογία (Naqvi A, 2010).



**Εικόνα 9.** Αλληλουχία του rs3758391 πολυμορφισμού του εκκινητή της ανθρώπινης SIRT1 και η θέση πρόσδεσης του p-53. Πηγή: (Yutian Kan, 2018).



Σε έρευνα των Cruz et al, ανάμεσα στους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν ήταν και ο rs3758391 σε δείγμα ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη και υγιών ανθρώπων. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν σημαντική επίδραση του πολυμορφισμού της SIRT1 (T αλληλόμορφο OR: 1,32 p-value 0.031) προτείνοντας ότι ο πολυμορφισμός ο οποίος εδράζεται στην περιοχή του εκκινητή του γονιδίου μπορεί να τροποποιήσει τη λειτουργία της πρωτεΐνης ως ρυθμιστής της γλυκονεογένεσης και της έκκρισης ινσουλίνης (Cruz, 2010). Παρόμοια, σε έρευνα των Faradonbeh et al η κατανομή των γονοτύπων και η συχνότητα των αλληλόμορφων ήταν διαφορετική ανάμεσα στην ομάδα των διαβητικών και τα υγιή άτομα. Η συχνότητα του αλληλόμορφου T στην ομάδα των διαβητικών ήταν σημαντικά υψηλότερη από την ομάδα ελέγχου αλλά συγκριτικά με άλλους πληθυσμούς η συχνότητα εμφάνισης του T αλληλόμορφου ήταν χαμηλότερη τόσο στην ομάδα των διαβητικών όσο και στην ομάδα ελέγχου του δείγματος (Ramin Tavakoli Faradonbeh, 2020). Για τον ίδιο πολυμορφισμό, έρευνα των Ramirez et al, έδειξε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης επηρεάζεται από τον γονότυπο· ειδικότερα, τα ομόζυγα για το T αλληλόμορφο άτομα είχαν υψηλότερη έκφραση συγκριτικά με τους ετερόζυγους και τους ομόζυγους για το C αλληλόμορφο κατά  $1,8 \pm 0,6$  φορές (p – value =0.006). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη τους που χρησιμοποιήθηκε δείγμα παιδιών και παρουσιάστηκε παρόμοια τάση. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι ο πληθυσμός που φέρει τον γονότυπο TT εμφανίζει μεγαλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης επισημαίνοντας ωστόσο ότι ο πολυμορφισμός δεν εδράζεται σε ρυθμιστικό σημείο πρόσδεσης πρωτεϊνών. (Ramírez, Hernández, & al., 2020). Για τον πολυμορφισμό rs3758391 C/T, προηγούμενα δεδομένα έχουν δείξει ότι το C αλληλόμορφο κόβει τη σύνδεση του p-53 στην περιοχή του εκκινητή της SIRT1 επηρεάζοντας την ενεργοποίηση της σε διατροφικό stress αλλά δεν προκύπτουν διαφοροποιήσεις στην έκφραση χωρίς την ύπαρξη διατροφικού stress (Naqvi, 2010). Η μελέτη των Sadeghi et al όσον αφορά τον ίδιο πολυμορφισμό έδειξε ότι ο γονότυπος CT vs CC (OR = 0.54) και CT + TT vs CC (OR = 0.68) σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 ενώ η ύπαρξη του T αλληλόμορφου δεν σχετίζεται με ευαισθησία στην εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη (Mohammad Bagher Sadeghi, 2020). Η έρευνα των Peng et al, δεν βρήκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό και την ευαισθησία στην εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη και διαβητικού ποδιού (Peng, 2018).

Συνεπώς, οι πολυμορφισμοί της SIRT1, η οποία θεωρείται υποψήφιο γονίδιο που μπορεί να επιδράσει με ουσιώδη τρόπο στον μεταβολισμό της γλυκόζης, είναι απαραίτητο να διερευνηθούν περαιτέρω και σε άλλους πληθυσμούς. Στην παρούσα μελέτη, ο σκοπός είναι η μελέτη της συχνότητας εμφάνισης των δύο λειτουργικών πολυμορφισμών rs12778366 T/C και rs3758391 C/T σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη και σε άτομα που δεν εμφανίζουν τη νόσο και η εξέταση πιθανών συσχετισμών ανάμεσα στους γονότυπους και την εμφάνιση της ασθένειας.

## Κεφάλαιο 3: Υλικά & Μέθοδοι

### 3.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στη μελέτη έλαβαν μέρος έγκυες γυναίκες με θέματα υγείας όπως διαβήτη κύησης, προεκλαμψία, προϋπάρχοντα σακχαρώδη διαβήτη και χωρίς κάποια πάθηση αλλά και ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και χωρίς την πάθηση. Τα χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά πληθυσμού μελέτης.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΥΓΕΙΑΣ	Αριθμός (n)
ΕΓΚΥΜΟΝΟΥΣΕΣ	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2	7
	Σακχαρώδης διαβήτης κύησης	12
	Προεκλαμψία	4
	Χωρίς πάθηση	9
ΑΣΘΕΝΕΙΣ	Με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2	15
	Χωρίς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2	2
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>		<b>49</b>

Για τη διάγνωση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια που έχει θεσπίσει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. και λαμβάνουν υπόψιν τις τιμές γλυκόζης πλάσματος και της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) .

**Πίνακας 5.** Κριτήρια διάγνωσης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

ΜΕΤΡΗΣΗ	ΟΡΙΟ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ
Γλυκόζη πλάσματος νηστείας ( 8-14h)	≥ 126 mg/dl (≥7.0 mmol/L)
Γλυκόζη πλάσματος 2 ώρες μετά τη χορήγηση 75 gr γλυκόζης	≥ 200 mg/dl (≥11.1 mmol/L)
Τυχαία γλυκόζη πλάσματος	≥ 200 mg/dl (≥11.1 mmol/L)
HbA1c	≥ 6.5% (≥48 mmol/mol)

Όσον αφορά τη διάγνωση του διαβήτη κύησης, στον παρακάτω πίνακα (βλ. Πίνακας 6) παρουσιάζονται τα κριτήρια διάγνωσης όπως αυτά θεσπίστηκαν από τον WHO το 2013.

**Πίνακας 6.** Διαγνωστικά κριτήρια σακχαρώδη διαβήτη κύησης (WHO, 2013)

ΜΕΤΡΗΣΗ	ΟΡΙΟ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ
Γλυκόζη πλάσματος νηστείας	92-126 mg/dl (5,1-6,9 mmol/L)
Γλυκόζη πλάσματος 1 ώρα μετά τη χορήγηση 75 gr γλυκόζης	≥ 180 mg/dl (≥10.0 mmol/L)
Γλυκόζη πλάσματος 2 ώρες μετά τη χορήγηση 75 gr γλυκόζης	153-199 mg/dl (≥8,5-11,0 mmol/L)

### 3.2 ΥΛΙΚΑ

Το γενωμικό DNA όσον αφορά τις εγκυμονούσες, απομονώθηκε από σκελετικό μυ ενώ όσον αφορά τους υπόλοιπους συμμετέχοντες (ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη και χωρίς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2) η απομόνωση του γενετικού υλικού έγινε από ολικό αίμα. Για το DNA του σκελετικού μυ, προηγήθηκε η προσθήκη 200 μL pre-treatment lysis σε κάθε δείγμα, ακολούθησε παραμονή των δειγμάτων στους 90°C για 10 λεπτά. Η απομόνωση έγινε με τη χρήση kit αυτοματοποιημένης απομόνωσης DNA ZymBio στο αυτοματοποιημένο σύστημα απομόνωσης DNA (βλ. Εικόνα 10) η οποία βασίζεται στη μέθοδο των μαγνητικών nano ή micro σωματιδίων που παρέχει

πιο γρήγορη, αποτελεσματική απομόνωση DNA συγκριτικά με την και πιο ασφαλή καθώς περιορίζεται στο ελάχιστο ο κίνδυνος επιμόλυνσης.



*Εικόνα 10. kit (αριστερά) και σύστημα αυτοματοποιημένης απομόνωσης DNA (δεξιά).*

Στα πηγαδάκια του αυτοματοποιημένου kit προστέθηκαν 15  $\mu\text{L}$  πρωτεΐνης K και 200  $\mu\text{L}$  του κάθε δείγματος (σκελετικός μυς ή ολικό αίμα). Κατά την απομόνωση του γενετικού υλικού, το σύστημα απομόνωσης χρησιμοποιεί τον μαγνήτη στην καμπίνα του πειράματος προκειμένου να μεταφέρει τα μαγνητικά σωματίδια που προσροφώνται με τα νουκλεϊκά οξέα σε διαφορετικά πηγαδάκια αντιδραστηρίων, αναδεύει το υγρό περιεχόμενο γρήγορα και επαναλαμβανόμενα χρησιμοποιώντας την άκρη της μαγνητικής ράβδου ώστε να αναμειχθούν τελικώς τα μαγνητικά σωματίδια με το υγρό. Μετά τη λύση, την προσρόφηση σε νουκλεϊκά οξέα, τη μεταφορά των μαγνητικών σωματιδίων, την πλύση και έκλουση, αποκτάται καθαρό γενετικό υλικό το οποίο θα χρησιμοποιηθεί σε επόμενο στάδιο στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). (Εικόνα 11Εικόνα 11).



*Εικόνα 11. Λειτουργία αυτοματοποιημένης απομόνωσης DNA.*

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά μέσω της μέτρησης απορρόφησης του υπεριώδους φωτός από τις βάσεις των πυρινηκών οξέων. Η ένδειξη στα 260 nm επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας του γενετικού υλικού. Μια ακόμη ένδειξη που λαμβάνεται στα 280 nm μας δίνει τη δυνατότητα ελέγχου της καθαρότητας του γενετικού υλικού. Ειδικότερα, ο λόγος απορρόφησης OD260/OD280 θα πρέπει να κυμαίνεται από 1,8-2,0 ώστε το παρασκεύασμα να θεωρηθεί καθαρό. Όλα τα δείγματα DNA που επιλέχθηκαν για να μελετηθούν πληρούσαν την προϋπόθεση της καθαρότητας με αποδεκτές τιμές από 1,8-2,0. Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιασμός των γονοτύπων των πολυμορφισμών του γονιδίου SIRT1 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η μέθοδος αυτή παράγει πολλαπλά αντίγραφα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας βάσεων DNA χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές για να κατευθύνει το θερμικό πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας – στόχου μέσω επανειλημμένων κύκλων αποδιάταξης, υβριδισμού με εκκινητές και επιμήκυνσης. Τα στάδια PCR που εφαρμόστηκαν ήταν τα ακόλουθα: 1<sup>ο</sup> στάδιο) αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA – στόχου με επώαση του στους 95°C ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δύο πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων και να ληφθούν 2 μονόκλιωνα εκμαγεία DNA που θα αποτελέσουν τη μήτρα για τη σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλυσίδων, 2<sup>ο</sup> στάδιο) προσαρμογή εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του αρχικού DNA με υβριδισμό και εφαρμογή θερμοκρασιών κοντά στη θερμοκρασία τήξης του εκκινητή ( 55°C για τον rs12778366 και 55°C για τον rs3758391), 3<sup>ο</sup> στάδιο) σύνθεση αντιγράφων DNA όπου σε θερμοκρασία 72°C το τμήμα του DNA μεταξύ των εκκινητών συντίθεται με βάση τη συμπληρωματική αλληλουχία του υποστρώματος από την Taq πολυμεράση. Τα 3 αυτά στάδια αποτελούν έναν θερμικό κύκλο ο οποίος εκτελείται 40 φορές. Κάθε εκκινητής χρησιμοποιείται για την επιλογή του τμήματος του DNA-στόχου που θα πολλαπλασιαστεί μεταξύ των αφετηριών που αποτελούν και τα άκρα του, διαθέτοντας αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς εκείνη που βρίσκεται στο 3'-OH άκρο των δυο αντιπαράλληλων αλυσίδων του DNA-προτύπου (Χαρβάλου, 2020). Για τον πολυμορφισμό rs12778366 χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές: forward primer 5'-TAAGGCTTAGGACTGGAGATGA-3' (STR1) και reverse primer 5'-GTCCCTAAGCCTAGTATGGGTTC-3' (STR2) και για τον πολυμορφισμό rs3758391

χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές: forward primer 5'-GTCACGCAGGTAATTGATGCAG-3' (STR3) και reverse primer 5'-GGCTTAGTGGAAGCCCTTC-3' (STR4). Οι αρχικές συγκεντρώσεις των εκκινητών ήταν 100μM έπειτα από προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας νερού όπως όριζε το αντίστοιχο πρωτόκολλο. Η ποσότητα νερού που προστέθηκε στον κάθε εκκινητή για να προκύψει αρχική συγκέντρωση 100μM παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (βλ. Πίνακας 7)

**Πίνακας 7.** Ποσότητα νερού που προστέθηκε σε κάθε εκκινητή για να επιτευχθεί αρχική συγκέντρωση 100Μμ.

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	Ποσότητα νερού που προστέθηκε ( μL)
STR1	229
STR2	347
STR3	306
STR4	302

Οι τελικές συγκεντρώσεις των εκκινητών ήταν 10μM και προέκυψαν από αραίωση των εκκινητών με αρχική συγκέντρωση 100μM (προσθήκη 90 μL νερού σε 10 μL εκκινητή αρχικής συγκέντρωσης 100μM). Η ειδικότητα της αντίδρασης PCR οφείλεται στην ακρίβεια της σύνδεσης των αφετηριών ολιγονουκλεοτιδίων στις πλευρικές αλυσίδες εκατέρωθεν του DNA-στόχου και στην κατάλληλη αναλογία συγκεντρώσεων εκκινητών/ DNA-στόχου. Όταν έχουμε μικρή συγκέντρωση εκκινητών, τότε μόρια DNA μένουν με ακάλυπτες θέσεις υβριδισμού ή σε περίπτωση περίσσειας εκκινητών παρατηρείται πρόσδεση σε μη ειδικές θέσεις. Συμπερασματικά, οι εκκινητές αντιπροσωπεύουν τις περιοχές έναρξης της σύνθεσης πολλαπλών αντιγράφων DNA, καθορίζοντας τα άκρα του τμήματος των αντιγράφων. Για το κάθε δείγμα, η PCR αντίδραση προετοιμάστηκε σε όγκο 50 μL που περιείχε 10 μL DNA του δείγματος και 40 μL του συνόλου των υπόλοιπων αντιδραστηρίων της PCR, δηλαδή 1 μL από τον κάθε εκκινητή, 13 μL απιονισμένου νερού και 25 μL mix αντιδραστηρίου όπως φαίνεται στον Πίνακας 8. Το mix αντιδραστήριο περιλαμβάνει DNA πολυμεράση, με τη μορφή θερμοανθεκτικού ενζύμου της πολυμεράσης του θερμοφίλου βακτηριδίου *Thermus Aquaticus* (TaqPolymerase) με ιδανική θερμοκρασία δράσης στους 72°C, τριφωσφορικάδεοξυριβονουλεοτίδια (dNTPs) που λειτουργούν ως δομικό υπόστρωμα της αντίδρασης και ρυθμιστικό διάλυμα

(Solutionbuffer) συγκεκριμένου pH, το οποίο χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση της δραστηριότητας και τη σταθερότητα της DNA πολυμεράσης, υποβοηθώντας έτσι την πολλαπλή αντιγραφή. Σε κάθε ανάλυση της PCR, σε δύο eppendorf tubes, ένα στην αρχή και ένα στο τέλος, αντί για την προσθήκη DNA προστίθεται ίδια ποσότητα νερού λειτουργώντας έτσι σαν αρνητικά controls (N1, N2) για την αποφυγή πιθανής επιμόλυνσης που δύναται να γίνει στην αρχή ή κατά το πέρας της αντίδρασης. Έτσι μπορεί να διαπιστωθεί εάν η τυχόν επιμόλυνση οφείλεται στις συνθήκες του εργαστηριακού χώρου (αν το αρνητικό control που βρίσκεται στην αρχή βγει θετικό μετά από PCR) ή εάν οφείλεται σε σφάλμα του αναλυτή (αν το αρνητικό control που βρίσκεται στο τέλος βγει θετικό μετά από PCR).

**Πίνακας 8.** Συντελεστές αντιδραστηρίων για τη μέθοδο της PCR.

Για τον rs12778366		Για τον rs3758391	
Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)	Αντιδραστήρια	Όγκος(μL)
Master Mix (Hot Start Promega)	25	Master Mix (Hot Start Promega)	25
Forward primer P1 (STR1 10μM)	1	Forward primer P1 (STR3 10μM)	1
Reverse primer P2 (STR2 10 μM)	1	Reverse primer P2 (STR4 10μM)	1
H <sub>2</sub> O	13	H <sub>2</sub> O	13
Συνολικά	40	Συνολικά	40

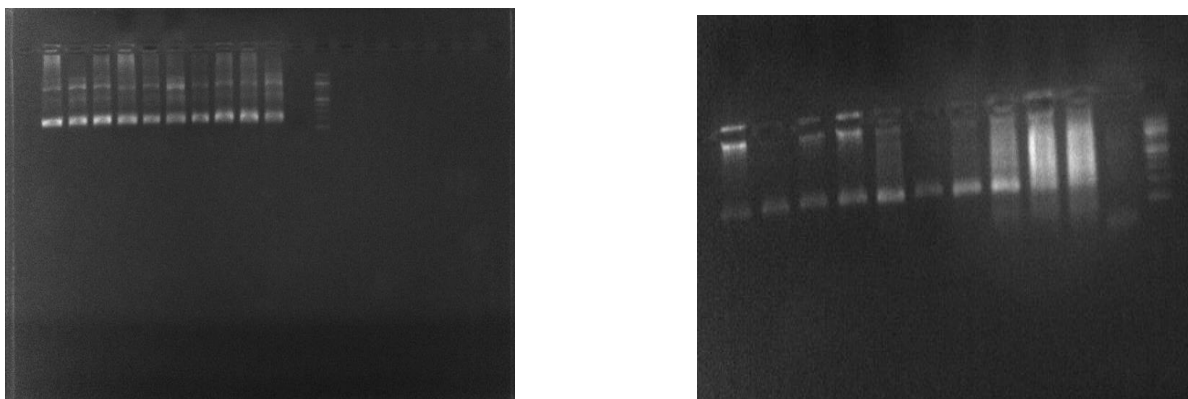
Για να γίνουν ορατά τα προϊόντα της αντίδρασης και να επιβεβαιωθεί η ειδικότητά τους, δηλαδή να διαπιστωθεί αν περιέχονται σε αυτά οι αναμενόμενες αλληλουχίες βάσεων του DNA-προτύπου χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι η πιο συχνή διαδικασία για το διαχωρισμό τμημάτων DNA τα οποία ποικίλουν σε μέγεθος η οποία λόγω της ευχρηστίας και της αποτελεσματικότητά της στο διαχωρισμό βιομορίων μεγέθους από 500bp (basepairs: μονάδα μέτρησης των ζευγών βάσεων) έως 25kb χρησιμοποιείται ευρύτατα στη μοριακή έρευνα. Η



συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του μορίου DNA που πρόκειται να διαχωρισθεί, καθώς όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος του DNA τόσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα (0,4-1,2% w/v) κι αντιστοίχως υψηλότερες συγκεντρώσεις αγαρόζης χρησιμοποιούνται για την ανάλυση βιομορίων μικρότερου μεγέθους (έως και 2,5% w/v). Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ξεκινάει με τη φόρτωση των δειγμάτων στα «πηγαδάκια» της γέλης αγαρόζης με τη χρήση αυτόματης πιπέτας ρυθμιζόμενου όγκου στα 17  $\mu$ L, όπου πρωτίστως τοποθετούνται τα δείγματα υπό εξέταση, έπειτα τα αρνητικά δείγματα για την ανίχνευση πιθανής επιμόλυνσης ενώ στο τέλος φορτώνεται ο δείκτης μοριακού μεγέθους (Ladder). Η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα τμήματα DNA κατά μήκος του πηκτώματος αγαρόζης στο οποίο εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από το μέγεθός τους. Για την οπτικοποίηση των DNA τμημάτων στην πηκτή αγαρόζης και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, απαιτείται τοποθέτησή της σε λάμπα υπεριώδους φωτός στα 320nm, με αποτέλεσμα την ταχύτατη διάχυση του νουκλεϊκού οξέος και για αυτό παρατηρείται ο σχηματισμός ζωνών DNA (bands). Η παρουσία ζώνης συγκεκριμένου μεγέθους βάσεων σημειώνεται ως θετικό αποτέλεσμα, δηλαδή ότι η επιθυμητή αλληλουχία έχει πολλαπλασιαστεί αποτελεσματικά μέσω της αντίδρασης της PCR, ενώ η απουσία ζώνης θεωρείται ως αρνητικό αποτέλεσμα. Όσον αφορά το συγκεκριμένο μέγεθος των τμημάτων του DNA που αναμένεται, αυτό καθορίζεται ύστερα από σύγκρισή τους με συγκεκριμένο διάλυμα που περιέχει κομμάτια DNA γνωστών μεγεθών και λειτουργεί ως βαθμολογητής μοριακού βάρους (κλίμακα DNA ή ladder molecular weight marker) ακολουθώντας την ίδια πορεία ηλεκτροφόρησης με τα προϊόντα της PCR για την επίτευξη της σύγκρισής τους. Για τον πολυμορφισμό rs12778366 το τμήμα DNA που πολλαπλασιάστηκε έχει μέγεθος βάσεων 212 bp ενώ για τον πολυμορφισμό rs3758391, το μέγεθος του τμήματος DNA είναι 241 bp. Στις παρακάτω εικόνες (

Εικόνα 12.) παρουσιάζονται τα τμήματα DNA που περιέχουν τις επιθυμητές αλληλουχίες DNA που πολλαπλασιάστηκαν με τη μέθοδο της PCR.

**Εικόνα 12.** Απεικόνιση της επιθυμητής αλληλουχίας DNA των προϊόντων PCR για τους πολυμορφισμούς rs12778366 μεγέθους βάσεων 212 bp (αριστερά) και rs3758391 μεγέθους βάσεων 241 bp (δεξιά).

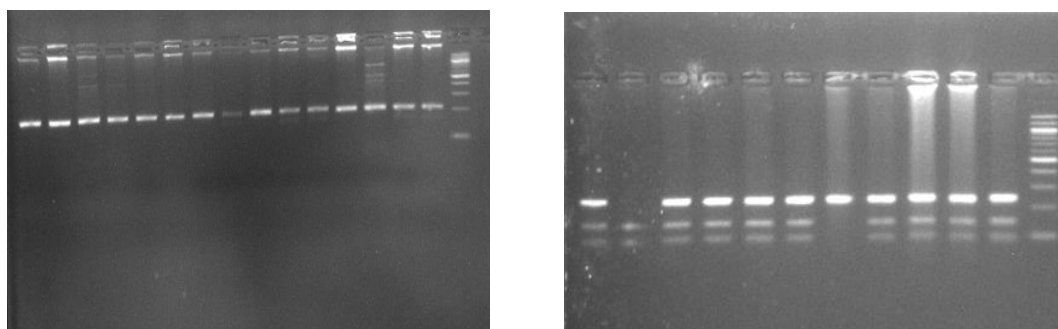


Ακολούθησε πέψη των προϊόντων της PCR (10  $\mu$ L), με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων HpyCH4III (rs12778366) και N1aIII (rs3758391). Συγκεκριμένα, για τον πολυμορφισμό rs12778366, η πέψη των προϊόντων της PCR έγινε με τη βοήθεια του περιοριστικού ενζύμου HpyCH4III. Η αντίδραση πέψης έγινε σε όγκο 50  $\mu$ L που περιείχε 10  $\mu$ L προϊόν PCR, 1  $\mu$ L από το περιοριστικό ένζυμο, 5  $\mu$ L buffer και 34  $\mu$ L απιονισμένου νερού. Οι συνθήκες δράσης του ενζύμου ήταν στους 37°C για 60 λεπτά και για την απενεργοποίηση εφαρμόστηκε θερμοκρασία 65°C για 20 λεπτά. Με παρόμοιο τρόπο, για τον πολυμορφισμό rs3758391, η πέψη των προϊόντων της PCR έγινε με τη βοήθεια του περιοριστικού ενζύμου N1aIII. Η αντίδραση πέψης έγινε σε συνολικό όγκο 50  $\mu$ L που περιείχε 10  $\mu$ L προϊόν PCR, 1  $\mu$ L από το περιοριστικό ένζυμο, 5  $\mu$ L buffer και 34  $\mu$ L απιονισμένου νερού (Πίνακας 9). Οι συνθήκες δράσης του ενζύμου ήταν στους 37°C για 15 λεπτά και για την απενεργοποίηση εφαρμόστηκε θερμοκρασία 65°C για 20 λεπτά. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (2%) με βρωμιούχο αιθίδιο. Ειδικότερα, για τον πολυμορφισμό rs12778366, όπου υπήρχε το αλληλόμορφο C, γινόταν πέψη από το περιοριστικό ένζυμο και δημιουργούνταν 2 ζώνες 170 και 42 βάσεων ενώ όπου υπήρχε το T αλληλόμορφο, το περιοριστικό δεν έκανε πέψη και δημιουργούνταν αμπλικόνιο 212 βάσεων. Για τον πολυμορφισμό rs3758391, όπου υπήρχε το αλληλόμορφο T, γινόταν πέψη από το περιοριστικό ένζυμο και δημιουργούνταν 2 ζώνες 146 και 94 βάσεων ενώ όπου υπήρχε το C αλληλόμορφο, το περιοριστικό δεν έκανε πέψη και δημιουργούνταν αμπλικόνιο 241 βάσεων.

**Πίνακας 9.** Συντελεστές αντιδραστηρίων με την εφαρμογή περιοριστικού ενζύμου

Για τον rs12778366		Για τον rs3758391	
Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)	Αντιδραστήρια	Όγκος(μL)
Περιοριστικό ένζυμο HpyCH4III	1	Περιοριστικό ένζυμο N1aIII	1
buffer	5	Buffer	5
H <sub>2</sub> O	34	H <sub>2</sub> O	34
Συνολικά	40	Συνολικά	40
<b>+ προϊόν PCR</b>	10	<b>+ προϊόν PCR</b>	10

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έγιναν ορατά μέσω του συστήματος απεικόνισης ηλεκτροφόρησης DNA με UV (DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro) καθώς το βρωμιούχο αιθίδιο μέσω του φθορισμού του έχει τη δυνατότητα να συμπλέκεται με νουκλεϊκά οξέα και όταν η πηκτή ακτινοβοληθεί στη λυχνία υπεριώδους φωτός, να γίνουν ορατές οι ζώνες DNA (βλ. Εικόνα 13).



**Εικόνα 13.** Απεικόνιση ζωνών DNA έπειτα από εφαρμογή περιοριστικού ενζύμου στους πολυμορφισμούς rs12778366 (αριστερά) και rs3758391 (δεξιά). Το περιοριστικό ένζυμο HpyCH4III (rs12778366) κάνει πέψη όπου υπάρχει το αλληλόμορφο C και δημιουργούνται 2 ζώνες 170 και 42. Το περιοριστικό ένζυμο N1aIII (rs3758391) κάνει πέψη όπου υπάρχει το αλληλόμορφο T και δημιουργούνται 2 ζώνες 146 και 94 βάσεων.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την απεικόνιση των γονοτύπων των διαφορετικών δειγμάτων του υπό μελέτη πληθυσμού κατηγοριοποιήθηκαν λαμβάνοντας υπόψιν τόσο τους διαφορετικούς γονοτύπους όσο και την κατάσταση της υγείας τους. Ακολούθησε υπολογισμός της συχνότητας εμφάνισης των

γονοτύπων και των αλληλόμορφων των δύο πολυμορφισμών και εφαρμόστηκε το  $\chi^2$  τεστ (chi-square test) για να προσδιοριστεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στη συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων ανάμεσα στα άτομα που εμφανίζουν σακχαρώδη διαβήτη τύπο 2 και σε αυτά που δεν φέρουν τη νόσο. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε  $p - \text{value} \leq 0.05$  και η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του SPSS. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στο επόμενο κεφάλαιο.

## Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα & Συζήτηση

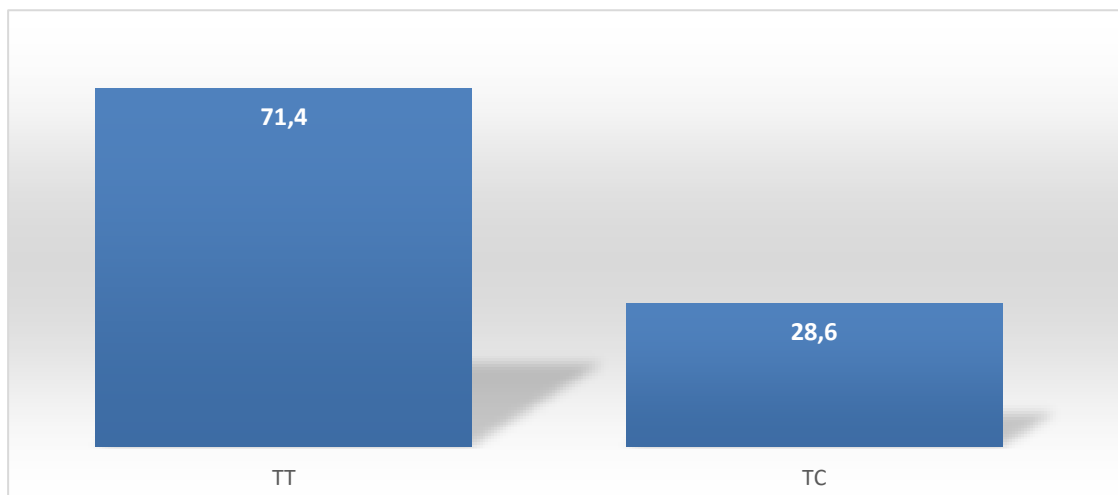
### 4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 4.1.1. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs12778366

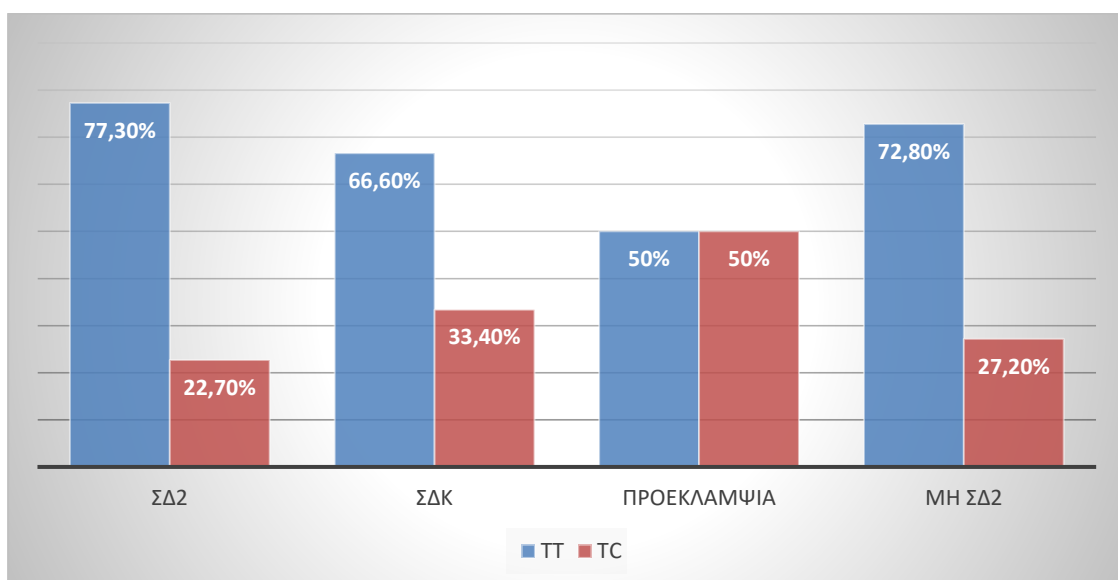
Στον παρακάτω πίνακα (βλ. Πίνακας 10) παρουσιάζονται οι διαφορετικοί γονότυποι του πολυμορφισμού rs12778366 στις διαφορετικές ομάδες του δείγματος που εξετάστηκε ενώ η συχνότητα της εμφάνισης αυτών αποτυπώνεται στο Γράφημα 1 όπου παρουσιάζεται το ποσοστό των ατόμων που φέρουν καθένα από τους γονοτύπους και στο Γράφημα 2 στο οποίο φαίνεται η κατανομή των γονοτύπων στις επιμέρους ομάδες. Στον υπό μελέτη πληθυσμό, το 71,4% (n = 35) είναι ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο T ενώ το υπόλοιπο 28,6 % (n = 14) ετεροζυγώτες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν υπήρξαν στο δείγμα μας ομοζυγώτες για το σπάνιο αλληλόμορφο C. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο γονότυπος TT έχει στην πλειονότητα των διαφορετικών ομάδων παρόμοιο ποσοστό εμφάνισης με εξαίρεση την ομάδα των εγκύων γυναικών με προεκλαμψία γεγονός που δικαιολογείται λόγω του μικρού αριθμού συμμετεχόντων σε αυτή την ομάδα.

**Πίνακας 10.** Κατανομή γονοτύπων για τον πολυμορφισμό rs12778366 στον υπό μελέτη πληθυσμό

rs12778366				
Γονότυπος	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 n (%)	Σακχαρώδης διαβήτης κύησης (n) %	Προεκλαμψία (n) %	Χωρίς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (n) %
<b>TT (n = 35)</b>	17 (77,3%)	8 (66,6%)	2 (50%)	8 (72,8%)
<b>TC (n = 14)</b>	5 (22,7%)	4 (33,4%)	2 (50%)	3 (27,2%)
<b>Σύνολο (n = 49)</b>	22	12	4	11



**Γράφημα 1.** Συχνότητες γονοτύπων για τον SNP rs12778366 στον πληθυσμό της έρευνας.



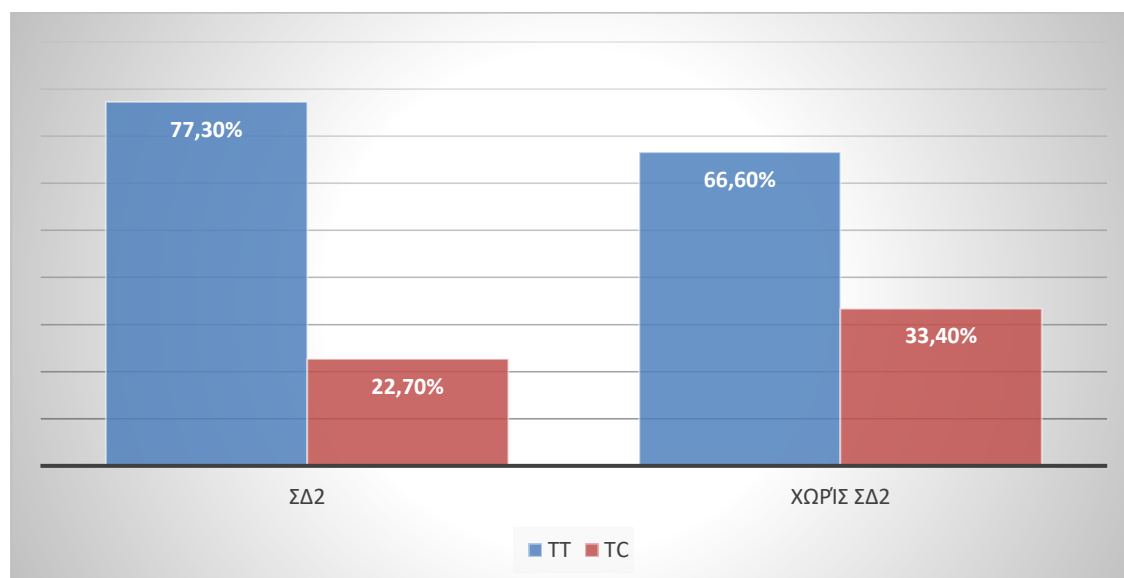
**Γράφημα 2.** Συχνότητα γονοτύπων στις επιμέρους ομάδες του δείγματος.

Σε επόμενο στάδιο της ανάλυσης των αποτελεσμάτων, το υπό μελέτη δείγμα διαχωρίστηκε σε 2 επιμέρους ομάδες με κριτήριο τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, στα άτομα που έχουν τη νόσο ανεξαρτήτως ύπαρξης άλλης παθολογικής κατάστασης και στα άτομα που δεν εμφανίζουν τη νόσο. Στην κάθε μία από τις δύο αυτές ομάδες υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης των δύο γονοτύπων όπως αποτυπώνεται στον παρακάτω πίνακα (βλ. Πίνακας 11). Συγκεκριμένα, όσο αφορά την ομάδα των ατόμων που εμφανίζουν τη νόσο, το 77,3% φέρει το γονότυπο TT ενώ το υπόλοιπο 22,7% φέρει τον γονότυπο TC. Για την ομάδα των ατόμων που δεν εμφανίζουν τη νόσο, τα ποσοστά κινούνται σε παρόμοιο επίπεδο (βλ. Γράφημα 3). Ειδικότερα, το 66.6% των

ατόμων είναι ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο T ενώ το υπόλοιπο 33.4% είναι ετεροζυγώτες.

**Πίνακας 11.** Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων του rs12778366 σε διαβητικούς και μη διαβητικούς τύπου 2.

rs12778366		
Γονότυπος	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (n) %	Χωρίς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (n) %
TT (n = 35)	17 (77,3%)	18 (66.6%)
TC (n = 14)	5 (22,7%)	9 (33.4%)
Σύνολο (n = 49)	22	27



**Γράφημα 3.** Απεικόνιση ποσοστιαίας κατανομής των γονοτύπων σε διαβητικούς και μη διαβητικούς τύπου 2.

Όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων T και C σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και σε άτομα χωρίς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα (βλ. Πίνακας 12). Βάσει των δεδομένων αυτών, εφαρμόστηκε το  $\chi^2$  τεστ (chi – square test) για να ερευνηθεί πιθανή συσχέτιση των αλληλόμορφων με την εμφάνιση της νόσου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία του C αλληλόμορφου δεν σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη ( $p - value = 0.221 \leq 0.05$ )

**Πίνακας 12.** Ανάλυση εμφάνισης των αλληλόμορφων στον πολυμορφισμό rs12778366

	<b>T αλληλόμορφο</b>	<b>C αλληλόμορφο</b>
<b>Διαβητικοί</b>	(39) 89%	(5) 11%
<b>Μη διαβητικοί</b>	(45) 83%	(9) 17%
<b>P-value</b>	Reference	0.221

#### 4.1.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs3758391

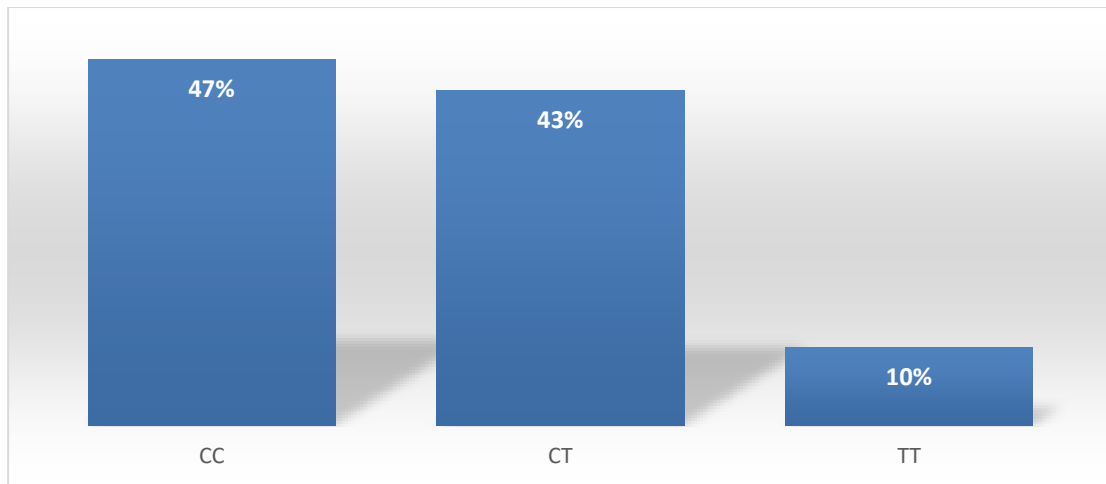
Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs3758391, στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13) παρουσιάζονται οι διαφορετικοί γονότυποι στις διαφορετικές ομάδες του δείγματος που εξετάστηκε. Σε αντίθεση με τον πολυμορφισμό rs12778366, στον πολυμορφισμό rs3758391 εμφανίζονται και οι 3 γονότυποι.

**Πίνακας 13.** Κατανομή γονοτύπων του πολυμορφισμού rs3758391 στον υπό μελέτη πληθυσμό.

<b>rs3758391</b>				
<b>Γονότυπος</b>	<b>Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (n) %</b>	<b>Σακχαρώδης διαβήτης κύησης (n) %</b>	<b>Προεκλαμψία (n) %</b>	<b>Χωρίς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (n) %</b>
<b>CC (n = 23)</b>	8 (36.3%)	7 (58.3%)	2 (50%)	6 (54,5%)
<b>CT (n = 21)</b>	12 (54, 5%)	4 (33.4%)	1 (25%)	4 (36.4%)
<b>TT (n = 5)</b>	2 (9.1%)	1 (8.3%)	1 (25%)	1 (9,1%)
<b>Σύνολο (n = 49)</b>	22	12	4	11

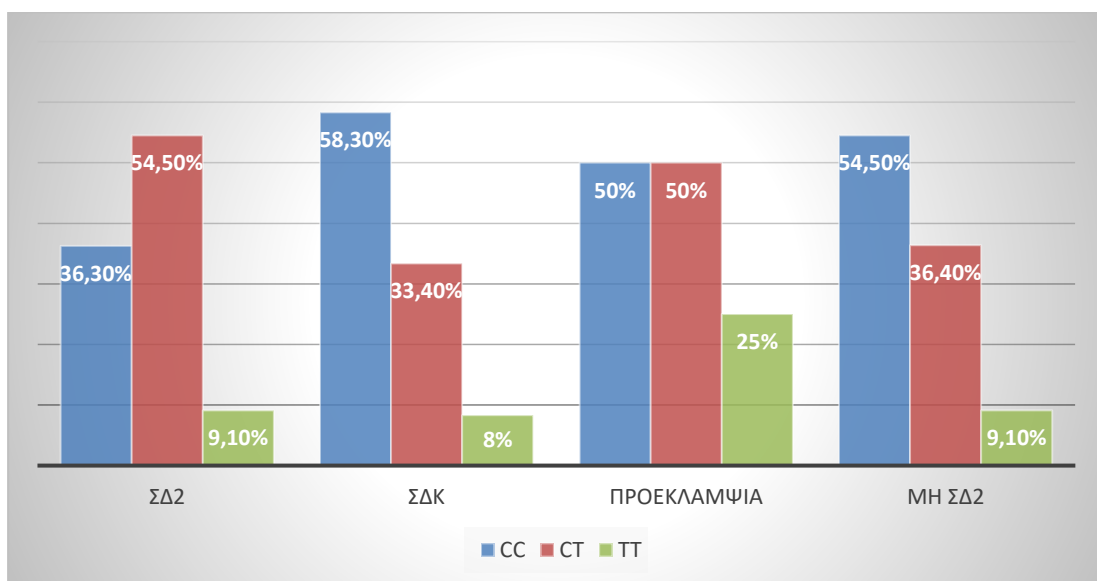
Στο Γράφημα 4 παρουσιάζονται σε ποσοστιαία κατανομή οι τρεις γονότυποι. Συγκεκριμένα, το 47% (n = 23) είναι ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο C, σε παρόμοιο ποσοστό 43% (n=22) είναι ετεροζυγώτες ενώ σε ποσοστό 10 % (n = 5) ομοζυγώτες στο αλληλόμορφο T.





**Γράφημα 4.** Συχνότητες γονοτύπων για τον SNP rs3758391 για τον πληθυσμό της έρευνας.

Κάνοντας μια περαιτέρω ανάλυση της συχνότητας εμφάνισης των γονοτύπων στις επιμέρους πληθυσμιακές ομάδες, όπως αποτυπώνεται στο Γράφημα 5, παρατηρούμε ότι οι γονότυποι έχουν διαφορετική συχνότητα εμφάνισης. Ειδικότερα, στα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, ο γονότυπος CT υπερिशύει έναντι του CC (ποσοστό 54,5% έναντι 36,3%) ενώ στις υπόλοιπες ομάδες ο γονότυπος CC υπερिशύει κινούμενος σε παρόμοια ποσοστιαία επίπεδα έναντι του CT γονοτύπου. Ο γονότυπος TT κινείται σε χαμηλά ποσοστά σε όλες τις ομάδες με εξαίρεση την ομάδα των γυναικών που εμφανίζουν προεκλαμψία γεγονός που πιθανόν δικαιολογείται από το μικρό αριθμό ατόμων που της ομάδας αυτής στο δείγμα.

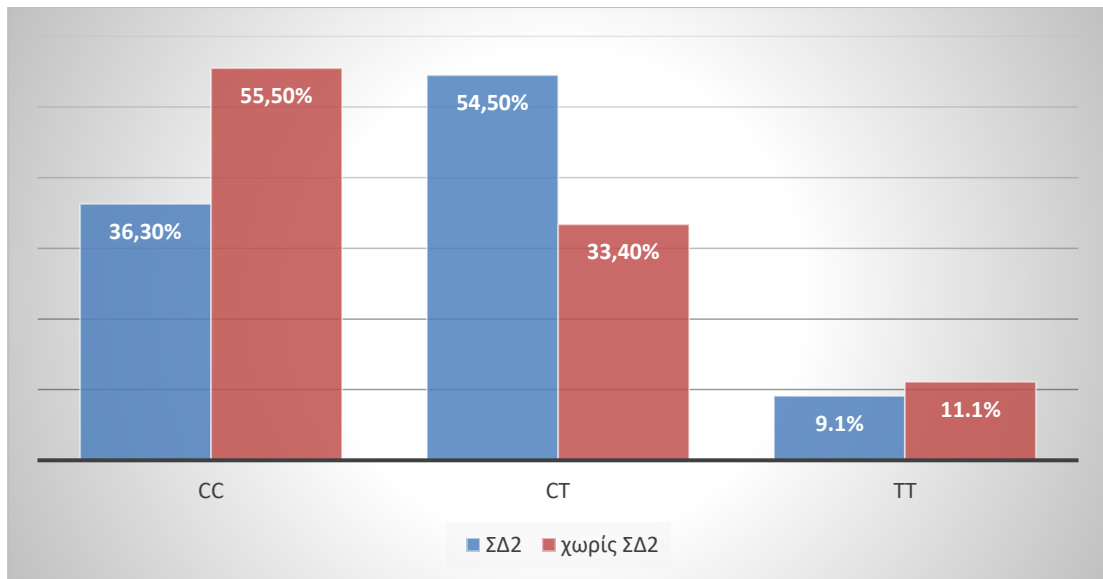


**Γράφημα 5.** Συχνότητα γονοτύπων στις επιμέρους ομάδες του δείγματος.

Παρόμοια με τον προηγούμενο πολυμορφισμό, το υπό μελέτη δείγμα διαχωρίστηκε σε 2 ομάδες με κριτήριο τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, στα άτομα που έχουν τη νόσο ανεξαρτήτως ύπαρξης άλλης παθολογικής κατάστασης και στα άτομα που δεν εμφανίζουν τη νόσο. Στην κάθε μία από τις δύο αυτές ομάδες υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης των δύο γονοτύπων όπως αποτυπώνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 14). Ειδικότερα, για την ομάδα των ατόμων που εμφανίζουν τη νόσο, το 36.3% φέρει το γονότυπο CC, το 54,5% είναι ετεροζυγώτες ενώ μόλις το 9,1% είναι ομοζυγώτες για το T αλληλόμορφο. Στην ομάδα των ατόμων που δεν εμφανίζουν τη νόσο, τα ποσοστά διαφοροποιούνται καθώς το 55.5% των ατόμων είναι ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο C, το 33.4% είναι ετεροζυγώτες ενώ παρόμοια με την ομάδα του σακχαρώδη διαβήτη, το ποσοστό των ομοζυγωτών για το T αλληλόμορφο κυμαίνεται στο 11.1%. Η ποσοστιαία κατανομή παρουσιάζεται και στο Γράφημα 6.

**Πίνακας 14.** Συχνότητα εμφάνισης γονοτύπων του rs3758391 σε διαβητικούς και μη διαβητικούς τύπου 2.

rs3758391		
Γονότυπος	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (n) %	Χωρίς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (n) %
CC (n = 23)	8 (36.3%)	15 (55.5%)
CT (n = 22)	12 (54, 5%)	9 (33.4%)
TT (n = 5)	2 (9.1%)	3 (11.1%)
<b>Σύνολο (n = 49)</b>	<b>22</b>	<b>27</b>



**Γράφημα 6.** Απεικόνιση ποσοστιαίας κατανομής των γονοτύπων σε διαβητικούς και μη διαβητικούς τύπου 2.

Ακολούθησε ανάλυση συχνότητας εμφάνισης των 2 αλληλόμορφων (Τ και C) σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και σε άτομα χωρίς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα και βάσει των αριθμητικών δεδομένων που προέκυψαν εφαρμόστηκε το  $\chi^2$  τεστ (chi – square test) για να ερευνηθεί πιθανή συσχέτιση των αλληλόμορφων με την εμφάνιση της νόσου. Τα αποτελέσματα ( βλ. Πίνακας 15) έδειξαν ότι η παρουσία του T αλληλόμορφου δεν σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη ( $p - value = 0.225 < 0.05$ ).

**Πίνακας 15.** Ανάλυση εμφάνισης των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού rs3758391

	C αλληλόμορφο	T αλληλόμορφο
<b>Διαβητικοί</b>	28 (64%)	16 (36%)
<b>Μη διαβητικοί</b>	39 (72%)	15 (28%)
<b>P – value</b>	Reference	0.225

## 4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια μεταβολική διαταραχή και χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης που προκύπτουν από ολοκληρωτική ή μερική έλλειψη ινσουλίνης, στο πλαίσιο της δυσλειτουργίας των  $\beta$  – κυττάρων, αντίσταση στην ινσουλίνη ή και τα δύο. Αποτελεί μια από τις πιο ραγδαία εξαπλωμένες ασθένειες παγκοσμίως ενώ προβλέπεται να έχουν προσβληθεί 693 εκατομμύρια ενήλικες μέχρι το 2045. Τα γονίδια και το περιβάλλον είναι σημαντικές ορίζουσες για την αντίσταση στην ινσουλίνη και τη δυσλειτουργία των  $\beta$  – κυττάρων. Οι εξελίξεις στην τεχνολογία και οι αναλυτικές προσεγγίσεις έχουν ταυτοποιήσει γονίδια που συνδέονται με την παθογένεση του σακχαρώδη διαβήτη και οι έρευνες σε υποψήφια γονίδια μπορούν να προσφέρουν καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου.

Η SIRT1 είναι μία  $\text{NAD}^+$  εξαρτώμενη πρωτεϊνική αποακετυλάση η οποία ρυθμίζει μια ευρεία γκάμα κυτταρικών διεργασιών και συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια που συνδέονται με τον μεταβολισμό γλυκόζης – λιπιδίων, της μιτοχονδριακής βιογένεσης, της φλεγμονής, αυτοφαγία, τους κερκάδιους ρυθμούς και άλλους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την αντίσταση στο στρες, την απόπτωση και την καταστολή / αποσιώπηση της χρωματίνης. Ο ρόλος της ως κύριος μεταβολικός ρυθμιστής στην ομοιόσταση της γλυκόζης και της ινσουλίνης μέσω αποακετυλίωσης πληθώρας πρωτεϊνών στόχων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η SIRT1 μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την SIRT1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10q21.3. και δύο λειτουργικοί πολυμορφισμοί, οι rs1277366 και rs3758391, έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης την τελευταία δεκαετία και έχει εξεταστεί η συσχέτιση των πολυμορφισμών της πρωτεΐνης με ευαισθησία στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 σε διαφορετικούς πληθυσμούς.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να εξεταστεί η συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων των δύο πολυμορφισμών και η πιθανή συσχέτιση των αλληλόμορφων με την νόσο του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs12778366, η μελέτη μας έδειξε ότι ο γονότυπος TT είχε τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης συγκριτικά με τον γονότυπο TC στον υπό μελέτη

πληθυσμό (71,4% vs 28.6%) μία τάση που αποτυπώνεται και στη μελέτη των Rai et al όπου το 80% των ατόμων έφεραν τον γονότυπο TT. Οι Rai et al παρατήρησαν συσχέτιση του γονοτύπου TT με τον σακχαρώδη διαβήτη συνδυαστικά με την ύπαρξη γονοτύπων υψηλού κινδύνου των γονιδίων mt-ND3, PG1α και UCP2-866. Επιπροσθέτως, στην παρούσα μελέτη η ανάλυση των αλληλόμορφων T και C στις ομάδες των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και χωρίς τη νόσο δεν έδειξε συσχέτιση του αλληλόμορφου C με ευαισθησία στην εμφάνιση της νόσου (p-value = 0.221) γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την έρευνα των Sadeghi et al που έδειξε ότι το αλληλόμορφο C συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (C vs T; OR = 1.50; p – value = 0.004).

Για τον πολυμορφισμό rs3758391, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, ο γονότυπος CT υπερισχύει έναντι του CC (ποσοστό 54,5% vs 36.3%) ενώ στις υπόλοιπες ομάδες ο γονότυπος CC υπερισχύει έναντι του CT γονοτύπου. Παρόμοια τάση όσον αφορά τον γονότυπο CT συγκριτικά με τον CC παρατηρείται στην ομάδα των διαβητικών στην έρευνα των Faradonbeh et al (38,6% vs 22,7%). Παρ' όλα αυτά, η ανάλυση των αλληλόμορφων C και T στις ομάδες των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και χωρίς τη νόσο δεν έδειξε συσχέτιση του αλληλόμορφου T με ευαισθησία στην εμφάνιση της νόσου (p- value = 0.225) ενώ σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα, η έρευνα των Cruz et al δείχνει ότι το T αλληλόμορφο συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη. Επιπλέον, οι Sadeghi et al προτείνουν ότι ο γονότυπος CT συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου αλλά η ύπαρξη του T αλληλόμορφου δεν σχετίζεται με ευαισθησία στην εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 συμφωνώντας με τα ευρήματα της δικής μας μελέτης. Τέλος η μελέτη των Peng et al δεν δείχνει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό και ευαισθησία στον διαβήτη τύπου 2 και το διαβητικό πόδι.

Ωστόσο η παρούσα μελέτη παρουσιάζει αδυναμίες. Πιο συγκεκριμένα, η επιλογή συμμετεχόντων περιορίστηκε σε συγκεκριμένες ομάδες πληθυσμού όπως εγκυμονούσες γυναίκες και ασθενείς με ή χωρίς σακχαρώδη διαβήτη και συνεπώς τα αποτελέσματα δεν μπορούν να θεωρηθούν αντιπροσωπευτικά και για άλλες ομάδες πληθυσμού και συνεπώς για την ελληνική επικράτεια. Επίσης, το δείγμα της έρευνας είναι πολύ μικρό (n = 49) δεδομένου ότι πρόκειται για μια μελέτη που στοχεύει στην

παρουσίαση πιθανής επίδρασης πολυμορφισμών (rs12778366 και rs3758391) στον φαινότυπο (σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2). Το γεγονός αυτό απαιτεί μεγαλύτερο δείγμα συμμετεχόντων προκειμένου να ενισχυθούν τα αποτελέσματα της μελέτης. Τέλος, τα αποτελέσματα αφορούν σε ελληνικό πληθυσμό και είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση των συσχετίσεων σε δείγματα άλλων ευρωπαϊκών πληθυσμών. Για τους λόγους που προαναφέρθηκαν είναι απαραίτητο να διεξαχθούν και άλλες μελέτες μεγαλύτερου δείγματος σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες από όλη την Ελλάδα στις οποίες θα εξετάζεται η συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων των δύο πολυμορφισμών και η πιθανή τους επίδραση στον φαινότυπο του σακχαρώδη διαβήτη και να επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα σε ανεξάρτητα δείγματα άλλων πληθυσμών.

## 5. Συμπεράσματα & Μελλοντικές έρευνες

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από την παρούσα έρευνα έδειξαν για τον πολυμορφισμό rs12778366 ότι ο γονότυπος TT έχει τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στον υπό μελέτη πληθυσμό, με παρόμοια ποσοστά ανάμεσα σε διαβητικούς και σε άτομα που δεν εμφανίζουν τη νόσο. Όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων, δεν παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση του αλληλόμορφου C με ευαισθησία στην εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Για τον πολυμορφισμό rs3758391, ο γονότυπος CT εμφανίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά στα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη ενώ ο γονότυπος CC σε μεγαλύτερο ποσοστό στα άτομα που δεν φέρουν τη νόσο. Παρ' όλα αυτά το αλληλόμορφο T δεν συνδέεται με ευαισθησία στην εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

Η λειτουργία της SIRT1 φαίνεται να σχετίζεται με την κατανόηση της παθογένεσης του σακχαρώδη διαβήτη, αποκτώντας έτσι βαρύτητα στη μελέτη της νόσου καθώς αρκετοί πολυμορφισμοί του γονιδίου έχουν επιδράσεις όχι μόνο στατιστικά σημαντικές αλλά και αξιολογούμενες για την υγεία. Προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι επιδράσεις των δύο πολυμορφισμών που παρουσιάστηκαν στην παρούσα μελέτη, καλό θα ήταν να μελετηθούν εις βάθος σε πειραματικά μοντέλα. Οι γενετικές παραλλαγές προσφέρουν το έναυσμα για ανάλυση του γονιδίου της SIRT1 και των μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται ανοίγοντας νέους δρόμους για πιθανή παρέμβαση. Τέλος, οι αλληλεπιδράσεις γονιδίου – περιβάλλοντος αλλά και οι διαφοροποιήσεις πάνω σε άλλους γενετικά ευαίσθητους δείκτες είναι σημαντικές για να εξηγήσουν τις διαφορές που παρατηρούνται σε άτομα που φέρουν τον ίδιο γονότυπο αλλά δεν εμφανίζουν την ασθένεια.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ -ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- A. J. Broady, M. H. (2017). Protective proteins and telomere length in placentas from patients with pre eclampsia in the last trimester of gestation. *Placenta*, σσ. 44-52.
- Al-Haddad, R. (2016). Epigenetic changes in Diabetes. *Neuroscience Letters*, σσ. 64-69.
- Asher G, G. D. (2008). SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell*, σσ. 317-328.
- Association, A. D. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, σσ. (Suppl. 1), S62–9.
- Bellamy, L., Casas, J., Hingorani, A., & Williams, D. (2009). Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Lancet*, σσ. 1773-1779.
- Bordone, & Guarente. (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, σσ. 298-305.
- C. Ling, L. G. (2009). Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes*, σσ. 2718-2725.
- Colak Y., O. O. (2011). SIRT1 is a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, σσ. Hy5-Hy9.
- Coustan, D., Lowe, L., Metzger, B., & Dyer, A. (2010). The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: Paving the way for new diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.*
- Cruz, M. (2010). Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*.
- D. Poidatz, E. D. (2015). *Fertility and Sterility*, σσ. 483-490.
- Ekta Rai, S. S. (2012). The Interactive Effect of SIRT1 Promoter Region Polymorphism on Type 2 Diabetes Susceptibility in the Nroth Indian Population. *PLOS One*.
- Forsbach-Sánchez, G., Tamez-Peréz, H., & Vazquez-Lara, J. (2005). Diabetes and



- pregnancy. *Arch. Med. Res.*, σσ. 291-299.
- Ganesan. (2018). Epigenetics: the first 25 centuries. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, σσ. 1-4.
- Gerhart-Hines Z, R. J. (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1α. *EMBO J*, σσ. 1913-1923.
- Gomez-Cabrera MC, Z. R. (2007). SIRT1 regulation of insulin - signalling pathways in liver, white adipose tissue and pancreas during fasting or calorie restriction. *Trends Endocrinol Metab*, σσ. 91-92.
- Gui, J., Potthast, A., Rohrbach, A., Borns, K., Das, A., & von Versen-Höynck, F. (2016). Gestational diabetes induces alterations of sirtuins in fetal endothelial cells. *Pediatr. Res*, σσ. 788-798.
- Houtkooper RH, C. C. (2010). The secret life of NAD<sup>+</sup>: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev*, σσ. 194-223.
- Jie Wang, S. W. (2021, January). Epigenetic Regulation Associated With Sirtuin 1 in Complications of Diabetes Mellitus. *Frontiers in Endocrinology*.
- Junfeng Han, M. W. (2015). Association of Genetic Variants of SIRT1 With Type 2 Diabetes Mellitus. *Gene Expression*, σσ. 177-185.
- Justyna Strycharz, Z. R. (2018). SIRT1 as a therapeutic target in diabetic complications. *Current medical chemistry*, σσ. 1002-1035.
- Katarzyna Mac-Marcjanek, A. Z.-K. (2018). Expression Profile of Diabetes-Related Genes Associated with Leukocyte Sirtuin 1 Overexpression in Gestational Diabetes. *Int. J. Mol. Sci*.
- Kitada M, K. S.-W. (2013). Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy. *Clinical Science*, σσ. 153-164.
- Kitada, M., & Koya, D. (2013). SIRT1 in type 2 Diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. *Diabetes and Metabolism Journal*, σσ. 315-325.
- Langenberg C, L. L. (2018). Genomic insights into the causes of type 2 diabetes. *Lancet*, σσ. 2463-2474.
- Lee, J., & Gu, W. (2013). SIRT1: Regulator of p53 Deacetylation. *Genes Cancer*, σσ. 112-117.
- Leibiger IB, B. P. (2005). A SIRTain role in pancreatic beta cell function. *Cell Metab*, σσ. 80-82.

- Mahajan, A. e. (2018). Fine-mapping type 2 diabetes loci to single-variant resolution using high-density imputation and islet-specific epigenome maps. . *Nat. Genet.*, σσ. 1505-1513.
- Mohammad Bagher Sadeghi, A. N. (2020). SIRT1 functional polymorphisms ( rs12778366. rs3758391) as genetic biomarkers of susceptibility to type 2 diabetes mellitus in Iranians: a case - control study and computational analysis. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*.
- Morris, A. P. (2018). Progress in defining the genetic contribution to type 2 diabetes susceptibility. *Current Opinion in Genetics & Development*, σσ. 41-51.
- Motta MC, D. N. (2004). Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell*, σσ. 551-563.
- N.H. Cho, J. S. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 . . *Diabetes research and clinical practice* , σσ. 271-281.
- Nakahata Y, K. M. (2008). The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. . *Cell*, σσ. 329-340.
- Naqvi A, H. T. (2010). A single-nucleotide variation in a p53-binding site affects nutrient-sensitive human SIRT1 expression. *Hum Mol Genet.*, σσ. 4123-4133.
- Naqvi, A. H. (2010). A single-nucleotide variation in a p53-binding site affects nutrient-sensitive human SIRT1 expression. *Human Molecular Genetics*, σσ. 4123–4133.
- Noguerias, Habegger, Chaudhary, & al, e. (2012). Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol. Rev.*, σσ. 1479-1514.
- Peng, Y. (2018). Influence of SIRT1 polymorphisms for diabetic foot susceptibility and severity. *Medicine*.
- Ramin Tavakoli Faradonbeh, M. Z. (2020, January - March). Assosiation of the rs3758391 polymorphism in the SIRT1 gene with diabetic nephropathy and decreased estimated glomerularfiltration rate (GFR) in a population from southest Iran. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, σσ. 99-105.
- Ramírez, Á., Hernández, M., & al., e. (2020). Type 2 diabetes–associated polymorphisms correlate with SIRT1 and TGF-β1 gene expression. *Annals of*

- Human Genetics*, σσ. 185-194.
- Sarah Viana-Mattioli, P. N. (2020). Analysis of SIRT1 Expression in Plasma and in an In Vitro Model of Preeclampsia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Shah, B., Retnakaran, R., & Booth, G. (2008). Increased risk of cardiovascular disease in young women following gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, σσ. 1668-1669.
- Sherry ST, W. M. (1999). dbSNP—database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. . *Genome Res.* , σσ. 677-679.
- Steven E Kahn, M. E. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet*, σσ. 1068-1083.
- Strycharz, J., Drzewoski, J., Szemraj, J., & Sliwinska, A. (2017). Is p53 involved in tissue - specific insuline resistance formation? *Oxid. Med. Cell Longev.*
- Sultan, S., Alzahrani, N., & Al-Sakkaf, K. (2018). The postpartum effect of maternal diabetes on the circulating levels of sirtuins and superoxide dismutase. *FEBS Open Bio*, σσ. 256-263.
- Susanne Voelter-Mahlknecht, U. M. (2006). Cloning, chromosomal characterization and mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*, σσ. 59-67.
- Sylwia M. Figarska, J. M. (2013, March). SIRT1 Polymorphism, Long-Term Survival and Glucose Tolerance in the General Population. *Plos One*.
- Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., & Horio. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.*, σσ. 6823-6832.
- Tiinamaija Tuomi, N. P. (2014, March). The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet*, σσ. 1084-1094.
- Toniolo, A. (2018). The diabetes pandemic and associated infections: suggestions for clinical microbiology. *Reviews in Medical Microbiology*, σσ. 1-17.
- W. Zhang, Q. H. (2017). Sirt1 inhibits oxidative stress in vascular endothelial cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- WHO. (2020, April 22). HEARTS D: diagnosis and management of type 2 diabetes.
- World Health Organization. (2009). Global Health Risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: Switzerland.

- Xiaoling. (2013). SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin*, σσ. 51-60.
- Y.R. Chen, Y. L. (2013). SIRT1 interacts with metabolic transcriptional factors in the pancreas of insulin-resistant and calorie-restricted rats. *Molecular Biology Reports*, σσ. 3373-3380.
- Yan Dong, T. G. (2011). SIRT1 is associated with a decrease in acute insulin secretion and a sex specific increase in risk for type 2 diabetes in Pima Indians. *Molecular Genetics and Metabolism*, σσ. 661-665.
- Yang T, F. M. (2006). SIRT1 and endocrine signaling. *Trends Endocrinol Metab*, σσ. 186-191.
- Yoon KH, L. J. (2006). Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. *Lancet*, σσ. 1681-1688.
- Yue Cao, X. J. (2016). SIRT1 and insulin resistance. *Journal of Diabetes and its Complications*, σσ. 178-183.
- Yutian Kan, P. G. (2018). SIRT1 rs3758391 polymorphism and risk of diffuse large B cell lymphoma in a Chinese population. *Cancer Cell Int*.
- Z. Armaly, J. E. (2018). Pre eclampsia: novel mechanisms and potential therapeutic approaches. *Frontiers in Physiology*, σ. 973.
- Zhou, B. Z. (2014). CLOCK/BMAL1 regulates circadian change of mouse hepatic insulin sensitivity by SIRT1. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, σσ. 2196-2006.
- Χαρβάλου, Χ. (2020). *Εισαγωγή στις αρχές της μοριακής βιολογίας και διαγνωστική πρακτική*. Τσότρας.

