

EPIGENEETTISEN IKÄÄNTYMISNOPEUDEN YHTEYS KUOLLEISUUTEEN

Riikka Sanchez

Gerontologian ja kansanterveyden pro gradu -
tutkielma

Liikuntatieteellinen tiedekunta

Jyväskylän yliopisto

Kevät 2021

TIIVISTELMÄ

Sanchez R. 2021. Epigeneettisen ikääntymisnopeuden yhteys kuolleisuuteen. Liikuntatieteellinen tiedekunta, Jyväskylän yliopisto, Gerontologian ja kansanterveyden pro gradu -tutkielma, 59 s.

Biologista ikää voidaan arvioida monilla erilaisilla mittareilla. Toistaiseksi lupaavin biologinen ikäenuste saadaan epigeneettistä kelloa käyttäen. Epigeneettiset kellot perustuvat DNA:n metyloitumiseen. Kronologista ikää korkeamman epigeneettisen iän on havaittu lisäävän ennenaikaisen kuoleman riskiä, mutta yhteyden voimakkuudesta on erilaisia arvioita. Epigeneettinen ikääntymisnopeus kuvaa eroa kronologisen iän ja epigeneettisen iän välillä. Tämän tutkielman tarkoituksena oli selvittää, ennustaako uuden sukupolven GrimAge- epigeneettisen kellon avulla määritetty epigeneettinen ikääntymisnopeus kuolleisuutta ja onko epigeneettisellä iällä yhteyttä kuolleisuuteen, kun perimä ja lapsuusajan ympäristökijät kontrolloidaan kokonaan tai osittain kaksosmallinnuksen avulla. Lisäksi tarkasteltiin selittävätkö tutkittavien tupakointi, painoindeksi tai fyysinen aktiivisuus mahdollista kaksosparien välistä eroa epigeneettisessä iässä.

Tutkielmassa käytettiin Suomen kaksoskohortin alaotosta. Aineisto koostui 413 naisesta, jotka olivat 63–76-vuotiaita seurannan alussa. Epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kuolleisuusriskin yhteyttä tarkasteltiin mallintamalla elossaoloaikoja käyttäen Cox regressioanalyysiä. Kaplanin-Meierin menetelmällä ja log-rank-testillä arvioitiin kuoleman todennäköisyyksiä seuranta-aikana. Tässä analyysissä kaksosia käsiteltiin toisistaan riippumattomina yksilöinä. Epigeneettisesti vanhemman kaksosen todennäköisyyttä kuolla ennen sisartaan arvioitiin kahden riippuvan otoksen McNemar-testillä. Riippuvan otoksen t-testillä arvioitiin selittävätkö elintavat epigeneettisen ikääntymisnopeuden eroa kaksosten välillä.

Seuranta-aikana (ka 15,8 [0,2–18,3] vuotta) kuoli yhteensä 156 tutkittavaa. Korkeampi epigeneettinen ikääntymisnopeus oli yhteydessä kohonneeseen kuolleisuusriskiin. Epigeneettisen ikääntymisnopeuden kasvaessa yhden keskihajonnan (kh 3,19) verran kasvoi kuoleman riski 28 % (95 %:n luottamusväli 11–47 %). Eri terveys- ja elintapamuuttujien sekä koulutuksen vakioimisen vaikutus oli melko vähäinen; kaikissa malleissa kuoleman riski kasvoi noin 24–31 % ikääntymisnopeuden kasvaessa yhden keskihajonnan verran. Kaplan-Meier-kuvaajien vertailussa epigeneettisen ikääntymisnopeuden tertiileistä ”hitaasti ikääntyvät” erosivat tilastollisesti merkitsevästi nopeasti ikääntyvistä ($p = 0,024$), mutta ”keskimääräisesti ikääntyvät” eivät eronneet ”hitaasti ikääntyvistä” tai ”nopeasti ikääntyvistä” ($p = 0,450$, $p = 0,143$). Epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kaksosisarten keskinäisen kuolinjärjestyksen välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää yhteyttä. Ikääntymisnopeuden suhteen erilaisten kaksosten hitaammin ikääntyvillä kaksosilla tupakoinnin askivuosien keskiarvo (1,59, kh 6,87) osoittautui tilastollisesti merkitsevästi pienemmäksi kuin nopeammin ikääntyvien keskiarvo (7,20, kh 13,48, ryhmien välinen ero $p < 0,001$).

Tutkimustulokset vahvistavat aiempien tutkimusten havaintoja epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kuolleisuuden välisestä yhteydestä. Tulokset myös osoittavat, että perinnöllisten tekijöiden lisäksi elintapatekijät vaikuttavat epigeneettiseen ikääntymiseen ja että niillä on tärkeä rooli epigeneettisen ikääntymisen ja kuolleisuuden välisessä yhteydessä. Lisätutkimusta kuitenkin tarvitaan sen selvittämiseksi, ovatko DNA:n metyloitumisessa tapahtuvat muutokset ikääntymisen syy vai seuraus.

Asiasanat: *biologinen ikääntyminen, epigeneettinen ikääntymisnopeus, epigeneettinen kello, GrimAge, kuolleisuus, elintavat*

ABSTRACT

Sanchez, R. 2021. The association between epigenetic age acceleration and mortality. Faculty of Sport and Health Sciences, University of Jyväskylä, Gerontology and Public Health, Master's thesis, 59 p.

The most promising new biological age predictor is the epigenetic clock. Epigenetic clocks are based on DNA methylation. Higher epigenetic age compared to chronological age has been found to increase the risk of premature death, but the strength of the association has varied in different studies. Epigenetic age acceleration describes the difference between chronological age and epigenetic age. The purpose of this study was to investigate the association of epigenetic age acceleration with mortality and if epigenetic age acceleration is associated with mortality when genetic and childhood environmental factors are fully or partially controlled. In addition, it was examined whether smoking, body mass index or physical activity explains the possible epigenetic age difference within twin pairs.

The study sample is a sub-sample of the Finnish twin cohort. The sample consisted of 413 women aged 63–76 years at the beginning of the mortality follow-up. The association between epigenetic age acceleration and mortality risk was examined by modeling survival times using Cox regression analysis. Epigenetic age was determined by the second-generation epigenetic clock GrimAge. The Kaplan-Meier method and log-rank test were used to evaluate the probabilities of death during the follow-up. Mortality analyses were conducted for individuals. The probability of an epigenetically older twin dying first was assessed by McNemar test. The dependent t-test for paired samples was used to determine whether the lifestyle variables explained the difference in epigenetic age acceleration within twin pairs.

156 participants died during the follow-up period (average 15,8 [0,2–18,3] years). A higher epigenetic age acceleration was associated with an increased risk of mortality. More precisely when the epigenetic age acceleration increased by one standard deviation (SD 3,19), the risk of death increased by 28% (95 % CI 11–47%). The impact of the adjustment for various health and lifestyle variables as well as education was rather small. In all models, the risk of death increased by about 24–31% per one SD increase in the age acceleration. Comparing survival between epigenetic age acceleration tertiles showed that “slow agers” differed statistically significantly from “fast agers” ($p = 0,024$), but the “medium agers” did not differ from “slow agers” ($p = 0,450$) or “fast agers” ($p = 0,143$). No statistically significant association was found between the epigenetic age acceleration and the twin death order. Epigenetically younger twins had statistically significantly lower average number of smoking pack-years (1,59, SD 6,87) when compared to their faster aging twin siblings (7,20, SD 13,48, difference between groups $p < 0,001$).

The results support findings from previous studies on the association between epigenetic age acceleration and mortality. The results also show that lifestyle factors contribute to epigenetic aging and play an important role in the association between epigenetic aging and mortality. However, further research is needed to determine whether changes in DNA methylation are a cause or a consequence of aging.

Key words: *biological aging, epigenetic age acceleration, epigenetic clock, GrimAge, mortality, lifestyle*

KÄYTETYT LYHENTEET

BMI	body mass index, kehon painoindeksi
CpG	sytosiini-fosfaatti-guaaniini-dinukleotidi
DNA	deoksiribonukleiinihappo
DZ	ditsygootti, ei-identtinen
MZ	monotsygootti, identtinen
RNA	ribonukleiinihappo
XZ	tsygositeetin suhteen epävarma

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ

1 JOHDANTO.....	1
2 BIOLOGINEN IKÄÄNTYMINEN	3
2.1 Biologiset ikääntymismuutokset	3
2.2 Biologisen ikääntymisen mittaaminen	4
3 EPIGENEETTINEN IKÄÄNTYMINEN	6
3.1 DNA:n metylaatio	6
3.2 Epigeneettiset kellot	8
4 ELINIKÄ JA KUOLLEISUUS	12
4.1 Eliniän kehitys Suomessa	12
4.2 Yleisimmät kuolemansyyt	15
4.3 Elintapojen yhteys ennenaikaiseen kuolleisuuteen.....	17
5 EPIGENEETTISEN IKÄÄNTYMISEN YHTEYS KUOLLEISUUTEEN	21
6 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYKSET	24
7 TUTKIMUKSEN AINEISTO JA MENETELMÄT	25
7.1 Tutkimusasetelma ja tutkittavat.....	25
7.2 Tutkimusmenetelmät ja muuttujat.....	26
7.3 Tutkimusaineiston tilastolliset analyysit	28
8 TULOKSET	30
8.1 Yksilöanalyysit.....	31
8.2 Parittaiset analyysit.....	34
9 POHDINTA.....	37

LÄHTEET	43
---------------	----

1 JOHDANTO

Ikääntymistä kuvataan yleisesti syntymästä kuluneella ajalla eli kronologisella iällä. Kronologinen ikä karttuu kaikilla yksilöillä samaa tahtia. Biologinen ikääntyminen ei kuitenkaan ole kaikilla samanlaista, vaan kehon vanheneminen voi edetä eri tahtiin kronologisen iän kanssa (Levine ym. 2018; Hillary ym. 2020). Biologisen iän käsite on luotu, jotta biologisen ja fysiologisen ikääntymisen tasoa voitaisiin kuvata tarkemmin (Levine 2013).

Biologista ikää voidaan arvioida monilla erilaisilla mittareilla ja menetelmillä. Toistaiseksi lupaavin biologinen ikäennuste saadaan epigeneettistä kelloa käyttäen (Jylhävä ym. 2017). Epigeneettiset kellot ovat laskenta-algoritmeja, joiden avulla yksilön biologinen ikä määritetään tiettyjen deoksiribonukleiinihapon eli DNA:n kohtien metyloitumisen perusteella (Horvath 2013). DNA:n metyloitumisen perusteella arvioidusta biologisen iän ennusteesta käytetään yleensä käsitteitä epigeneettinen ikä sekä DNA-metylaatioikä. Epigeneettinen ikääntymisnopeus puolestaan kuvaa eroa kronologisen iän ja epigeneettisen iän välillä. Epigeneettiset kellot korreloivat voimakkaasti kronologisen iän kanssa aineistossa, jotka kattavat laajan ikäskalan (Hannum ym. 2013; Horvath 2013).

DNA:n metyloitumiseen vaikuttavat ikääntymisen (Florath ym. 2014; Tan ym. 2016) lisäksi muun muassa perimä, ympäristötekijät (Wang ym. 2018; Li ym. 2020) ja sukupuoli (Yousefi ym. 2015). Useissa tutkimuksissa on havaittu identtisillä kaksosilla erilaiset DNA:n metylaatioasteet poikkeavien ympäristötekijöiden sekä elintapojen vuoksi (Tan ym. 2016; Wang ym. 2018; Li ym. 2020).

Epigeneettisen ikääntymisnopeuden on havaittu ennustavan kuolleisuusriskiä kronologista ikää paremmin (Marioni ym. 2015; Christiansen ym. 2016), etenkin kun muut tunnetut riskitekijät on vakioitu (Chen ym. 2016). Epigeneettisen iän yhteyttä kuolleisuuteen on tutkittu melko vähän, eivätkä käytetyt tutkimusasetelmat ja -menetelmät ole täysin yhteneviä (Fransquetin ym. 2019). Etenkin uusimpien, toisen sukupolven epigeneettisten kellojen osalta tutkimuksia on vain vähän. Yksi uusimmista epigeneettisistä kelloista on GrimAge- epigeneettinen kello, jonka

on todettu ennustavan kokonaiskuolleisuutta muita epigeneettisiä kelloja paremmin (Hillary ym. 2020; McCrory ym. 2021). Kronologista ikää korkeamman epigeneettisen iän on havaittu lisäävän ennenaikaisen kuoleman riskiä, mutta yhteyden voimakkuuden arviot vaihtelevat. Kronologiseen ikään verrattuna viisi vuotta korkeamman epigeneettisen iän on arvioitu olevan yhteydessä noin 8–35 %:a korkeampaan kuolleisuusriskiin (Marioni ym. 2015; Christiansen ym. 2016; Fransquet ym. 2019). Epigeneettinen ikä mahdollisesti ennustaa sekä kokonaiskuolleisuutta että tiettyihin sairauksiin liittyvää kuolleisuutta (Zhang ym. 2016).

Tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena on tutkia, ennustaako toisen sukupolven GrimAge-epigeneettisen kellon avulla määritetty epigeneettinen ikäänäntymisnopeus kuolleisuutta ja onko epigeneettisellä iällä yhteyttä kuolleisuuteen, kun perimän vaikutus kontrolloidaan ja lapsuuden ympäristötekijöiden vaikutus kontrolloidaan osittain kaksosmallinnuksen avulla. Lisäksi tarkastellaan, selittävätkö tutkittavien tupakointi, painoindeksi tai fyysinen aktiivisuus mahdollista kaksosten välistä eroa epigeneettisessä iässä.

2 BIOLOGINEN IKÄÄNTYMINEN

Vanhenemiseen ei ole vielä löydetty yhtenäistä ja yleisesti tunnustettua selitystä. Vanhenemisen selittämiseksi on olemassa yli 300 teoriaa (Bottomley & Lewis 2019, 24). Biologiset ikääntymisteoriat voidaan jakaa kahteen pääluokkaan eli geneettisiin (ohjelmoituihin) teorioihin ja ei-geneettisiin (ohjelmoimattomiin) teorioihin (Jin 2010; Bottomley & Lewis 2019, 20). Edellisen mukaan vanhenemisen eteneminen on geneettisesti ohjattua ja ohjelmoitua ja jälkimmäisen mukaan vanheneminen etenee molekyylitasolla sattumanvaraisesti eli stokastisena prosessina, joka johtuu ympäristön vaikutuksista ja johtaa solun sisäisten ja solujen välisten säätelymekanismien lisääntyneeseen epäjärjestykseen ja virheiden kasaantumiseen (Jin 2010; Bottomley & Lewis 2019, 21, 25–26).

2.1 Biologiset ikääntymismuutokset

Vanheneminen tarkoittaa solujen ja kudosten toiminnassa ajan kuluessa tapahtuvia haitallisia muutoksia, jotka heikentävät elimistön elinkelpoisuutta ja lisäävät kuolleisuutta (Kananen & Marttila 2019). Biologisen ikääntymisen moniulotteinen prosessi on seurausta perimän, ympäristötekijöiden, elintapojen sekä ajankulun vaikutuksista (Dodig ym. 2019; Kananen & Marttila 2019). Biologista ikääntymistä selittäviä mekanismeja on pyritty tunnistamaan tutkimalla normaalin vanhenemisen aikana tapahtuvia solu- ja molekyylitason tapahtumia (López-Otín ym. 2013). Vanhenemisen perusmekanismeihin vaikuttamalla voitaisiin ehkäistä useita vanhenemisen yhteydessä esiintyviä sairauksia ja maksimoida terveet elinvuodet (Kananen & Marttila 2019). López-Otínin ym. (2013) tunnistamia ja luokittelemia vanhenemisen tunnusmerkkejä on yhdeksän: 1. genomin epästabiilius, 2. telomeerien lyheneminen, 3. epigeneettiset muutokset, 4. proteostaasin häiriöt, 5. häiriöt ravintoaineisiin liittyvässä signaaloinnissa, 6. häiriöt mitokondrioiden toiminnassa, 7. solujen senesenssi, 8. kantasolukato sekä 9. häiriöt solujen välisessä viestinnässä.

Genomin epästabiilius, telomeerien lyheneminen, epigeneettiset muutokset sekä proteostaasin häiriöt ovat ensisijaisia tunnusmerkkejä ja laukaisevia tekijöitä eli ne johtavat suoraan muutoksiin solun toiminnassa ja aiheuttavat häiriöitä muun muassa geenien ilmentymisessä (López-

Otín ym. 2013; Rebelo-Marques ym. 2018; Kananen & Marttila 2019). Vahinkoon reagoivat tunnusmerkit, eli häiriöt ravintoaineisiin liittyvässä signaloinnissa ja mitokondrioiden toiminnassa sekä solujen senesenssi, ovat alun perin vahinkojen syntymistä ehkäiseviä ja vahinkojen vaikutusta rajoittavia prosesseja, mutta ne voivat pahentuessaan aiheuttaa soluvaurioita ja edistää ikääntymisprosessia (López-Otín ym. 2013; Rebelo-Marques ym. 2018). Antagonististen ja ensisijaisten tunnusmerkkien vaikutuksista johtuvaa kantasolukatoa ja häiriöitä solujen välisessä viestinnässä kutsutaan integroiviksi tunnusmerkeiksi; ne häiritsevät kudoksen tasapainotilaa ja aiheuttavat ikään liittyvän toiminnallisen heikkenemisen (López-Otín ym. 2013; Rebelo-Marques ym. 2018). Solutason tunnusmerkeissä tapahtuvat muutokset voivat joko kiihdyttää vanhenemistä (vähentyneet terveet vuodet) tai hidastaa sitä (lisääntyneet terveet vuodet) (López-Otín ym. 2013; Kananen & Marttila 2019).

2.2 Biologisen ikääntymisen mittaaminen

Luotettavien biologisen iän mittareiden etsintä on jatkunut jo yli kolmen vuosikymmenen ajan (Jylhävä ym. 2017). Tarve mitata biologista ikää liittyy haluun parantaa ja tehostaa terveyden edistämistä sekä vanhenemiseen liittyvien sairauksien ehkäisyä (Levine 2020). Edistyminen molekyylibiologian alalla on lisännyt mahdollisten biologisen iän määrittämiseen sopivien biomarkkereiden määrää (Jylhävä ym. 2017). Biomarkkeri tarkoittaa sellaista tekijää tai ominaisuutta, joka ilmentää eliön biologisen tilan muutosta (Tieteen termipankki 2014). Yhdysvaltalainen ikääntymisen tutkimuskeskus suosittelee hyvän ikääntymisen biomarkkerin kriteereiksi seuraavia: 1. sen tulee ennustaa vanhenemisen etenemistä luotettavasti, kronologisesta iästä riippumatta, 2. sen tulee olla testattavissa, eikä se saa olla haitallista koehenkilöille, 3. sen on oltava tarkka, toistettavissa ja teknisesti yksinkertainen suorittaa ja 4. sen pitäisi toimia sekä koe-eläimillä että ihmisillä (American Federation for Aging Research 2016).

Lara ym. (2015) ovat tunnistaneeet ja luokitelleet terveen ikääntymisen biomarkkereita. Heidän mukaansa fysiologiseen toimintaan liittyviä ikääntymismuutoksia voidaan arvioida parhaiten mittaamalla hengitys- ja verenkiertoelimistön kunto sekä kehon koostumus (esimerkiksi verenpaine, keuhkokapasiteetti, veren sokeri- ja rasva-arvot, painoindeksi sekä luurankolihas- ja luumassa). Fyysiseen suorituskyykyyn liittyen he nostavat esiin biomarkkerit, jotka mittaavat käden

puristusvoimaa, liikkumiskykyä, tasapainoa sekä hienomotoriikkaa (esimerkiksi kävelynopeus ja istumaannousu), kun taas kognitiiviseen toimintaan liittyvät biomarkkerit keskittyvät muistin, prosessointinopeuden ja tiedonkäsittelytoimintojen mittaamiseen. Ikääntymiseen liittyviä muutoksia hormonaalisessa säätelyjärjestelmässä voidaan arvioida mittaamalla hypotalamus-aivolisäke-lisämunuais- eli HPA-akselin, sukupuolihormonien sekä kasvuhormonien toimintaa ja määrää (Lara ym. 2015). Immuunijärjestelmän biomarkkereista eniten näyttöä on tulehduksen välittäjäaineista (esimerkiksi sytokiinit TNF-alfa ja interleukiini 6) (Lara ym. 2015). Kromosomien päässä olevien perintöainesta suojaavien DNA-rakenteiden eli telomeerien solunjakautumisen myötä tapahtuva lyheneminen on yksi eniten tutkituista molekyyli-tason biomarkkereista (Aubert & Lansdorp 2008; Jylhävä ym. 2017).

Monet tutkijat uskovat edelleen, että ikääntymisen kokonaisnopeus on mitattavissa, vaikka yhtään kriteerit täyttävää biomarkkeria ei ole vielä tunnistettu (American Federation for Aging Research 2016). Toimivien biomarkkereiden löytämisen haasteeksi on osoittautunut etenkin kehon eri kudosten toisistaan eroavat ikääntymisnopeudet sekä sairauksien ja ikääntymisen päällekkäisyys (American Federation for Aging Research 2016). Yhdistämällä useiden eri biomarkkereiden tietoja, on kenties mahdollista huomioida paremmin vanhenemisprosessin moniulotteisuutta ja näin ollen saada tarkempia biologisen iän arvioita (Levine 2013). Toistaiseksi lupaavin itsenäinen biologinen ikäennuste saadaan laskemalla yksilön epigeneettinen ikä tiettyjen DNA-kohtien metyloitumisen perusteella (Horvath 2013; Jylhävä ym. 2017; Levine ym. 2018; Lu 2019).

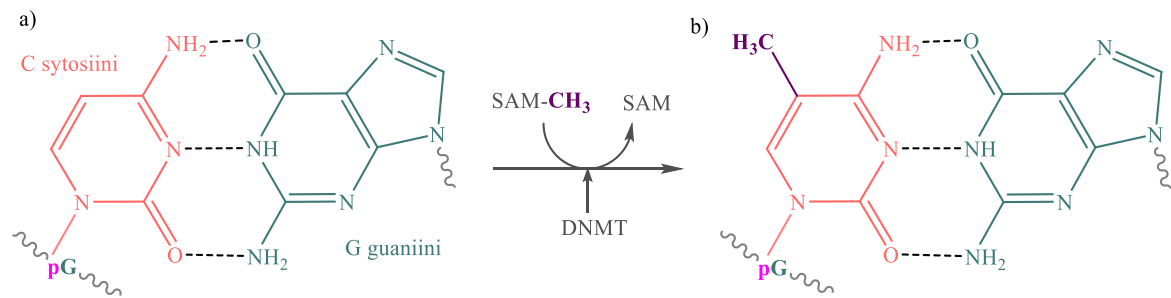
3 EPIGENEETTINEN IKÄÄNTYMINEN

Ihmiskehon kaikkiin soluihin sisältyy identtinen genomi eli DNA:han koodattu perintöaines, joka ohjaa geenien luentaa ja proteiinien tuotantoa (Alberts ym. 2002). Epigenetiikalla tarkoitetaan yksilön ilmiasuun vaikuttavia muutoksia, jotka johtuvat sellaisista säätelymekanismeista, joissa DNA:n emäsjärjestys ei muutu (Gravina & Vijg 2010). Epigeneettinen säätely voi vaikuttaa geenien ilmentymiseen aktivoimalla tai hiljentämällä geenien toimintaa pääasiassa DNA:n metylaation, histonien (DNA:n pakkausproteiini) muokkauksen sekä ei-koodaavan RNA:n välittämien prosessien kautta (Gravina & Vijg 2010; Peschansky & Wahlestedt 2014). Epigeneettisistä merkeistä muodostuva epigenomi säilyy solujen jakautumisen yhteydessä ja toisinaan myös sukupolvelta toiselle (Martos ym. 2015).

3.1 DNA:n metylaatio

DNA koostuu neljästä erilaisesta nukleotidista, joiden rakenneosat ovat fosfaatti (p), deoksiriboosisokeri sekä yksi neljästä emäksestä: adeniini (A), sytosiini (C), guaniini (G) tai tymiini (T) (Watson & Crick 1953). DNA:n sekundaarirakenteena on kaksoiskierre, jossa kahden DNA-juosteen emäsparit liittyvät emäsparisäännön mukaisesti yhteen muodostaen A-T- ja C-G-pareja (Watson & Crick 1953).

Nisäkkäillä DNA:n metylaatio tarkoittaa metyyliryhmän ($R-CH_3$) liittymistä kovalenttisella sidoksella DNA-juosteen sytosiinimäksen viidenteen hiileen sytosiini-fosfaatti-guaaniinidinukleotidin (CpG) kohdalla (kuvio 1.) (Moore ym. 2013; Bacalini ym. 2014; Patil ym. 2014). Alkion kantasoluissa, neuroneissa ja munasoluissa DNA:n metyloitumista voi tapahtua myös muissa kohdissa, kuten CpA-, CpT- ja CpC-kohdissa (Patil ym. 2014). Kemiallista tapahtumaa, jossa poistuu metyyliryhmä, kutsutaan demetylaatioksi.



KUVIO 1. DNA:n metylaatioissa sytosiinistä a) muodostuu DNA-metyylitransferaasin (DNMT) katalysoimana 5-metyylisytosiini b). Metyyliryhmän luovuttaa S-adenosyylimetioniini (SAM).

DNA:n metylaatiolla on keskeinen rooli solujen ja kudosten erilaistumisessa sekä yksilön kehityksessä (Bell ym. 2012; Patil ym. 2014; Jung & Pfeifer 2015). Muutoksia DNA:n metylaatioasteessa tapahtuu koko elämän ajan kaikissa yksilön kudoksissa (Bell ym. 2012; Christiansen ym. 2016; Marioni ym. 2019). Noin 28 miljoonasta ihmisen genomiin epäsymmetrisesti jakautuneesta CpG-dinukleotidista metyloituneita on yleensä noin 60–80 % (Smith ja Meissner 2013). Genomi sisältää sekä CpG köyhiä että CpG rikkaita alueita; alueita, joissa CpG-dinukleotidien esiintymistiheys on suuri, kutsutaan CpG-saarekkeiksi (Bacalini ym. 2014). Metylaatioaste voi olla erilainen eri kudoksissa sekä eri kohdissa genomia (Tra ym. 2002). Lisääntynyttä DNA:n metyloitumista kutsutaan hypermetyloitumiseksi, kun taas DNA:n metylaatioasteen väheneminen johtaa hypometyloitumiseen (Tra ym. 2002).

Useissa tutkimuksissa on identtisillä kaksosilla havaittu erilaiset DNA:n metylaatioasteet poikkeavien ympäristötekijöiden sekä elintapojen vuoksi (Fraga ym. 2005; Talens ym. 2012; Tan ym. 2016; Wang ym. 2018; Li ym. 2020). Tanin ym. (2016) kaksostutkimuksessa tunnistamista 2284 CpG-kohdasta, joiden metyloituminen muuttui pitkittäisseurannan aikana, vain 10 %:iin vaikuttivat perhetekijät (perimä tai jaettu ympäristö) ja 90 %:iin vaikuttivat yksilölliset ympäristötekijät. DNA:n metyloitumiseen vaikuttavat ympäristö- ja käyttäytymistekijät voivat olla kemiallisia (kuten epäpuhtaudet ja elintarvikelisiä aineet), fysikaalisia (kuten UV-säteily ja lämpötila), biologisia (kuten virusinfektiot ja geenivirheet), psykologisia (kuten mielialahäiriöt) tai elintapoihin liittyviä (kuten runsasenerginen ruokavalio, kalorirajoitus, fyysinen aktiivisuus ja vuorokausirytmät) (Leenen ym. 2016). Esimerkiksi tupakoinnin on havaittu muuttavan

merkittävästi DNA:n metyloitumista (Gao ym. 2015). Tupakointiin liittyvät muutokset metyloitumisessa näyttävät olevan ainakin osittain palautuvia (Gao ym. 2015), mutta metylaatioasteen palautuminen tupakoimattomille tyypilliselle tasolle voi kestää tupakoinnin lopettamisen jälkeen jopa 20 vuotta (Zhang ym. 2014; Guida ym. 2015). Monissa DNA:n metyloitumista arvioivissa tutkimuksissa ympäristötekijöiden merkitystä ei kuitenkaan ole huomioitu kattavasti (Jung & Pfeifer 2015).

Perimän ja ympäristötekijöiden lisäksi DNA:n metyloitumiseen vaikuttavat myös yksilön sukupuoli ja ikääntyminen. Naisilla on todettu olevan miehiä alhaisempi DNA:n metylaatioaste (El-Maarri ym. 2007; Zhang ym. 2011; Yousefi ym. 2015). Iän myötä metyloituvien CpG-kohtien tarkasta lukumäärästä ei ole vielä varmuutta, mutta tutkijat ovat tunnistaneeet jo tuhansia CpG-kohtia, jotka joko hypermetyloituvat tai hypometyloituvat ikääntymisen aikana (Florath ym. 2014; Tan ym. 2016). CpG-kohdistista on kuitenkin suuri osa joko ikääntymisen suhteen neutraaleja tai niiden yhteyttä biologiseen ikääntymiseen ei vielä tunneta (Bell ym. 2012). Osan CpG-kohdistista on todettu olevan yhteydessä kronologiseen ikään (Horvath 2013; Weidner ym. 2014; Bacalini ym. 2015).

Lapsilla ikään liittyvät DNA:n metylaatioasteen muutokset tapahtuvat nopeammin kuin aikuisilla (Alisch ym. 2012). Aikuisuudessa DNA:n metylaatioaste on melko vakaa, mutta yksilöiden välinen vaihtelu lisääntyy (Talens ym. 2012). Aikuisuuden jälkeen on veren DNA:n metylaatioasteen havaittu keskimääräisesti vähenevän iän lisääntyessä (Hannum ym. 2013; Florath ym. 2014). Aiheesta tarvitaan kuitenkin lisää tutkimusta, etenkin ikääntyneiden kohdalla, koska tutkimusjoukkoon voi liittyä elossapysymisharha: Iäkkäimmät tutkittavat saattavat olla paremmassa kunnossa kuin aiemmin kuolleet ikäisensä sekä ne, jotka eivät osallistu tutkimuksiin (Marioni ym. 2019).

3.2 Epigeneettiset kellot

Epigeneettiset kellot ovat laskenta-algoritmeja, joiden avulla voidaan määrittää yksilön biologinen ikä vuosissa tiettyjen CpG-kohtien metyloitumisen perusteella (Horvath 2013). Ensimmäiset laskenta-algoritmit julkaistiin vuonna 2013 (Hannum ym. 2013; Horvath 2013).

Nykyään epigeneettisiä kelloja on olemassa useita (taulukko 1). Niistä tunnetuimpia ovat taulukossa 1 lihavoidut kronologista ikää ennustavat ensimmäisen sukupolven Horvathin (2013) ja Hannumin ym. (2013) epigeneettiset kellot sekä toisen sukupolven fenotyypin eli ilmiänsua ennustava Levinen ym. (2018) PhenoAge- epigeneettinen kello ja elinikää ennustava Lun ym. (2019) GrimAge- epigeneettinen kello.

Epigeneettiset kellot sisältävät vaihtelevan määrän tutkittavia CpG-kohtia sekä kudoksen, josta DNA eristetään (Bergsma & Rogaeva 2020). Toisen sukupolven epigeneettiset kellot sisältävät lisäksi muita ikääntymiseen yhteydessä olevia tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa ikään liittyvään DNA:n metyloitumiseen (Lu ym. 2019; Bergsma & Rogaeva 2020). Näitä DNA:n metylaatioasteen muutoksia selittäviä arvoja ja riskitekijöitä kutsutaan korvikebiomarkkereiksi.

TAULUKKO 1. Terveen kudoksen DNA:n metyloitumiseen perustuvia epigeneettisiä kelloja (mukaillen Bergsma & Rogaeva 2020).

Nimi	CpG	Kudostyyppi	Lähdeviite
<i>Ensimmäisen sukupolven kellot</i>			
DNA-metylaatioikä	3	sylki	(Bocklandt ym. 2011)
Epigeneettinen ikä	5	useat	(Koch & Wagner 2011)
Florath ikäestimaatti	17	veri	(Florath ym. 2014)
DNA-metylaatioikä	71	veri	(Hannum ym. 2013)
DNA-metylaatioikä	353	useat	(Horvath 2013)
DNA-metylaatioikä	3	veri	(Weidner ym. 2014)
Huang ikäestimaatti	5	veri	(Huang ym. 2015)
Zbieć-Piekarska ikäennuste	5	veri	(Zbieć-Piekarska ym. 2015)
DNA-metylaatioikä	99	veri	(Lin ym. 2016)
Zhang ikäestimaatti	514	veri ja sylki	(Zhang ym. 2019)
MEAT	200	lihas	(Voisin ym. 2020)
<i>Toisen sukupolven kellot</i>			
epiTOC	385	veri	(Yang ym. 2016)
PhenoAge	513	veri	(Levine ym. 2018)
GrimAge	1030	veri	(Lu ym. 2019)

CpG = tutkittavien sytosiini-fosfaatti-guaaniini-dinukleotidi kohtien lukumäärä. Tunnetuimmat epigeneettiset kellot ovat taulukossa lihavoituna.

Kudos-, sylki- tai laskimoverinäytteistä eristetyn DNA:n metyloitumisen määrittämiseksi on kehitetty erityisiä mikrosiruteknologioita, joita ovat esimerkiksi Illuminan HumanMethylation 27k, 450k sekä EPIC BeadChip (Horvath 2013; Lu ym. 2019). Useat epigeneettiset ikäestimaatit voidaan laskea vapaasti saatavilla olevalla algoritmilla (<https://dnamage.genetics.ucla.edu/new>).

Horvathin epigeneettinen kello on kehitetty analysoimalla 21 369 CpG-kohtaa, joista algoritmiin on valittu 353 parhaiten kronologista ikää selittävää CpG-kohtaa (Horvath 2013). GrimAge- epigeneettinen kello on puolestaan kehitetty kahdessa vaiheessa: Ensimmäisessä vaiheessa kehitettiin korvikebiomarkkerit 88 plasmaproteiinille sekä tupakoinnin askivuosille. Toisessa vaiheessa korvikebiomarkkereista sekä niistä CpG-kohdista, jotka ovat yhteydessä kronologiseen ikään ja sukupuoleen, muodostettiin parhaiten kuolemanriskiä ennustava yhdistelmä (Lu ym. 2019). GrimAge- epigeneettisen kellon ikäarvio lasketaan 1030 CpG-kohdan metyloitumisen perusteella (Lu ym. 2019), eli CpG-kohtia on huomattavasti enemmän kuin muissa epigeneettisissä kelloissa. GrimAge- epigeneettiseen kelloon valikoituneet korvikebiomarkkerit ovat tupakoinnin askivuosi-muuttuja sekä seitsemän erilaista plasmaproteiinia: adrenomedulliini (ADM), beeta-2-mikroglobuliini (B2M), kasvutekijä 15 (GDF-15), metalloproteiinaasin estäjä (TIMP-1), kystatiini C, leptiini ja plasminogeenin aktivaattorin estäjä (PAI-1) (Lu ym. 2019). Joissakin tapauksissa korvikebiomarkkerit, kuten tupakoinnin askivuosi-muuttuja, ennustavat kuolleisuutta paremmin kuin itse epigeneettinen kello (Lu ym. 2019).

Validointitutkimuksissa sekä Horvathin ($r = 0,96$; 2013) ja Hannumin ym. ($r = 0,91$; 2013) epigeneettiset kellot että PhenoAge- epigeneettinen kello ($r = 0,94$; Levine ym. 2018) korreloivat voimakkaasti kronologisen iän kanssa kaikenikäisillä. GrimAge- epigeneettisen kellon korrelaatio kronologisen iän kanssa ($r = 0,82$) oli validointitutkimuksessa hieman matalampi (Lu ym. 2019), mutta se ennustaa ikään liittyviä ilmiäsuja, sairauksia ja kokonaiskuolleisuutta paremmin kuin muut epigeneettiset kellot (McCrory ym. 2021). Validointitutkimuksen mukaan DNA-metylaatioiän (GrimAge) korrelaatio ennenaikaisen kuolleisuusriskin kanssa on noin 0,40 ja kronologisen iän korrelaatio ennenaikaisen kuolleisuusriskin kanssa on noin 0,35 (Lu ym. 2019). Lapsuudessa ja nuoruudessa kronologisen iän ja epigeneettisen iän suhde on logaritminen, kun taas aikuisuudessa suhde on lineaarinen (Horvath 2013).

Keskimääräisesti epigeneettinen ikä kertyy hitaammin kuin kronologinen ikä koko elämän ajan, etenkin vanhimmalla väestöllä (Marion ym. 2019). Vaikka epigeneettinen ikä korreloi voimakkaasti kronologisen iän kanssa, voi yksilötasolla epigeneettinen ikääntyminen edetä eri tahtiin kronologisen ikääntymisen kanssa (Levine ym. 2018; Hillary ym. 2020). Vertaamalla DNA-metylaatioikää kronologiseen ikään voidaan määrittää epigeneettinen ikääntymisnopeus. Kun ikääntymisnopeus (Δ ikä) määritetään epigeneettisen iän ja kronologisen iän erotuksena, voidaan henkilön biologisen ikääntymisen etenemistä verrata muihin samanikäisiin henkilöihin (Horvath ym. 2015). Vaihtoehtoisesti epigeneettinen ikääntymisnopeus (age acceleration) voidaan määrittää lineaarisen regressioanalyysin jäännöksistä, jotka syntyvät verrattaessa tutkittavien DNA-metylaatioikää heidän kronologiseen ikäänsä (Chen ym. 2016). Jälkimmäinen epigeneettinen ikääntymisnopeus ei korreloi kronologisen iän kanssa, kuten ensimmäinen (Chen ym. 2016). Positiivinen ikääntymisnopeuden arvo viittaa odotettua nopeampaan biologiseen ikääntymiseen tai vastaavasti negatiivinen arvo viittaa odotettua hitaampaan biologiseen ikääntymiseen (Chen ym. 2016).

Perhetutkimuksen mukaan biologisen ikääntymisnopeuden perinnöllisyys on noin 43 % (Marioni ym. 2015). Kaksostutkimuksessa nuorten aikuisten (20–25 v.) epigeneettisen ikääntymisnopeuden vaihtelun on havaittu olevan enemmän perimän säätelystä (74 %) vanhempiin (55–70 v.) kaksospareihin verrattuna (53 %) (Sillanpää ym. 2019). Ikääntyvillä sekä perimä että elintapa- ja ympäristötekijät selittävät lähes yhtä paljon epigeneettisen ikääntymisnopeuden vaihtelusta (Sillanpää ym. 2019).

4 ELINIKÄ JA KUOLLEISUUS

Väestötieteen yksi yleisimmistä tunnusluvuista on elinajanodote. Elinajanodote syntymähetkellä on väestön terveydentilan arvioimisen mittari, ja tarkoittaa keskimääräistä vuosien lukumäärää, jonka tietyn sukupuolinen vastasyntynyt eläisi, jos kuolleisuus säilyisi ennallaan (Porta & Last 2018). Syntymähetken elinajanodotteeseen vaikuttaa voimakkaimmin lapsikuolleisuus, eikä se siis varsinaisesti ennusta eliniän pituutta (Porta & Last 2018), vaan ennemmin tiivistää tietyn ikäryhmän kuolleisuuden tason yhteen lukuun. Jäljellä oleva elinajanodote muuttuu jatkuvasti ikääntyessä, eikä kohorttelinikää eli toteutunutta keskimääräistä elinikää voida laskea ennen kuin kaikki samana vuonna syntyneet ovat kuolleet. Kuolleisuus (mortality rate, death rate) on mittaluku, jolla ilmoitetaan kuoleman esiintymistiheys määrätyllä väestöllä tietyn ajanjakson aikana, ja kuolleisuusriski (risk of death) kuvaa sitä todennäköisyyttä, jolla kuolema tapahtuu tietyn ajan kuluessa (Porta & Last 2018). Kokonaiskuolleisuudella tarkoitetaan kuolemia, joiden syy voi olla mikä tahansa, vastaavasti tautikohtainen kuolleisuusluku viittaa tiettyyn sairauteen tai sairausryhmään liittyvään kuolleisuuteen (Kauhanen ym. 2013, 128).

4.1 Eliniän kehitys Suomessa

1860-luvulle saakka elinajanodote syntymähetkellä on ollut Suomessa alle 40 vuotta (Suomen virallinen tilasto 2020b). Viimeisten laajamittaisten nälkävuosien (1867–1868) jälkeen vastasyntyneiden elinajanodote lähti kasvamaan nopeasti, nousten jo 1920-luvulla yli 50 vuoteen (Suomen virallinen tilasto 2020b). Tartuntataudit olivat merkittävin elinajanodotteeseen vaikuttava tekijä 1900-luvun alkupuolelle saakka (Kauhanen ym. 2013, 79). Tuberkuloosi oli maan yleisin kuolemansyy ja aiheutti pahimmillaan joka kolmannen kuoleman (Kauhanen ym. 2013, 71). Kunnanlääkärijärjestelmä ja sairaalaverkosto eivät ulottuneet vielä kaikkialle, joten terveydenhuoltoon pääsy oli riippuvaista sekä asuinalueesta että kunnan taloudesta (Mattila 2012). Tartuntatautikuolleisuus väheni merkittävästi 1950-lukuun mennessä hygienian, asuinolojen, ravitsemuksen ja koulutuksen parantumisen, tartuntatautien aiheuttajien tehokkaamman tunnistamisen sekä ennaltaehkäisyn ja hoitokeinojen kehittymisten seurauksena (Huttunen 2003, Kauhanen ym. 2013, 70–73).

Imeväis- ja lapsikuolleisuus oli suurta sota-aikaan (1939–1945), mutta lähti sen jälkeen laskemaan nopeasti muun muassa äitiysavustuksen, neuvolatoiminnan ja rokotushuollon myötä (Kauhanen ym. 2013, 72, 74). Suomen äitiys- ja imeväiskuolleisuusluvut ovat olleet maailman pienimpiä jo pitkään (Kauhanen ym. 2013, 76–77). Vuonna 2020 imeväiskuolleisuus oli 1,8 tuhatta elävänä syntynyttä lasta kohden (Suomen virallinen tilasto 2020b).

Suomen käymien sotien vaikutus väestön kokonaiskuolleisuuteen voimistui sotia seuranneina vuosikymmeninä. Muun muassa miesten itsemurhakuolleisuus nousi voimakkaasti, kohdistuen etenkin sodankäyneisiin sukupolviin (Kauhanen ym. 2013, 74). Myös työikäisten miesten sepevaltimotaudin ja sen aiheuttamien kuolemien määrät alkoivat kasvaa voimakkaasti (Kauhanen ym. 2013, 74). Tartuntatauti-, äitiys- ja lapsikuolleisuuden pienennyttyä, on terveyden edistäminen ja ennenaikaisen kuolleisuuden ehkäiseminen Suomessa suuntautunut pääasiassa työ- ja eläkeikäisten elintapasairauksien ehkäisemiseen ja aiempaa parempaan hoitoon.

Suomessa kaikki kansalaiset kattava sairausvakuutusjärjestelmä perustettiin vuonna 1964 (Matti 2012). Sen tarkoituksena oli tasata kansalaisille koituvia terveydenhuollon menoja ja terveysriskejä (Kauhanen ym. 2013, 77). Terveyden epätasainen jakautuminen on kuitenkin osoittautunut pitkäaikaiseksi ongelmaksi (Lahelma & Rahkonen 2017) ja Suomessa väestöryhmien väliset terveyserot ovat eurooppalaisittainkin suuria (OECD/EU 2016, 73). Naiset elivät vuonna 2020 keskimäärin seitsemän vuotta miehiä pidempään (Suomen virallinen tilasto 2020b), ja itä- ja pohjoissuomalaisten terveys vaikuttaa olevan huonompi kuin länsi- ja eteläsuomalaisten (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2012). Maakunnittain arvioituna ovat erot elinajanodotteissa suurempia miehillä kuin naisilla (Suomen virallinen tilasto 2020b). Sosioekonomisen eriarvoisuuden moniulotteista yhteyttä terveyteen ja kuolleisuuteen on dokumentoitu laajasti esimerkiksi Cutlerin ym. (2008; 2016) toimesta. Yksinkertaistaen sosioekonomisia terveyseroja kuvaa säännönmukaisuus: mitä alempi sosiaaliluokka, sitä heikompi terveys ja lyhyempi elinaika (Lahelma & Rahkonen 2017). Useissa tutkimuksissa on havaittu vanhempien huono-osaisuuden ja hyvinvoinnin ongelmien näkyvän myös seuraavan sukupolven terveydentilassa ja sosioekonomisessa asemassa (Paananen ym. 2012; Kauppinen ym. 2014; Ristikari ym. 2016). On kuitenkin viitteitä siitä, että terveyserojen kasvu olisi pysähtynyt, ainakin jos tarkastellaan tulo- ja koulutusryhmien välisiä eroja elinajanodotteessa (Tarkiainen ym. 2017).

Panostaminen terveyskäyttäytymisen, elintapojen ja elinympäristön parantamiseen on tuonut tulosta; monet kansansairaudet ovat vähentyneet Suomessa etenkin työikäisessä väestössä ja vaikutukset näkyvät myös kuolleisuudessa. Ikävakioitu kokonaiskuolleisuus on laskenut alle puoleen 1970-luvun tasosta, mikä selittyy pääasiassa tupakoinnin, verenpaineen ja seerumin kolesterolitason merkittävällä laskemisella (Jousilahti ym. 2019). 50 vuoden aikana työikäisten sydän- ja verisuonitautikuolleisuus on vähentynyt yli 80 % eli alle viidennekseen 1970-luvun tasosta (Jousilahti ym. 2019). Vaikka verenkiertoelinten sairaudet ovat edelleen yleisin kuolinsyy, sairastutaan niihin keskimäärin 20 vuotta vanhempina kuin 1970-luvulla (Jousilahti ym. 2019). Miesten tupakointi on vähentynyt melko tasaisesti 1970-luvulta lähtien, naisten tupakointi puolestaan yleistyi 1980-luvun puoliväliin saakka, jonka jälkeen se pysyi samalla tasolla kääntyen laskuun vasta 2000-luvun vaihteen jälkeen (Helldán & Helakorpi 2015, 13).

Tupakoinnin laskun lisäksi ei elintavoissa ole enää 2000-luvulla tapahtunut merkittäviä muutoksia (Koponen ym. 2018). Lähihistoriassa lääketieteen teknologian merkitys on kasvanut ja uusien menetelmien käyttöönotto ja soveltaminen ovat mahdollistaneet elinajanodotteen kasvun jatkumisen. Esimerkiksi verenkiertoelinten sairauksien ennaltaehkäisy ja hoito ovat viime vuosikymmeninä kehittyneet entistä tehokkaammaksi ja tarkemmaksi. Liuotus- ja lääkehoito sekä ohitusleikkaukset ja erityisesti pallolaajennukset ovat kehittyneet huomattavasti (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2020). Teknologian kehittyminen on vaikuttanut huomattavasti myös tapaturmisiin kuolemiin, niitä vähentäen (Huttunen 2003). 1970-luvun alkupuolella tieliikenneonnettomuuksissa kuoli vuosittain vielä yli 1000 ihmistä, mutta 1990-luvulla liikennekuolemien määrä oli enää alle puolet siitä (Suomen virallinen tilasto 2020c). Vuonna 2020 tieliikenneonnettomuuksissa kuoli yhteensä 220 ja loukkaantui 4 383 henkilöä (Suomen virallinen tilasto 2020c).

Vuonna 2020 Suomen virallisen tilaston (2020b) mukaan suomalaisten vastasyntyneiden poikien elinajanodote oli jo 79 vuotta ja tyttöjen 84,6 vuotta. Globaalit terveyshaasteet, kuten krooniset sairaudet, ympäristöterveys, ilmastonmuutos, mielenterveysongelmat sekä uudet tartuntataudit, vaikuttavat yhä enemmän myös suomalaisten terveyteen (Kauhanen ym. 2013, 75, 79). Kansainvälisesti katsottuna Suomi on kuitenkin vauras maa, joka pystyy tarjoamaan kansalaisille jatkossakin kattavia ja korkeatasoisia terveyspalveluja (Huttunen 2018).

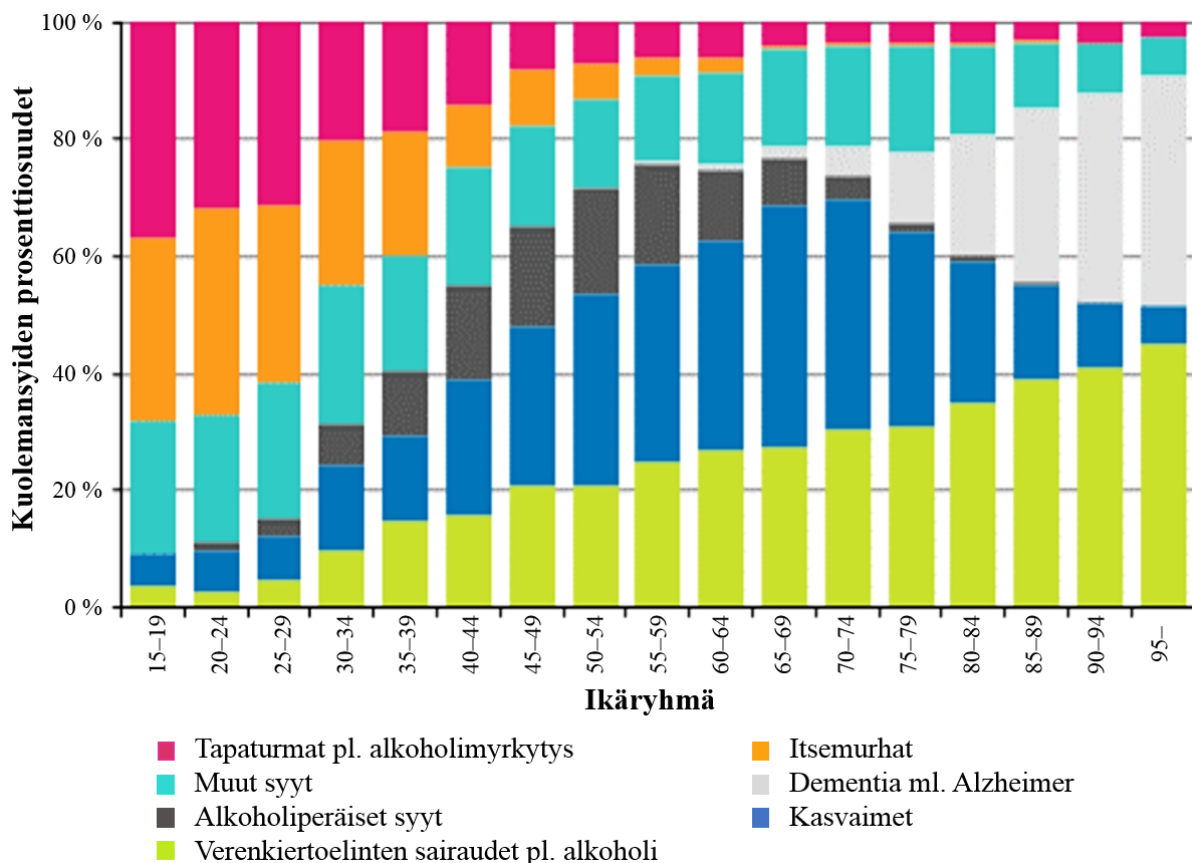
4.2 Yleisimmät kuolemansyyt

Iskeemiset sydänsairaudet aiheuttavat maailmanlaajuisesti eniten kuolemia. Ne aiheuttivat vuonna 2019 yhteensä 8,9 miljoonaa kuolemaa maailman 55,4 miljoonasta kuolemasta, eli 16 % (World Health Organization 2020). Vuodesta 2000 lähtien iskeemisiin sydänsairauksiin liittyvien kuolemantapausten määrä on kasvanut yli kahdella miljoonalla (World Health Organization 2020). Iskeemiset sydänsairaudet tarkoittavat sepelvaltimotaudin tai muun syyn aiheuttamaa tilaa, jossa sydänlihaksen verenkierto tai hapen saanti on rajoittunut ja tehokkuus heikentynyt, mikä aiheuttaa kouristuksia muistuttavan iskeemisen kivun tai sydäninfarktin (Porta & Last 2018). Jopa 70 % sydän- ja verisuonisairauksista on seurausta muokattavissa olevista riskitekijöistä, kuten korkeasta kolesterolista, ilmansaasteista, tupakoinnista, huonosta ravitsemuksesta, keskivartalolihavuudesta ja diabeteksestä (Yusuf ym. 2020).

Vuonna 2019 kaikista maailman kuolemista 55 % johtui kymmenestä yleisimmästä kuolemansyystä, joista seitsemän oli kroonisia sairauksia ja kolme tartuntatauteja (alahengitystieinfektiot, vastasyntyneen infektiot sekä ripulitaudit) (World Health Organization 2020). Aivoverenkiertohäiriöt aiheuttivat vuonna 2019 11 % ja keuhkohtaumatauti 6 % kaikista kuolemista ja kaikki krooniset sairaudet (edellisten lisäksi keuhkosityövät, muistisairaudet, diabetes sekä munuaissairaudet) aiheuttivat yhteensä 44 % kaikista kuolemista (World Health Organization 2020).

EU-maiden tyypillisimmät kuolemansyyt vuonna 2017 olivat verenkiertoelinten sairaudet (37 % kaikista kuolemista: iskeemiset sydänsairaudet 12 % kaikista kuolemista, aivoverenkiertohäiriöt 8 %), syövät (26 %: keuhko- 5 %, paksusuolen- 3 %, rinta- 2 % ja eturauhassyöpä 1 %), hengityselinsairaudet (8 %: COPD 3 %, keuhkokuume 2 %), muistisairaudet (5 %), ulkoiset syyt (6 %: itsemurha 1 %, onnettomuudet 3 %) ja diabetes (2 %) (OECD/EU 2020, 119). Suomessa tyypillisimmät kuolemansyyt ovat samankaltaisia muiden EU-maiden kanssa, mutta muistisairauksiin ja alkoholiperäisiin tauteihin liittyvät kuolemat ovat yleisempiä kuin EU-maissa keskimääräisesti. Vuonna 2020 Suomessa kuoli 55 488 ihmistä, mikä on 1 539 enemmän kuin vuonna 2019 (Suomen virallinen tilasto 2020b). Suomalaisten tyypillisimmät kuolemansyyt olivat vuonna 2019 verenkiertoelinten sairaudet (34 % kaikista kuolemista), kasvaimet (25 %), muistisairaudet (19 %), tapaturmat (4 %), hengityselinten sairaudet (4 %),

alkoholiperäiset taudit ja tapaturmainen alkoholimyrkytys (3 %) ja itsemurhat (1 %) (Suomen virallinen tilasto 2020a). Yli 15-vuotiaiden tyypillisimpien kuolemansyiden rakenne ikäryhmittäin Suomessa vuonna 2019 on esitetty kuviossa 2.



KUVIO 2. Kuolemansyiden rakenne ikäryhmittäin Suomessa vuonna 2019 (Suomen virallinen tilasto 2020a).

Suomessa vanhempien ikäryhmien kuolemansyyt hallitsevat koko väestön kuolemansyyjakaumaa. Kuolleiden mediaani-ikä oli vuonna 2020 miehillä 77,8 vuotta ja naisilla 85,5 vuotta (Suomen virallinen tilasto 2020b). Mediaani on keskiluku, joka kuvaa suuruusjärjestyksessä olevan jakauman keskimmäistä arvoa (Tilastokeskus 2021) eli puolet kuolleista on mediaani-ikää vanhempia ja puolet sitä nuorempia. Vuonna 2019 kaikista kuolleista työikäisiä (15–64-vuotiaita) oli 14 % (Suomen virallinen tilasto 2020a). Naisiin verrattuna työikäisten miesten kuolleisuus on yli kaksinkertaista, mutta sukupuolten välinen kuolleisuusero on kaventunut

viimeisen kymmenen vuoden aikana (Suomen virallinen tilasto 2020a). Miesten sydän- ja verisuonitauteihin liittyvä kuolleisuus on laskenut nopeammin kuin naisten, mikä on yksi tärkeimmistä eron kaventumista selittävästä muutoksista (Sundberg ym. 2018). Tupakointi, sydän- ja verisuonitautien riskitekijänä, on merkittävä syy sukupuolten välisten kuolleisuuserojen taustalla; Euroopassa tupakoinnin on arvioitu selittävän kuolleisuuseroista jopa 40–60 %:a (McCartney ym. 2011).

4.3 Elintapojen yhteys ennenaikaiseen kuolleisuuteen

Elintapojen ja ennenaikaisen kuolleisuuden yhteyttä on tutkittu paljon. Sekä perimä että ympäristötekijät vaikuttavat vahvasti kuolleisuusriskiin (Kujala ym. 2002). Kaksostutkimukset viittaavat siihen, että ihmisen eliniän vaihtelusta noin 25 % selittyisi perimällä (van den Berg ym. 2017), mutta laajan sukututkimuksen mukaan pitkäikäisyyden perinnöllisyys näyttää olevan vain 16 % (Kaplanis ym. 2018).

Vuonna 2019 maailmanlaajuisesti viisi merkittävintä ennenaikaisiin kuolemiin yhteydessä olevaa riskitekijää naisilla olivat korkea verenpaine (20 % kaikista naisten kuolemista), ruokavalion riskit (14 %), korkea paastoverensokeri (12 %), ilmansaasteet (11 %) ja korkea painoindeksi (10 %) (GBD 2019 Risk Factors Collaborators 2020). Miehillä viisi suurinta ennenaikaisiin kuolemiin yhteydessä olevaa riskitekijää olivat tupakointi (myös passiivinen ja purututpakka; 21 % kaikista miesten kuolemista), korkea verenpaine (18 %), ruokavalion riskit (15 %), ilmansaasteet (12 %) sekä korkea paastoverensokeri (11 %) (GBD 2019 Risk Factors Collaborators 2020). Eurooppalaisen aineiston mukaan merkittävimmät ennenaikaisiin kuolemiin yhteydessä olevat riskitekijät ovat tupakointi (31 %), ruokavalio (14 %), ylipaino ja lihavuus (10 %), korkea verenpaine (9 %), vähäinen fyysinen aktiivisuus (7 %) ja alkoholin käyttö (4 %) (Muller ym. 2016). Korkean tulotason maissa kaikista kuolemista noin 65 % on seurausta muokattavissa olevista riskitekijöistä, kuten tupakoinnista ja ravitsemukseen liittyvistä tekijöistä (Yusuf ym. 2020). Keskitulotason maissa vastaava osuus on noin 70 % ja alhaisen tulotason maissa jopa 80 % (Yusuf ym. 2020).

Laaja monikohorttitutkimus osoitti, että matala sosiaaliluokka rinnastuu terveysriskinä epäterveellisiin elintapoihin (Stringhini ym. 2017). Tutkimuksen mukaan alhainen sosioekonominen asema pienensi 40–85-vuotiaiden elinajanodotetta 2,1 vuotta; vastaavat menetetyt elinvuodet olivat tupakoinnille 4,8 vuotta, diabetekselle 3,9 vuotta, fyysiselle passiivisuudelle 2,4 vuotta, korkealle verenpaineelle 1,6 vuotta, ylipainolle 0,7 vuotta ja runsaalle alkoholin käytölle 0,5 vuotta (Stringhini ym. 2017). Sen lisäksi, että aikuisten sosioekonominen asema yksinään ennustaa kuolleisuutta (Elo ym. 2014; Stringhini ym. 2017), myös lapsuuden perheen korkeampi sosioekonominen asema on yhteydessä huomattavasti pienempään kuolleisuuteen yli 35-vuotiaana (Elo ym. 2014). Tulotason mukaiset terveyserot ovat Suomessa merkittävät; suurimmat terveyserot tuloryhmien välillä on menetetyissä elinvuosissa (Karvonen ym. 2017). 25-vuotiaan elinajanodotteessa on miehillä yli 10 vuoden ja naisilla yli 5 vuoden ero ylimmän ja alimman tulokymmenyksen välillä (Tarkiainen ym. 2017; Jousilahti ym. 2019).

Tupakointi on yksi merkittävimmistä riskitekijöistä, joka vaikuttaa kuolleisuuteen ja sairastavuuteen kaikissa elämänvaiheissa (Carter ym. 2015; Muller ym. 2016; World Health Organization 2018). Maailmanlaajuisesti tupakointi on yhteydessä yli 7 miljoonan ihmisen kuolemaan vuosittain (World Health Organization 2018). Tupakointi on yhteydessä etenkin syöpäkuolemiin (Jiang ym. 2018; Coleman ym. 2020). Tupakoinnin on useiden tutkimusten mukaan todettu vähentävän elinajanodotetta noin 5–10 vuotta tupakoinnin määrästä ja sukupuolesta riippuen (Sakata ym. 2012; Li ym. 2014; Stringhini ym. 2017). Vuonna 2018 suomalaisista 20–64-vuotiaista miehistä noin 15 % tupakoi päivittäin, naisilla vastaava luku oli noin 13 % (Jääskeläinen & Virtanen 2019). Suomessa tupakoinnin aiheuttamiin sairauksiin kuolee vuosittain arviolta lähes 5000 henkeä (Patja 2020). Syöpäkuolemista joka kolmas on tupakan aiheuttama, ja sydän- ja verenkiertoelinten sairauksista joka viides aiheutuu tupakoinnista (Patja 2020).

Myös runsaan alkoholin käytön (Roerecke & Rehm 2013) sekä ravitsemukseen ja ruokavalioon liittyvien riskitekijöiden on todettu olevan yhteydessä suurempaan kuolleisuuteen (McNaughton ym. 2012; Yusuf ym. 2020). Maailmanlaajuisesti vuonna 2017 ruokavalion riskeihin liittyi 11 miljoonaa kuolemaa, joista yli puolet johtui liiallisesta suolan saannista (3 miljoonaa kuolemaa), vähäisestä täysjyvätuotteiden saannista (3 miljoonaa kuolemaa) ja vähäisestä hedelmien saannista (2 miljoonaa kuolemaa) (GBD 2017 Diet Collaborators 2019). Ravitsemuksen keskeisimmät riskit liittyvät kehittyneissä maissa liialliseen energiansaantiin, kasvien

niukkuuteen ruokavaliossa, runsaaseen eläinperäisten tuotteiden käyttöön sekä ravintoarvoiltaan köyhiin ja pitkälle käsiteltyihin ruokiin, jotka sisältävät runsaasti suolaa, sokeria sekä tyydyttynyttä rasvaa (Popkin ym. 2012).

Loefin ja Walachin (2012) meta-analyysin perusteella tupakoinnin, ravitsemuksen sekä alkoholin käytön lisäksi myös ylipaino sekä fyysinen aktiivisuus ovat yhteydessä kuolleisuusriskiin. Heidän mukaansa henkilöillä, joilla on terveelliset elintavat, on jopa 66 % pienempi kokonaiskuolleisuusriski kuin epäterveelliset elintavat omaavilla henkilöillä. Näyttö painoindeksin ja kuolleisuusriskin välisestä yhteydestä on kuitenkin hieman ristiriitaista. Useissa seurantatutkimuksissa painoindeksin on raportoitu olevan yhteydessä kuolleisuusriskiin (Zheng ym. 2011; Klatsky ym. 2017), mutta Nordströmin ym. (2016) tutkimuksen mukaan painoindeksiltään eroavien identtisten kaksosten välillä ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää eroa kuolleisuusriskissä.

Vaikka systemaattisissa kirjallisuuskatsauksissa ja meta-analyyseissä on todettu sekä yhteys (Nocon ym. 2008) että annos-vastesuhde (Löllgen ym. 2009) itsearvioitun fyysisen aktiivisuuden määrän sekä pienemmän kuolleisuusriskin välillä, ei fyysisen aktiivisuuden ja kuolleisuusriskin yhteys ole kuitenkaan yksiselitteinen. Suomalaisen kaksoskohortin aineistoon pohjautuvissa tutkimuksissa ei todettu liikunta-aktiivisuuden suhteen toisistaan eroavilla identtisillä kaksosilla eroa kuolleisuusriskissä, kun taas ei-identtisillä kaksosilla korkeampi vapaa-ajan fyysinen aktiivisuus oli yhteydessä pidempään elinikään (Kujala ym. 2002; Karvinen ym. 2015). Toisaalta ruotsalaistutkimuksessa on todettu fyysisesti aktiivisilla identtisillä kaksosilla 20 % pienempi kuolleisuusriski heidän vähän liikkuviin sisaruksiinsa verrattuna; ei-identtisillä kaksosilla yhteys ei ollut yhtä selvä (Carlsson ym. 2007).

Eri elintavat ovat myös yhteydessä keskenään. Esimerkiksi fyysinen aktiivisuus on yhteydessä tupakoinnin (Kaczynski ym. 2008) sekä alkoholinkulutuksen (Choi ym. 2010; Lisha ym. 2011; Werneck ym. 2019) kanssa. Systemaattisen katsauksen mukaan runsas fyysinen aktiivisuus on useimmiten yhteydessä vähäisempään tupakointiin, mutta etenkin nuorten ja miesten keskuudessa yhteys on heikompi tai voi olla myös positiivinen (Kaczynski ym. 2008). Kohtalainen alkoholinkulutus on yhteydessä runsaampaan fyysiseen aktiivisuuteen alkoholia

käyttämättömiin ja melkein päivittäin alkoholia käyttäviin verrattuna (Choi ym. 2010). Runsas fyysinen aktiivisuus on positiivisesti yhteydessä alkoholin käyttöön alle 50-vuotiailla, mutta ei yli 50-vuotiailla (Lisha ym. 2011). Myös kehonkoostumuksen ja tupakoinnin (Dare ym. 2015) sekä alkoholinkulutuksen (Traversy & Chaput 2015) välillä on todettu yhteys. Lisäksi epäterveellisten elintapojen on todettu klusteroituvan, etenkin heikommassa sosiaalisessa asemassa olevilla (Noble ym. 2015; Thebault ym. 2018). Nämä päällekkäiset elintapojen väliset yhteydet vaikeuttavat yhteyksien määrittämistä ja tulkitsemista.

Lesken kuolleisuusriski on korkeampi naimisissa oleviin verrattuna (Moon ym. 2011; Roelfs ym. 2012; Blanner ym. 2020). Ikääntyneillä avioliitto tai puolison tuki pienentää kuolleisuusriskiä molemmilla sukupuolilla 5–15 % naimattomiin verrattuna (Manzoli ym. 2007). Bulandan ym. (2016) tutkimuksen mukaan leskeksi jääminen tai ero lisää ainoastaan ikääntyneiden miesten kuolleisuusriskiä, naisilla vastaavaa yhteyttä ei todettu.

5 EPIGENEETTISEN IKÄÄNTYMISEN YHTEYS KUOLLEISUUTEEN

Tutkimuksissa on havaittu, että epigeneettinen ikääntymisnopeus ennustaa kuolleisuusriskiä paremmin kuin kronologinen ikä (Marioni ym. 2015; Christiansen ym. 2016). Meta-analyysi, jossa on mukana 12 eri kohorttia, osoitti, että Horvathin (2013) ja Hannumin ym. (2013) epigeneettiset kellot pystyvät ennustamaan kokonaiskuolleisuuden riippumatta tyypillisistä riskitekijöistä, kuten painoindeksi, koulutus, tupakointi, fyysinen aktiivisuus sekä alkoholinkäyttö (Chen ym. 2016).

Kronologista ikää korkeamman DNA-metylaatioiän on todettu lisäävän ennenaikaisen kuoleman riskiä. Yhteyttä on tutkittu enimmäkseen ensimmäisen sukupolven epigeneettisillä kelloilla. Saaduista tuloksista on tehty useampia meta-analyysejä, joista kattavin tutkimusjoukko on Fransquetin ym. (2019) analyysissä. Tutkimusjoukko muodostui seitsemän tutkimuksen ja metatutkimuksen 17 erillisestä kohortista, mukaan lukien muun muassa Marionin ym. (2015) sekä Chenin ym. (2016) metatutkimukset. Fransquetin ym. (2019) meta-analyysin mukaan kronologiseen ikään verrattuna viisi vuotta korkeampi epigeneettinen ikä on yhteydessä 8–15 % korkeampaan kuolleisuusriskiin. Myös Christiansenin ym. (2016) yksilöanalyysit sisältyvät Fransquetin ym. (2019) meta-analyysiin, mutta lisäksi he vertasivat kaksosia pareittain. Kaksosanalyysien mukaan epigeneettisesti vanhemmalla kaksosella oli yli kaksinkertainen kuolleisuusriski nuorempaan kaksoseen verrattuna ja annos-vastemallin mukaisesti todennäköisyys kuolla ensin kasvoi pariin välisen epigeneettisen ikäeron kasvaessa. Tutkimuksessa kahdeksan vuoden kuolleisuusseurannan aikana ainakin toinen kaksosista kuoli 36 parissa seurantaan valituista 43 kaksosparista. Tutkittavien keskimääräinen ikä oli noin 76 vuotta.

GrimAge- epigeneettinen kello on julkaistu vasta vuonna 2019, joten tuloksia sitä käyttäneistä tutkimuksista on vielä hyvin rajallisesti. Lu ym. (2019) ovat arvioineet tutkimuksessaan niiden henkilöiden kuolleisuusriskejä, joiden epigeneettinen ikääntyminen on poikkeuksellisen nopeaa tai hidasta. Heidän mukaansa keskiavertoon verrattuna nopeasti ikääntyvillä (95-persentiili) on kaksinkertainen kuolleisuusriski, kun taas hitaasti ikääntyvillä kuolleisuusriski on keskiavertoa puolet pienempi. McCroryn ym. (2021) tutkimuksessa, jossa tutkittavien keski-ikä oli 62,2 vuotta ja kymmenen vuoden seuranta-aikana kuoli tutkittavista 7,2 %, oli epigeneettisistä

kelloista ainoastaan GrimAge- epigeneettisellä kellolla laskettu ikääntymisnopeus yhteydessä kohonneeseen kuolleisuusriskiin. Muilla epigeneettisillä kelloilla (Hannum, Horvath ja PhenoAge) laskettu epigeneettinen ikääntymisnopeus ei ennustanut tilastollisesti merkitsevästi kuolleisuutta. Tutkimuksen mukaan GrimAge- epigeneettiseen kelloon pohjautuvan epigeneettisen ikääntymisnopeuden kasvaessa yhden keskihajonnan (kh 7,6) verran on kuoleman riski noin kaksinkertainen. Hillaryn ym. (2020) tutkimustulos on yhdenmukainen McCroryn ym. (2021) tuloksen kanssa; seuranta-aika oli heillä 13 vuotta.

Tutkimusasetelmat ja -menetelmät eivät kuitenkaan ole tutkimuksissa täysin yhtenäiset. Esimerkiksi Fransquetin ym. (2019) meta-analyysiin sisältyy pääasiassa tutkimuksia, joiden kohortit muodostuvat sekä miehistä että naisista, mutta mukana on myös yksi pelkästään miehistä muodostuva tutkimuskohortti. Muissa kuolleisuustutkimuksissa kohortit muodostuvat sekä naisista että miehistä, ja yleisesti ottaen mitä vanhempia tutkittavat ovat, sitä suurempi on naisten osuus kohortissa (Christiansen ym. 2016; Hillary ym. 2020; McCrory ym. 2021). Myös seuranta-aikojen pituuksissa on merkittävää vaihtelua; kuolleisuusseurantojen pituudet vaihtelivat kahden ja 21 vuoden välillä (Fransquet ym. 2019). Lisäksi kohorttien välillä on eroja esimerkiksi tutkittavien i'issä, sairastavuudessa sekä rodussa ja etnisyydessä, mutta tutkittavien sosio-ekonominen asema huomioitiin ainoastaan Marionin ym. (2015) tutkimuksessa.

Epigeneettistä ikää pidetään mahdollisena ennusteena kokonaiskuolleisuuden lisäksi myös tiettyihin sairauksiin liittyvään kuolleisuuteen (Zhang ym. 2016). Zheng ym. (2016) ovat havainneet epigeneettisen iän ennustavan melko hyvin sekä syöpään sairastuvuutta että syöpäkuolleisuutta. Heidän mukaansa kronologiseen ikään verrattuna vuotta korkeampi epigeneettinen ikä (Δ ikä) on yhteydessä 6 % suurempaan riskiin sairastua syöpään kolmen vuoden aikana ja 17 % suurempaan riskiin kuolla syöpään seuraavien viiden vuoden aikana. Perna ym. (2016) saivat yhdenmukaisia tutkimustuloksia sekä kokonaiskuolleisuuden että syöpäkuolleisuuden osalta. Lisäksi heidän mukaansa Horvathin (2013) epigeneettinen kello pystyy ennustamaan verenkiertoelinten sairauksiin liittyvää kuolleisuutta.

Kuolleisuutta voidaan arvioida DNA:n metyloitumisen perusteella käyttämättä kuitenkaan varsinaisia epigeneettisiä kelloja, joilla määritetään yksilön biologinen ikä vuosissa. Zhangin ym.

(2017) tutkimusryhmä on kehittänyt kuolleisuusriskinarviointimallin, joka pohjautuu DNA:n metyloitumiseen kymmenessä kokonaiskuolleisuuteen yhteydessä olevassa CpG-kohdassa. Tutkittavalle lasketaan kokonaiskuolleisuus riskipisteet (0–10) sen mukaan, kuinka monessa CpG-kohdassa hänellä on poikkeava DNA:n metylaatioaste. Riskipisteen on todettu olevan vahva ennustaja kokonaiskuolleisuuden, verenkierroelinten sairauksiin liittyvän kuolleisuuden sekä syöpäkuolleisuuden kohdalla (Zhang ym. 2017).

6 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena oli selvittää, ennustaako toisen sukupolven GrimAge- epigeneettisen kellon pohjalta laskettu epigeneettinen ikääntymisnopeus kuolleisuutta. Lisäksi tarkasteltiin ja vertailtiin, oliko epigeneettisellä iällä yhteyttä kuolleisuuteen, kun perimä ja lapsuusajan ympäristötekijöitä kontrolloitiin kaksosmallinnuksella. Tietävästi vastaava kaksosasetelma on ollut aiemmin käytössä ainoastaan yhdessä tutkimuksessa. Tarkastelun kohteena oli myös, selittävätkö tutkittavien tietyt elintapatekijät mahdollista kaksosparien välistä eroa epigeneettisessä iässä. Epigeneettisen iän arvioimiseen käytetty GrimAge- epigeneettinen kello perustuu DNA:n metyloitumiseen. Epigeneettisen ikääntymisnopeuden arvioimiseksi ikää verrattiin tutkittavien kronologiseen ikään. Kuolleisuustarkasteluissa käytettiin vertailun vuoksi myös Horvathin ensimmäisen sukupolven epigeneettistä kelloa. Tutkimuksessa käytettiin ainutlaatuista Suomen ikääntymistä käsittelevän kaksostutkimuksen Finnish Twin Study on Aging (FITSA) -projektin naisista koostuvaa aineistoa.

Tutkimuskysymykset:

1. Ennustaako epigeneettinen ikääntymisnopeus kuolleisuutta?
2. Millä todennäköisyydellä epigeneettisesti vanhempi kaksospari kuolee aiemmin?
3. Selittääkö vapaa-ajan fyysinen aktiivisuus, painoindeksi tai tupakointi epigeneettisen ikääntymisnopeuden eroa kaksosten välillä?

7 TUTKIMUKSEN AINEISTO JA MENETELMÄT

7.1 Tutkimusasetelma ja tutkittavat

Tässä pro gradu -tutkielmassa käytettiin Suomen kaksoskohortin alaotosta: FITSA-projektin aineistoa. FITSA-tutkimuksen tarkoitus on geneettisten tekijöiden ja ympäristötekijöiden osuuden selvittäminen vanhuuden toiminnanvajausten synnyssä (Tiainen ym. 2004).

FITSA:n osallistujat rekrytoitiin Helsingin yliopiston kansanterveystieteenlaitoksen Suomen kaksoskohorttitutkimukseen (Finnish Twin Cohort Study) osallistuneista 13 888 aikuisesta kaksosparista, joiden tsygositeetti oli määritetty validoidulla kyselylomakkeella tutkimuksen alkututkimuksessa vuonna 1975 (Kaprio & Koskenvuo 2002; Kaprio ym. 2019). Kyselylomakkeen mukaan kaksosparit luokiteltiin monotsygoottisiksi (MZ), ditsygoottisiksi (DZ) sekä tsygositeetin suhteen epävarmoiksi (XZ). Syksyllä 2000 lähetettiin iän ja tsygositeetin perusteella 178 MZ, 212 DZ ja 24 XZ naiskaksosparille kutsu osallistua FITSA-tutkimukseen (Tiainen ym. 2004). Rekrytointikirjeen yhteydessä kartoitettiin kyselylomakkeella kaksospareilta heidän toimintakyk्याnsä sekä halua osallistua tutkimukseen. Syyt osallistumattomuuteen olivat, että yksi tai molemmat kaksosista eivät halunneet osallistua tutkimukseen (50 MZ, 51 DZ ja 5 XZ kaksosparia), heillä oli huono terveydentila (28 MZ, 52 DZ ja 5 XZ kaksosparia) tai rekrytoitava oli kuollut (2 MZ, 3 DZ ja 1 XZ). Laboratoriotutkimuksiin osallistui 98 MZ, 106 DZ ja 13 XZ kaksosparia. Kansanterveyslaitoksen isyystestilaboratorio Helsingissä analysoi laskimoverinäytteestä uutetun DNA:n avulla XZ kaksosparien tsygositeetit, minkä seurauksena neljä XZ kaksosparia luokiteltiin identtisiksi kaksosiksi ja yhdeksän ei-identtisiksi kaksosiksi. Laboratoriotutkimusten yhteydessä tarkennettiin kaksosparien tsygositeetti DNA määrittämisin. Lopullinen tutkimusjoukko koostui 103 identtisestä (MZ) kaksosparista ja 114 ei-identtisestä (DZ) kaksosparista. Tämän opinnäytetyön aineistoon otettiin mukaan kaikki ne tutkittavat, joille voitiin laskea laboratoriotestien yhteydessä otetun verinäytteen perusteella GrimAge-algoritmilla epigeneettinen ikä (n = 413).

FITSA-tutkimus tehtiin Helsingin julistuksen mukaisesti hyvän tieteellisen ja kliinisen tutkimustavan periaatteita noudattaen. Ennen laboratoriotutkimuksia osallistujille kerrottiin

mittauksista, koehenkilöt antoivat kirjallisen suostumuksen ja Keski-Suomen keskussairaalan eettinen toimikunta on antanut puoltavan lausunnon tutkimusprotokollasta (K-S shp: Dnro 24/2000). Molemmat kaksosparin yksilöt tulivat laboratorioon samanaikaisesti ja saivat yksilöllisen testiaikataulunsa. Kaikille koehenkilöille tehtiin 30 minuutin kliininen tutkimus, minkä lisäksi lääkäri haastatteli ja tutki osallistujat sekä vahvisti heidän aiemmin ilmoittamansa sairaudet ja lääkitykset (Tiainen ym. 2004).

7.2 Tutkimusmenetelmät ja muuttujat

Epigeneettinen ikä ja ikääntymisnopeus. Laboratoriotestien yhteydessä tutkittavista otettiin laskimoverinäyte epigeneettisen iän määrittämiseksi. Kokoverinäytteestä standardiprotokollan mukaan eristetty DNA käsiteltiin bisulfaattikonversiolla, ja DNA-näytteet analysoitiin käyttäen Illuminan HumanMethylation EPIC BeadChip -mikrosirutekniikkaa valmistajan ohjeiden mukaisesti (kuvattu tarkemmin: Kankaanpää 2021). Bisulfaatit deaminoivat sytosiinit urasiiliksi, mutta jättävät 5-metyylisytosiinit ennalleen (Mensaert ym. 2014). Epigeneettinen ikä vuosissa laskettiin verinäytteestä eristetyn DNA:n metyloitumisen perusteella. Epigeneettisen iän laskemiseen käytettiin Horvath-algoritmia (2013) sekä GrimAge-algoritmia (Lu ym. 2019), joiden ohjelmistot ovat vapaasti saatavilla (<https://dnamage.genetics.ucla.edu/new>). Tutkittavien epigeneettinen ikääntymisnopeus määritettiin lineaarisen regressiomallin jäännöksistä (residuaalit) vertaamalla tutkittavien epigeneettistä ikää heidän kronologiseen ikäänsä (Lu ym. 2019).

Kuolleisuus. Kuolleisuustiedot saatiin Väestörekisterikeskuksesta. Yksilöllinen kuolleisuuden seuranta-aika alkoi siitä päivästä, jolloin tutkittava osallistui laboratoriomittauksiin ja hänestä otettiin verinäyte epigeneettisen iän määrittämiseksi (vuosina 2000–2001). Kuolleisuusrekisteri luettiin 31.12.2018, joka on myös elossa olevien seuranta-ajan päättymispäivä. Seuranta-aika ilmoitettiin päivissä. Laskettaessa seuranta-aika vuosissa, käytettiin vuoden pituutena 365,25 päivää, koska joka neljäs vuosi on karkausvuosi.

Tutkittavien *pituus* ja *kehon massa* mitattiin laboratoriossa. *Painoindeksi (BMI)* laskettiin jakamalla paino pituuden neliöllä (kg/m^2).

Fyysinen aktiivisuus. Itse arvioitu fyysinen aktiivisuus mitattiin käyttämällä 7-luokkaista Grimbyn asteikkoa (Grimby & Frändin 2018) vähäisin muutoksin. Kyselylomakkeessa käytetyt luokat olivat: 0 – ei muuta liikuntaa kuin välttämättömät päivittäiset toiminnot, 1 - kevyttä kävelyä ja ulkoilua 1-2 kertaa viikossa, 2 – kevyttä kävelyä ja ulkoilua useita kertoja viikossa, 3 – 1-2 kertaa viikossa liikuntaa, joka aiheuttaa jonkin verran hengästymistä ja hikoilua, 4 – useita kertoja viikossa liikuntaa, joka aiheuttaa jonkin verran hengästymistä ja hikoilua, 5 – kuntoliikuntaa useita kertoja viikossa siten, että hikoilee ja hengästyy melko voimakkaasti, 6 – kilpaurheilua ja säännöllistä harjoittelua. Tilastollisissa analyyseissä käytettiin jatkuvaa seitsemän luokkaista muuttujaa, mutta taustatietojen kuvaamista varten fyysisen aktiivisuuden seitsemän luokkaa yhdistettiin kolmeksi luokaksi: 0 – vähän aktiivinen (alkuperäiset luokat 0–1), 1 – jonkin verran aktiivinen (luokat 2–3) sekä 2 – aktiivinen (luokat 4–6).

Tutkittavien *tupakointia* koskevat tiedot saatiin kyselylomakkeen vastausten perusteella. Kyselylomakkeessa tupakointistatus kartoitettiin kolmiluokkaisena luokitteluasteikollisena muuttujana: oletteko polttanut koko elämäenne aikana enemmän kuin 5–10 askia savukkeita, poltatteko tai oletteko joskus polttanut savukkeita säännöllisesti ja poltatteko edelleen savukkeita säännöllisesti. Vastausten perusteella tutkittavat jaettiin kolmeen ryhmään: 1 – ei ole koskaan tupakoinut, 2 – lopettanut tupakoinnin, 3 – tupakoi. Kyselylomakkeessa kartoitettiin myös poltettujen savukkeiden keskimääräinen päivittäinen määrä sekä nykyisiltä tupakoitsijoilta, että tupakoinnin lopettaneilta. Askivuosi laskettiin päivittäin poltettujen savukkeiden määrä jaettuna 20 (savukkeiden määrä askissa) kerrottuna 365 (päivien määrä vuodessa). Elossaoloaikojen mallinnuksessa käytettiin tupakoinnin askivuosi-muuttujaa.

Alkoholin käyttö kartoitettiin kyselylomakkeessa juomatyypeittäin niiden tiheyden ja määrän mukaan. Vastaukset muunnettiin grammoiksi puhdasta etanolia päivässä.

Kyselylomakkeen ja kliinisen tutkimuksen avulla tutkimusjoukkoa kuvaavina taustatietoina selvitettiin myös *ikä*, *kroonisten sairauksien lukumäärä*, *siviilisäätö* sekä *koulutus*. Tutkittavilta kysyttiin kyselylomakkeessa: Mitä kouluja ja kursseja olette käynyt? Vastausvaihtoehdot olivat 1 - vähemmän kuin kansakoulu, 2 – kansakoulu tai vastaava, 3 – kansakoulu tai vastaava sekä vähintään yhden vuoden ammattikoulutus, 4 – keskikoulu tai kansankorkeakoulu, 5 –

keskikoulu tai kansankorkeakoulu sekä vähintään yhden vuoden ammattikoulutus (myös lukio-opinnot), 6 – ylioppilastutkinto, 7 – ylioppilastutkinto sekä vähintään yhden vuoden ammattikoulutus (myös korkeakouluopinnot), 8 – korkeakoulu- tai yliopistotutkinto, 9 – muu koulutus, mikä? ja niistä tuli valita vain yksi. Siviilisääty kysyttiin muodossa 1 – naimaton, 2 – naimisissa, 3 – uusissa naimisissa, 4 – avoliitossa, 5 – eronnut tai asumuserossa sekä 6 – leski. Taustatietojen kuvaamista varten kuusi siviilisäädyn luokkaa yhdistettiin kahdeksi luokaksi niin, että luokat 1, 5 ja 6 yhdistettiin ei parisuhteessa -luokaksi ja luokat 2, 3 ja 4 parisuhteessa-luokaksi.

7.3 Tutkimusaineiston tilastolliset analyysit

Tutkielman tilastolliset analyysit tehtiin IBM SPSS Statistics 26.0 -ohjelmalla. Tilastollisen merkitsevyyden raja-arvona pidettiin $p < 0,05$ kaikissa testeissä ja luottamusväli laskettiin luottamustasolla 95 %:a. Aineiston perus- ja taustatietojen kuvaamisessa käytettiin keskiarvoja, keskihajontoja, frekvenssejä sekä niiden prosenttiosuuksia. Jatkuvien muuttujien normaalijakautuneisuutta tarkasteltiin graafisten kuvaajien perusteella silmämääräisesti, Shapiron-Wilkin testillä sekä tulkitsemalla jakaumien vinoutta ja huipukkuutta.

Epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kuolleisuusriskin yhteyttä tarkasteltiin mallintamalla elossaoloaikoja käyttäen Cox regressioanalyysiä. Cox regressioanalyysiä kutsutaan myös verrannollisten riskien malliksi (proportional hazards model). Ensimmäisessä analyysivaiheessa tutkittiin epigeneettisen ikääntymisnopeuden yhteyttä elossaolokaan ilman vakioivia tekijöitä. Toisessa vaiheessa Cox regressioanalyysi suoritettiin kuten edellä, mutta vakioiden kukin elintapamuuttuja erikseen. Kolmannessa vaiheessa malliin otettiin mukaan useampia eri elintapatekijöitä samanaikaisesti ja tutkittiin epigeneettisen ikääntymisnopeuden yhteyttä elossaolokaan, niin että muiden mallin muuttujien vaikutus on vakioitu. Kaplanin-Meierin elinaika-analyysillä ja log-rank-testillä arvioitiin kuoleman todennäköisyyksiä seuranta-aikana sekä epigeneettisen ikääntymisnopeuden tertiilien välisiä eroja. Kuolleisuusanalyysissä kaksosia käsiteltiin toisistaan riippumattomina yksilöinä.

Epigeneettisesti vanhemman kaksosparin todennäköisyyttä kuolla ennen sisarustaan arvioitiin kahden riippuvan otoksen McNemar-testillä, joka sopii käytettäväksi kaksiarvoisten muuttujien

kanssa. Riippuvan otoksen t-testillä eli parittaisella t-testillä arvioitiin selittävätkö elintavat epigeneettisen ikääntymisnopeuden eroa kaksosten välillä. Parittaiset t-testit tehtiin sekä kaikille ikääntymisnopeuden suhteen erilaisille kaksosille että ikääntymisnopeuden suhteen erilaisille identtisille (MZ) ja ei-identtisille (DZ) kaksosille erikseen.

8 TULOKSET

Tutkimusaineisto koostui 413 naistutkittavasta, joiden taustatiedot sekä epigeneettisen iän ja ikääntymisnopeuden keskiarvot seurannan alussa on esitetty taulukossa 2. Tutkittavat olivat alkumittauksissa iältään 63–76-vuotiaita. Tutkittavien epigeneettinen ikä oli keskimäärin noin yhdeksän vuotta pienempi kuin heidän kronologinen ikänsä. Tutkittavat olivat painoindeksin mukaan keskimäärin lievästi ylipainoisia (keskiarvo 27,9 kg/m², keskihajonta 4,7 kg/m²).

TAULUKKO 2. Tutkittavien (n = 413) taustatiedot, epigeneettinen ikä ja ikääntymisnopeus

Muuttuja	Keskiarvo	Keskihajonta
Kronologinen ikä (vuosia)	68.6	3.4
Epigeneettinen ikä (vuosia)		
GrimAge	59.9	4.4
Horvath	66.9	5.7
Epigeneettinen ikääntymisnopeus		
GrimAge	-0.046	3.2
Horvath	-0.029	4.5
Painoindeksi (kg/m ²)	27.9	4.7
Fyysinen aktiivisuus (n, %)		
Vähän aktiivinen	117 (28.3)	
Jonkin verran aktiivinen	207 (50.1)	
Aktiivinen	89 (21.5)	
Tupakointi (n, %) ^A		
Ei tupakoi	362 (87.7)	
Lopettanut	30 (7.3)	
Tupakoi	20 (4.8)	
Askivuodet	2.0	7.5
Alkoholi (g/vrk)	3.1	5.7
Parisuhde (n, %) ^A		
Parisuhteessa	210 (51.0)	
Ei parisuhteessa	202 (49.0)	
Koulutusvuodet ^B	8.6	3.0
Kroonisten sairauksien lukumäärä	2.0	1.5

^A 1 puuttuva tieto ^B n = 402.

Luvut ilmaisevat keskiarvoa ja keskihajontaa ellei toisin mainita.

8.1 Yksilöanalyysit

Tutkimuksen seuranta-aikana kuoli yhteensä 156 tutkittavaa eli noin 38 % kaikista tutkittavista. Keskimääräinen seuranta-aika oli 15,8 vuotta ja seuranta-ajan vaihteluväli oli 0,2–18,3 vuotta. Tutkittavilla korkeampi GrimAge-algoritmilla laskettu epigeneettinen ikääntymisnopeus oli yhteydessä kohonneeseen kuolleisuusriskiin (taulukko 3). Epigeneettisen ikääntymisnopeuden (GrimAge) kasvaessa yhden keskihajonnan (3,19) verran kasvoi kuoleman riski 28 % (95 %:n luottamusväli 11–47 %). Mallit, joissa oli kovariaattina eli selittävänä muuttujana ikääntymisnopeuden lisäksi yksi elintapamuuttuja kerrallaan, olivat kaikki tilastollisesti merkitseviä. Näillä malleilla arvioituna epigeneettisen ikääntymisnopeuden kasvaessa yhden keskihajonnan verran kasvoi kuoleman riski noin 24–30 %. Ikääntymisnopeuden kasvaessa yhden keskihajonnan verran kuoleman riski kasvoi puolestaan 31 % (95 %:n luottamusväli 10–56 %), kun mallissa kovariaatteina olivat ikääntymisnopeuden lisäksi sekä tupakoinnin määrä askivuosina että alkoholin käyttömäärä.

Cox regressioanalyysit tehtiin vertailun vuoksi myös Horvathin (2013) algoritmilla lasketulla epigeneettisellä ikääntymisnopeudella. Analyysin mukaan epigeneettisen ikääntymisnopeuden (Horvath) kasvaessa yhden keskihajonnan (4,54) verran kasvoi kuoleman riski 4 % (95 %:n luottamusväli 1–22 %). Epigeneettisen ikääntymisnopeuden (Horvath) yhteys kuolleisuusriskiin ei ollut tilastollisesti merkitsevä yhdessäkään mallissa (taulukko 3).

Muuttujien jakaumien normaalisuustarkasteluissa ilmeni, että epigeneettisen ikääntymisnopeuden (GrimAge) jakauman huipukkuuden arvo oli noin 2,5. Tulosten luotettavuuden arvioimiseksi muuttujalle tehtiin neliöjuurimuunnos, jolla saatiin jakauma normaaliseksi, sekä samat analyysit kuin alkuperäisellä muuttujalla. Cox regressioanalyysin tulosten mukaan neliöjuurimuunnetun epigeneettisen ikääntymisnopeuden yhteys kuolleisuusriskiin yhdellä tai kahdella elintapamuuttujalla vakioituissa malleissa oli tilastollisesti merkitsevä ($p \leq 0,005$), kuten alkuperäisellä ikääntymisnopeudellakin. Epigeneettisen ikääntymisnopeuden (GrimAge) yhteys kuolleisuusriskiin ei ollut tilastollisesti merkitsevä, kun malli vakioitiin kaikilla elintapatekijöillä (taulukko 3), mutta neliöjuurimuunnetun epigeneettisen ikääntymisnopeuden yhteys

kuolleisuusriskiin oli tilastollisesti merkitsevä myös kaikilla elintapatekijöillä vakioidussa mallissa (HR = 1,377 [1,009–1,881]).

TAULUKKO 3. Epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kuolleisuuden riskitiheyksien suhteet (hazard ratio, HR) 95 %:n luottamusväleinen elintapatekijät (tupakointi, painoindeksi, fyysinen aktiivisuus, alkoholin kulutus, kroonisten sairauksien määrä, koulutusvuodet sekä parisuhde) huomioiden.

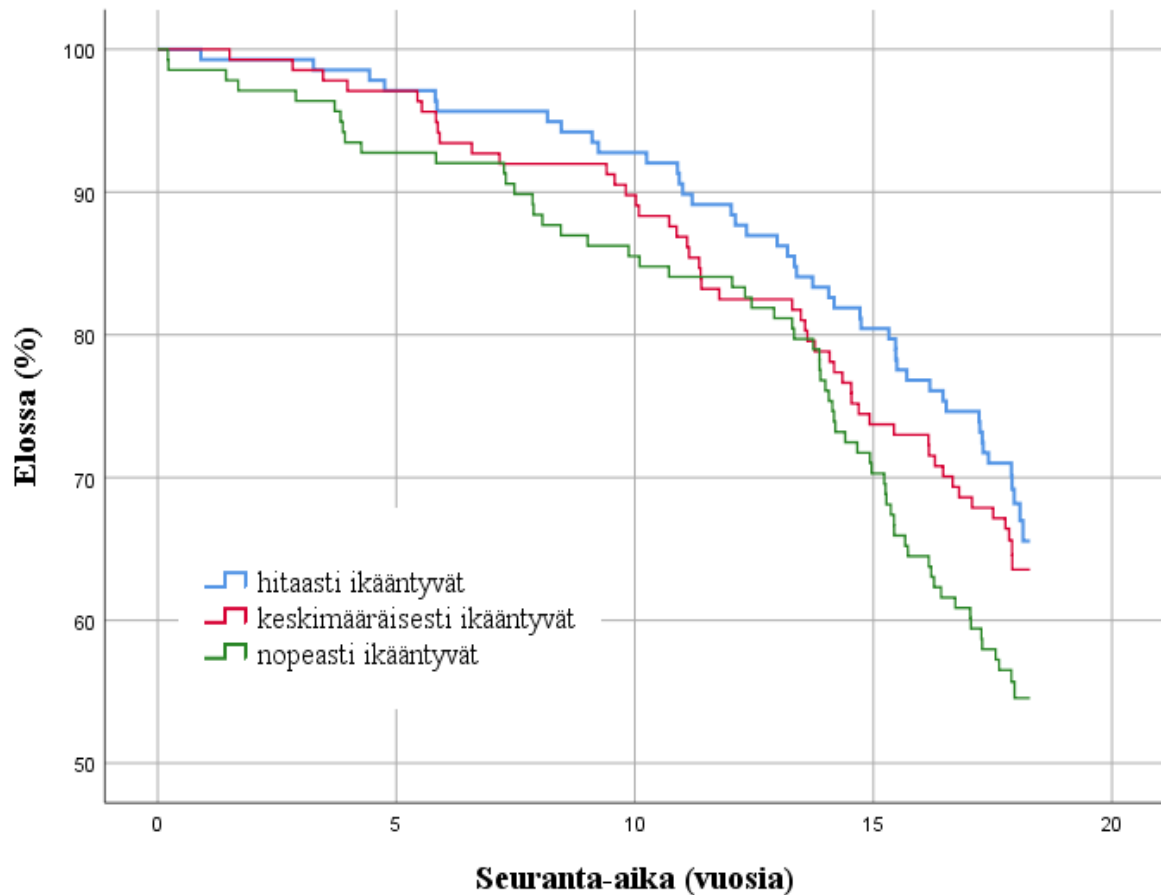
Malli	Riskitiheyksien suhde GrimAge (CI95)	Riskitiheyksien suhde Horvath (CI95)
Epigeneettinen ikääntymisnopeus	1.277 (1.109–1.471)	1.040 (0.891–1.215)
Epigeneettinen ikääntymisnopeus + tupakointi	1.297 (1.086–1.548)	1.039 (0.889–1.215)
Epigeneettinen ikääntymisnopeus + painoindeksi	1.278 (1.112–1.470)	1.055 (0.903–1.233)
Epigeneettinen ikääntymisnopeus + fyysinen aktiivisuus	1.241 (1.075–1.433)	1.041 (0.891–1.217)
Epigeneettinen ikääntymisnopeus + alkoholin kulutus	1.298 (1.126–1.496)	1.037 (0.888–1.211)
Epigeneettinen ikääntymisnopeus + kroonisten sairauksien määrä	1.257 (1.088–1.453)	1.050 (0.899–1.227)
Epigeneettinen ikääntymisnopeus + koulutusvuodet	1.251 (1.080–1.450)	1.024 (0.874–1.199)
Epigeneettinen ikääntymisnopeus + parisuhde	1.262 (1.093–1.457)	1.029 (0.880–1.204)
Epigeneettinen ikääntymisnopeus + tupakointi + alkoholi	1.307 (1.096–1.560)	1.034 (0.885–1.209)
Epigeneettinen ikääntymisnopeus + elintapatekijät ^A	1.198 (0.996–1.441)	1.052 (0.896–1.236)

^A Malli on vakioitu kaikilla elintapatekijöillä eli tupakointi, painoindeksi, fyysinen aktiivisuus, alkoholin kulutus, kroonisten sairauksien määrä, koulutusvuodet sekä parisuhde. CI95 = 95 %:n luottamusväli.

Seuranta-ajan lopussa elossa olleiden tutkittavien kronologinen ikä oli alkumittauksissa keskimäärin 67,9 vuotta ja heidän epigeneettisen ikääntymisnopeutensa (GrimAge) keskiarvo oli

-0,399 ja mediaani -0,575. Seurannan aikana kuolleiden kronologinen ikä oli keskimäärin 69,8 vuotta ja ikäänymisnopeuden keskiarvo 0,537 ja mediaani -0,141. Arvioitaessa elossa olevien tutkittavien ja kuolleiden tutkittavien epigeneettisen ikäänymisnopeuden keskiarvojen eroa riippumattomien otosten t-testillä oli ero tilastollisesti merkitsevä ($t(411) = -2,918, p = 0,004$).

Tutkittavat jaettiin kolmeen ryhmään epigeneettisen ikäänymisnopeuden (GrimAge) tertiilien mukaan. ”Hitaasti ikäänymyvät” viittaa siihen kolmasosaan tutkittavia, joilla oli matalin epigeneettinen ikäänymisnopeus, ”nopeasti ikäänymyvillä” puolestaan ikäänymisnopeus oli korkein ja ”keskimääräisesti ikäänymyvien” ryhmä on ikäänymisnopeudessa hitaasti ja nopeasti ikäänymyvien väliin jäävä kolmasosa tutkittavia. Näiden kolmen ryhmän elossaoloa kuvaavat funktiot seuranta-aikana on esitetty kuviossa 3. Hitaasti ikäänymyvien kronologisen iän keskiarvo oli alkumittauksissa 68,1 vuotta ja epigeneettisen ikäänymisnopeuden keskiarvo oli -3,01. Vastavaat tulokset olivat keskimääräisesti ikäänymyvillä 69,3 vuotta ja -0,48 ja nopeasti ikäänymyvillä 68,5 vuotta ja 3,35. Seurannan aikana kuolleisuus oli suhteellisesti suurinta nopeasti ikäänymyvien ryhmässä; nopeasti ikäänymyvistä kuoli 62 (45 %), keskimääräisesti ikäänymyvistä 49 (36 %) ja hitaasti ikäänymyvistä 45 (33 %) tutkittavaa. Vaikka ikäänymisnopeuden tertiileiden keskiarvojen sekä Kaplan-Meier-kuvaajan mukaan ryhmien välillä vaikuttaisi olevan eroa, ei elossaolokuvaajien vertailussa kaikkien ryhmien välillä kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa log-rank-testissä ($\chi^2(2) = 5,29, p = 0,071$). Tertiileiden parittaisissa vertailuissa hitaasti ikäänymyvien ryhmä eroaa kuitenkin tilastollisesti merkitsevästi nopeasti ikäänymyvien ryhmästä ($\chi^2(1) = 5,113, p = 0,024$), vaikka keskimääräisesti ikäänymyvien ja muiden ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa log-rank-testissä ($\chi^2(1) = 0,571, p = 0,450; \chi^2(1) = 2,149, p = 0,143$).



KUVIO 3. Elossaoloa kuvaavat funktiot epigeneettisen ikääntymisnopeuden tertiileittäin

8.2 Parittaiset analyysit

Tiedot siitä onko tutkittava kuollut ennen vai jälkeen kaksossiskonsa sekä heidän epigeneettisestä ikääntymisnopeudestaan oli saatavilla 112 kaksosparilla eli yhteensä 224 tutkittavalla. Kaksosista, jotka olivat epigeneettiseltä iältään (GrimAge) sisarustaan vanhempia, kuoli ennen siskoaan 60 tutkittavaa (54 %) ja siskonsa jälkeen 52 tutkittavaa (46 %). McNemar-testin tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p = 0,509$) eli epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kaksosarten keskinäisen kuolinjärjestyksen välillä ei siis havaittu yhteyttä tutkittavien joukossa, vaikka frekvenssien mukaan näyttäisi siltä, että tutkittavista hieman useammin epigeneettiseltä iältään vanhempi kaksonen kuoli ennen nuorempaa.

Epigeneettisen ikääntymisnopeuden sekä kaksossisarten keskinäisen kuolinjärjestyksen välistä yhteyttä tarkasteltiin myös ikääntymisnopeuden suhteen erilaisten kaksosten välillä. Näihin parittaisiin analyysihin otettiin mukaan ne kaksoset, joiden epigeneettisten ikääntymisnopeuksien (GrimAge) ero oli vähintään ikääntymisnopeuden keskihajonnan (3,19) suuruinen. Ikääntymisnopeuden suhteen erilaisia kaksospareja oli 60 eli yhteensä 120 tutkittavaa. Näiden joukossa oli 35 sellaista kaksosparia, joissa ainakin toinen kaksosista oli kuollut tutkimuksen aikana. Näin ollen 70 tutkittavan kohdalla pystyttiin määrittämään tieto siitä, onko hän kuollut ennen vai jälkeen kaksossiskonsa. Epigeneettiseltä iältään vanhemmista kaksosista ennen siskoaan kuoli 22 tutkittavaa (63 %) ja siskonsa jälkeen 13 tutkittavaa (37 %). Epigeneettisen ikääntymisnopeuden suhteen eroavilla kaksosillakaan ei havaittu epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kaksossisarten keskinäisen kuolinjärjestyksen välillä yhteyttä ($p = 0,175$), vaikka heidänkin kohdallaan frekvenssien mukaan näyttäisi siltä, että hieman useammin epigeneettiseltä iältään vanhempi kaksonen kuoli ennen nuorempaa.

Ikääntymisnopeuden suhteen erilaisten kaksosten hitaammin ikääntyvillä kaksosilla tupakoinnin askivuosien keskiarvo osoittautui riippuvien otosten t-testillä tilastollisesti merkitsevästi pienemmäksi kuin nopeammin ikääntyvien keskiarvo ($t(58) = 3,987$, $p < 0,001$; taulukko 4). Riippuvien otosten t-testissä ei havaittu ikääntymisnopeuden suhteen erilaisten kaksosten välillä tilastollisesti merkitsevää eroa fyysisen aktiivisuuden tai painoindeksin keskiarvoissa (taulukko 4). Ikääntymisnopeuden suhteen erilaisille identtisille (MZ) ja ei-identtisille (DZ) kaksosille tehtiin myös riippuvien otosten t-testi. Tulokset vastasivat kaikkien kaksosten yhteisiä tuloksia; vain tupakoinnin askivuosien keskiarvo oli tilastollisesti merkitsevästi pienempi kuin nopeammin ikääntyvillä (taulukko 4).

TAULUKKO 4. Epigeneettisen ikääntymisnopeuden (GrimAge) suhteen erilaisten kaksosten elintapamuuttujien keskiarvot ja hajontaluvut sekä riippuvien otosten t-testin tulokset

	Muuttuja	ka	SD	t	df	p-arvo *
Kaikki	Tupakointi (askivuodet)					
	Nopeasti ikääntyvät	7.20	13.48	3.987	58	< 0.001
	Hitaasti ikääntyvät	1.59	6.87			
	Fyysinen aktiivisuus					
	Nopeasti ikääntyvät	1.92	1.27	-0.955	59	0.343
	Hitaasti ikääntyvät	2.13	1.37			
Painoindeksi						
Nopeasti ikääntyvät	28.68	5.36	0.778	59	0.440	
Hitaasti ikääntyvät	28.11	4.82				
MZ	Tupakointi (askivuodet)					
	Nopeasti ikääntyvät	8.04	14.46	2.946	24	0.007
	Hitaasti ikääntyvät	1.46	5.73			
	Fyysinen aktiivisuus					
	Nopeasti ikääntyvät	2.04	1.62	-1.567	24	0.130
	Hitaasti ikääntyvät	2.64	1.44			
Painoindeksi						
Nopeasti ikääntyvät	28.68	5.15	0.129	24	0.899	
Hitaasti ikääntyvät	28.55	4.73				
DZ	Tupakointi (askivuodet)					
	Nopeasti ikääntyvät	6.59	12.90	2.683	33	0.011
	Hitaasti ikääntyvät	1.68	7.68			
	Fyysinen aktiivisuus					
	Nopeasti ikääntyvät	1.83	0.95	0.210	34	0.835
	Hitaasti ikääntyvät	1.77	1.22			
Painoindeksi						
Nopeasti ikääntyvät	28.67	5.57	0.871	34	0.390	
Hitaasti ikääntyvät	27.79	4.93				

ka = keskiarvo, SD = keskihajonta, t = testimuuttujan arvo, df = vapausaste, * = parittaisen vertailun p-arvo

9 POHDINTA

Ikääntymisen biomarkkereiden tutkiminen ja tunnistaminen on johtanut uusien, entistä tarkempien kuolleisuuden ennusteiden kehittämiseen. Toistaiseksi lupaavin biologinen ikäennuste saadaan DNA:n tiettyjen CpG-kohtien metyloitumisen perusteella epigeneettisiä kelloja käyttäen (Jylhävä ym. 2017). Epigeneettisistä kelloista parhaiten kokonaiskuolleisuutta ennustaa Lun ym. (2019) kehittämä GrimAge- epigeneettinen kello, joka tarkastelee huomattavasti muita epigeneettisiä kelloja useamman CpG-kohdan metylaatioasteen muutoksia (McCrorry ym. 2021). Tutkimustuloksia on kuitenkin vielä vähän. Tässä pro gradu -tutkielmassa tarkasteltiin epigeneettisen ikääntymisnopeuden yhteyttä kuolleisuuteen suomalaisessa kaksosaineistossa käyttäen GrimAge- epigeneettistä kelloa. Epigeneettiseltä iältään vanhemmilla tutkittavilla oli korkeampi kuolleisuusriski, eikä mikään yksittäinen elintapatekijä yksinään riittänyt selittämään tätä yhteyttä, vaan yhteys näyttää selittyvän useiden eri elintapatekijöiden yhteisvaikutuksena. Tulokset tukevat aiempien tutkimusten havaintoja epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kuolleisuuden välisestä yhteydestä (Marioni ym. 2015; Fransquet ym. 2019) ja antoivat uutta tietoa GrimAge- epigeneettisen kellon herkkyydestä ennustaa kuolleisuutta aiempia kelloja paremmin.

Tässä tutkielmassa epigeneettisen ikääntymisnopeuden yhteyttä kuolleisuuteen tutkittiin kahdella eri epigeneettisellä kellolla. GrimAge- epigeneettisellä kellolla arvioituna tutkittavien korkeampi epigeneettinen ikääntymisnopeus oli yhteydessä kohonneeseen kuolleisuusriskiin; täsmällisemmin ikääntymisnopeuden kasvaessa yhden keskihajonnan verran kasvoi kuoleman riski 28 %. Horvathin epigeneettisellä kellolla arvioituna epigeneettisen ikääntymisnopeuden yhteys kuolleisuuteen oli heikko, eikä tilastollisesti merkitsevä. Tämän perusteella GrimAge-epigeneettinen kello ennustaa Horvathin epigeneettistä kelloa paremmin kuolleisuusriskiä tutkittavien joukossa, mikä myös korostaa kellojen kehittämisen taustalla olevia eroja. GrimAge-epigeneettinen kello on kehitetty ennustamaan nimenomaan kuolemanriskiä (Lu ym. 2019), kun taas Horvathin (2013) epigeneettinen kello on kehitetty ennustamaan kronologista ikää. Kiihtyneen epigeneettisen ikääntymisnopeuden yhteys lisääntyneeseen kuolleisuuteen on havaittu aiemmin sekä Horvathin epigeneettisellä kellolla tehdyissä tutkimuksissa (Marioni ym. 2015; Christiansen ym. 2016; Fransquet ym. 2019) että käytettäessä GrimAge- epigeneettistä

kelloa (Lu ym. 2019; Hillary ym. 2020; McCrory ym. 2021). Tämän tutkimuksen tulokset, jotka saatiin Horvathin epigeneettistä kelloa käyttäen, poikkeavat siis mainittujen aiempien tutkimusten tuloksista. McCroryn ym. (2021) tulokset ovat yhdenmukaisia tässä työssä saatujen tulosten kanssa; he eivät havainneet yhteyttä Horvathin epigeneettisellä kellolla lasketun epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kuolleisuuden välillä, vaikka GrimAge- epigeneettisellä kellolla määritetyn ikääntymisnopeuden ja kuolleisuuden välillä yhteys raportoitiin. Kuten tässä työssä, myös McCrory tutkimusryhmineen laskivat riskitiheyksien suhteet aineistopohjaista keskihajontaa kohti, eivätkä viiden vuoden kasvua kohti, kuten useimmissa aiemmissä tutkimuksissa on tehty. McCroryn ym. (2021) kohortti oli kuitenkin tämän tutkimuksen kohorttia hieman nuorempi ja kuolleisuus seuranta-aikana oli todella pientä. Otoksoon ja kohorttien erot yhdessä korkean epigeneettisen ikääntymisnopeuden (GrimAge) keskihajonnan kanssa voivat selittää miksi heidän arvionsa ikääntymisnopeuden yhteydestä kuolleisuuteen on moninkertaisesti suurempi kuin tässä työssä havaittu yhteys. Seuranta-ajan alussa on myös saattanut kuolla epigeneettisesti poikkeuksellisen nopeasti ikääntyviä tutkittavia, jolloin pieni kuolleisuus ja lyhyempi seuranta-aika voivat vääristää yhteyden suuruutta. Tämän työn tutkittavista kolme kuoli seurannan ensimmäisen vuoden aikana, mutta koska heidän epigeneettinen ikääntymisnopeutensa ei ollut poikkeuksellinen, ei heitä poissuljettu tutkimuksesta.

Epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kuolleisuuden yhteyttä tarkasteltiin myös kaksosanalyysillä. Näin pystyttiin kontrolloimaan epigenomiin mahdollisesti vaikuttavia ja tutkimustuloksia sekoittavia tekijöitä, kuten ikä, sukupuoli, perimä sekä osa lapsuuden ja nuoruuden elintapa- ja ympäristötekijöistä. Tietävästi vastaava tutkimusasetelma on ollut aiemmin ainoastaan Christiansenin ym. (2016) tutkimuksessa. He käyttivät epigeneettisen iän määrittämiseen Horvathin (2013) epigeneettistä kelloa. Vaikka epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kaksosparien keskinäisen kuolinjärjestyksen välillä ei tässä tutkimuksessa havaittu yhteyttä, tukevat kuolinjärjestyksen frekvenssit Christiansenin ym. (2016) tekemiä havaintoja siitä, että epigeneettisesti vanhemmalla kaksosella on suurempi todennäköisyys kuolla ensin. Christiansenin ym. (2016) tutkimuksessa kohortin keski-ikä sekä kuolleisuusprosentti olivat huomattavasti korkeampia kuin tässä tutkimuksessa. Jos tämän pro gradu -tutkielman seuranta olisi jatkettu siihen saakka, että kaikkien kaksosparien keskinäinen kuolinjärjestys olisi selvillä, olisi tutkittavien epigeneettisen ikääntymisnopeuden yhteyttä kaksosparien keskinäiseen kuolinjärjestykseen voitu arvioida vielä täsmällisemmin. Tutkimuksen yli 18 vuoden seuranta-aika on kuitenkin pitkä

ja se on alkanut tutkittavien ollessa vielä kohtalaisen terveitä, mikä osaltaan lisää kuolleisuustutkimuksen luotettavuutta.

Merkittävimmät ennenaikaisiin kuolemiin yhteydessä olevat riskitekijät ovat tupakointi, ruokavalio, ylipaino, korkea verenpaine sekä fyysinen passiivisuus (Muller ym. 2016; Stringhini ym. 2017). Näistä parittaisissa analyyseissä tarkasteltaviksi valittiin vapaa-ajan fyysinen aktiivisuus, painoindeksi sekä tupakointi. Sen lisäksi, että ne kuuluvat merkittävimpiin ennenaikaisiin kuolemiin yhteydessä oleviin riskitekijöihin, niihin on yksilön kohtalaisen helppo itse vaikuttaa elämäntavoillaan. Fyysisen aktiivisuuden ja painoindeksin suhteen kaksosparit olivat hyvin samankaltaisia, eikä eroa ikääntymisnopeuden suhteen erilaisten kaksosten välillä havaittu. Ikääntymisnopeuden suhteen erilaiset kaksoset erosivat kuitenkin tupakoinnin askivuosien keskiarvon suhteen toisistaan. Eli tupakoinnin, jonka tiedetään vaikuttavan DNA:n metyloitumiseen (Gao ym. 2015) ja joka sisältyy GrimAge-algoritmiin (Lu ym. 2019), voidaan todeta selittävän merkittävästi kaksosten välistä eroa epigeneettisessä iässä. Havainto vahvistaa käsitystä, että biologisten tekijöiden lisäksi myös elintapatekijät vaikuttavat epigeneettiseen ikääntymiseen.

Tutkimuksen vahvuuksia ovat pitkän seuranta-ajan lisäksi kaksosasetelma sekä kattava tieto tutkittavien elintapatekijöistä ja koulutuksesta. FITSA-kyselylomakkeet ovat suomenkielisiä ja tehty tutkittaville mahdollisimman selkeiksi ja ymmärrettäviksi. Tutkittavien antamat tiedot tupakoinnista, fyysisen aktiivisuuden määrästä sekä alkoholin kulutuksesta voivat kuitenkin olla vääristyneitä, jos tutkittavat ovat antaneet elintavoistaan mahdollisimman myönteisen kuvan, ja koska elintapoja arvioitiin vain yhdessä mittapisteessä. Tutkimustuloksen luotettavuutta saattaisi lisätä objektiivisesti mitatut elintapamuuttujien arvot, mutta kyselyihin perustuvat tupakointitiedot (Patrick ym. 1994), alkoholinkäyttötiedot (Del Boca & Darkes 2003) sekä fyysinen aktiivisuus (Portegijs ym. 2017) on arvioitu riittävän luotettaviksi tutkimuskäyttöön. On kuitenkin huomattava, että fyysisen aktiivisuuden ja kuolleisuuden annos-vastesuhde ei ole lineaarinen; terveysvaikutusten kannalta suurin mahdollinen hyöty saavutetaan jo kohtuullisella määrällä liikuntaa (Blair ym. 2001; Arem ym. 2015). Myös alkoholin kulutuksen kohdalla kohtuullisuus saattaa olla terveydelle edullisempaa kuin täysi alkoholista pidättäytyminen tai alkoholin runsas käyttö (Plunk ym. 2014). Painoindeksin osalta puolestaan yksilön kuolleisuusriski kasvaa sekä alhaisilla (BMI < 20 kg/m²) että korkeilla (BMI > 25 kg/m²) arvoilla (Global BMI

Mortality Collaboration 2016). Ikääntyneillä pienempi kuolleisuusriski liittyy kuitenkin painoindeksiin 23–32 kg/m² (Winter ym. 2014). Painoindeksi ei myöskään erottele esimerkiksi rasvan ja lihasten osuutta, joten saman painoindeksin omaavilla tutkittavilla voi olla terveyden kannalta erilainen kehonkoostumus (Prentice & Jebb 2001). On myös hyvä huomioida, että elintapojen muutokset eivät näy välittömästi DNA:n metylaatioasteessa. Esimerkiksi tupakoinnin lopettamisen jälkeen metylaatioasteen palautuminen tupakoimattomille tyypilliselle tasolle voi viedä vuosikymmeniä (Zhang ym. 2014; Guida ym. 2015).

Tässä työssä tutkittiin vain naisia, toisin kuin aiemmissa epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kuolleisuuden välistä yhteyttä arvioineissa tutkimuksissa (Marioni ym. 2015; Fransquet ym. 2019; Hillary ym. 2020; McCrory ym. 2021). Naisten elinajanodotteen tiedetään olevan korkeampi kuin miesten (Suomen virallinen tilasto 2020b), ja DNA:n metylaatioaste on naisilla alhaisempi kuin miehillä (El-Maarri ym. 2007; Zhang 2011; Yousefi ym. 2015). Naisten ja miesten epigeneettistä ikääntymistä sekä kuolleisuutta on siis perusteltua tutkia erikseen, minkä vuoksi yhtenä tämän tutkimuksen vahvuutena voidaan pitää sukupuolen suhteen yhdenmukaista tutkimusjoukkoa. Toisaalta tutkimustulokset ovat heikosti yleistettävissä koskemaan miehiä. Tuloksia arvioitaessa on myös huomioitava, että tutkimukseen osallistuminen perustui vapaaehtoisuuteen. Vaikka suomalainen väestö onkin melko homogeeninen tutkittavien ikäluokassa, ei laboratoriomittauksiin osallistuneet ikäjoukon huonokuntoisimmat tai sairaimmat yksilöt. Tutkittavat olivat epigeneettiseltä iältään lähes vuosikymmenen kronologista ikäänsä nuorempia, mitä osaltaan selittää keskimääräistä terveempien ja parempikuntoisempien henkilöiden valikoituminen tutkimusjoukkoon, kuten myös tutkittavien naissukupuoli. Tulosten voidaan siis olettaa kuvaavan myöhäisessä keski-ikässä sekä eläkeiän alussa olevien suhteellisen hyväkuntoisten ja melko terveiden suomalaisten naisten epigeneettisen ikääntymisen vaihtelua.

Tutkielmassa käytettiin valmista tutkimusaineistoa. Valmiiden tutkimusaineistojen käyttäminen on eettisesti perusteltua muun muassa taloudellisen säästön ja ajankäytön vuoksi. Kuolleisuustutkimuksen tekeminen opinnäytetyönä ei olisi mahdollista ilman valmista aineistoa. Voidaan kuitenkin pohtia, onko tutkimuksen alussa annettu lupa DNA-näytteeseen sekä tietojen yhdistämiseen väestörekisteritietoihin riittävä myös epigeneettisen ikääntymisen tutkimiseen kaksi vuosikymmentä myöhemmin. Ensimmäiset epigeneettiset kellot julkaistiin yli vuosikymmenen laboratorionkoekoiden jälkeen, jolloin noin kymmenes tutkittavista oli jo menehtynyt. He

eivät siis ole voineet kieltää omien tietojensa jatkokäyttöä epigeneettisessä ikääntymistutkimuksessa. Tutkimusaiheen tulee kuitenkin olla ajankohtainen ja merkityksellinen, jotta tutkimuksen tekeminen ylipäätään kannattaa, eikä resursseja käytettäisi huolettomasti tai turhaan. Uusimmilla epigeneettisillä kelloilla, kuten GrimAge- epigeneettisellä kellolla, on epigeneettisen ikääntymisen yhteyttä kuolleisuuteen tutkittu maailmanlaajuisestikin vähän, ja etenkin suomalaista kaksosaineistoa käyttäen tutkimustuloksilla on merkittävää uutuusarvoa. Valmiiden aineistojen käyttö myös suojaa tutkittavien identiteettiä, koska tutkijalla on käytössään vain tutkimuksen kannalta oleelliset taustatiedot sekä muuttujat ilman yksilöiviä tekijöitä. Vaikka tässä tutkimuksessa on käsitelty sensitiiviseksi dataksi luettavaa aineistoa, kuten elinaikatietoja, ei tutkimuksen tekijä ole missään tutkimuksen vaiheessa käsitellyt tunnistettavissa olevaan luonnolliseen henkilöön yhdistettävissä olevia tietoja.

Tutkimuksessa ei huomioitu tutkittavien epigeneettisessä ikääntymisessä tai heidän elintavoissaan seurannan aikana tapahtuvia muutoksia. Epigeneettistä ikääntymistä ja elintapatekijöitä tarkasteltiin ainoastaan yhdessä aikapisteessä seurannan alussa. Pitkittäistutkimuksilla, joissa elintapamuuttujien arvoja sekä DNA:n metyloitumista arvioitaisiin useammassa eri aikapisteissä, saataisiin arvokasta tietoa elintapojen muuttumisen ja mahdollisen kumuloitumisen merkityksestä sekä epigeneettiseen ikääntymiseen että kuolleisuuteen. Tästä voisi olla hyötyä etenkin terveyden edistämisen ja ennenaikaisen kuolemanriskin ennaltaehkäisyyn kannalta. Euroopalaisittainkin Suomessa väestöryhmien väliset terveyserot ovat suuria (OECD/EU 2016, 73). Keinot, joilla voitaisiin ehkäistä vanhenemisen yhteydessä esiintyviä sairauksia ja maksimoida terveet elinvuodet, voisivat potentiaalisesti lisätä myös eri väestöryhmien terveydellistä tasarvoa sekä yhdenvertaisuutta. Biologisen vanhenemisilmion parempi ymmärtäminen sekä biologiseen ikääntymiseen vaikuttavien elintapojen tarkempi kartoittaminen voisi tarjota mahdollisuuden kohdentaa ennaltaehkäiseviä toimenpiteitä niistä eniten hyötyville.

Johtopäätöksenä voidaan todeta, että tämän pro gradu -tutkielman tulokset vahvistavat aiempia epigeneettisillä kelloilla saatuja tutkimustuloksia epigeneettisen ikääntymisnopeuden ja kuolleisuuden välisestä yhteydestä; suurempi epigeneettinen ikääntymisnopeus on yhteydessä korkeampaan kuolleisuusriskiin. Tutkimuksessa tehdyt havainnot tukevat myös sitä, että perinnöllisten tekijöiden lisäksi elintapatekijät vaikuttavat epigeneettiseen ikääntymiseen ja että niillä on tärkeä rooli epigeneettisen ikääntymisen ja kuolleisuuden välisessä yhteydessä. Kuitenkin

ennen kuin epigeneettisten kellojen avulla saatuja tietoja voidaan hyödyntää monipuolisemmin terveyden edistämisen tukena, esimerkiksi ennaltaehkäisevien toimenpiteiden tutkimuksessa ja kehittämisessä sekä elintapaohjauksen toteuttamisessa, tulee paremmin ymmärtää mitä epigeneettiset kellot todellisuudessa mittaavat ja mitä epigeneettisten kellojen arvot merkitsevät. Lisätutkimusta tarvitaan sen selvittämiseksi, ovatko DNA:n metyloitumisessa tapahtuvat muutokset ikääntymisen syy vai seuraus.

LÄHTEET

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2002. The structure and function of DNA. Teoksessa *Molecular Biology of the Cell*. 4. painos. New York: Garland Science. Viitattu 30.3.2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821>.
- Alisch, R. S., Barwick, B. G., Chopra, P., Myrick, L. K., Satten, G. A., Conneely, K. N. & Warren, S. T. 2012. Age-associated DNA methylation in pediatric populations. *Genome Research* 22 (4), 623–632.
- American Federation for Aging Research. 2016. *Biomarkers of Aging: An introduction to aging science brought to you by the American Federation for Aging Research*. New York: American Federation for Aging Research.
- Arem, H., Moore, S. C., Patel, A., Hartge, P., Berrington de Gonzalez, A., Visvanathan, K., Campbell, P. T., Freedman, M., Weiderpass, E., Adami, H. O., Linet, M. S., Lee, I-M. & Matthews, C. E. 2015. Leisure time physical activity and mortality: a detailed pooled analysis of the dose-response relationship. *JAMA Internal Medicine* 175 (6), 959–967.
- Aubert, G. & Lansdorp, P. M. 2008. Telomeres and aging. *Physiological Reviews* 88 (2), 557–579.
- Bacalini, M. G., Boattini, A., Gentilini, D., Giampieri, E., Pirazzini, C., Giuliani, C., Fontanesi, E., Remondini, D., Capri, M., Del Rio, A., Luiselli, D., Vitale, G., Mari, D., Castellani, G., Di Blasio, A. M., Salvioli, S., Franceschi, C. & Garagnani, P. 2015. A meta-analysis on age-associated changes in blood DNA methylation: results from an original analysis pipeline for Infinium 450k data. *Aging* 7 (2), 97–109.
- Bacalini, M. G., Friso, S., Olivieri, F., Pirazzini, C., Giuliani, C., Capri, M., Santoro, A., Franceschi, C. & Garagnani, P. 2014. Present and future of anti-ageing epigenetic diets. *Mechanisms of Ageing and Development* 136, 101–115.
- Bell, J. T., Tsai, P. C., Yang, T. P., Pidsley, R., Nisbet, J., Glass, D., Mangino, M., Zhai, G., Zhang, F., Valdes, A., Shin, S. Y., Dempster, E. L., Murray, R. M., Grundberg, E., Hedman, A. K., Nica, A., Small, K. S., MuTHER Consortium, Dermitzakis, E. T., McCarthy, M. I., Mill, J., Spector, T. D. & Deloukas, P. 2012. Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a

- healthy ageing population. *PLoS Genetics* 8 (4), e1002629. doi:10.1371/journal.pgen.1002629.
- Berg, N. van den, Beekman, M., Smith, K. R., Janssens, A. & Slagboom, P. E. 2017. Historical demography and longevity genetics: back to the future. *Ageing Research Reviews* 38, 28–39.
- Bergsma, T. & Rogaeva, E. 2020. DNA Methylation Clocks and Their Predictive Capacity for Aging Phenotypes and Healthspan. *Neuroscience Insights* 15, 1–11. doi: 10.1177/2633105520942221.
- Blair, S. N., Cheng, Y. & Holder, J. S. 2001. Is physical activity or physical fitness more important in defining health benefits? *Medicine and Science in Sports and Exercise* 33 (6), 379–399.
- Blanner, C., Mejlidal, A., Prina, A. M., Munk-Jørgensen, P., Ersbøll, A. K. & Andersen, K. 2020. Widowhood and mortality: A Danish nationwide register-based cohort study. *Epidemiology and Psychiatric Sciences* 29, e149. doi:10.1017/S2045796020000591.
- Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M. E., Sánchez, F. J., Sinsheimer, J. S., Horvath, S. & Vilain, E. 2011. Epigenetic predictor of age. *PloS One* 6 (6), e14821. doi:0.1371/journal.pone.0014821.
- Bottomley, J. M. & Lewis, C. B. 2019. *A Clinical Approach to Geriatric Rehabilitation: Fourth Edition*. 4. uudistettu painos. Thorofare, NJ: SLACK Incorporated.
- Carlsson, S., Andersson, T., Lichtenstein, P., Michaëlsson, K. & Ahlbom, A. 2007. Physical activity and mortality: Is the association explained by genetic selection? *American Journal of Epidemiology* 166 (3), 255–259.
- Carter, B. D., Abnet, C. C., Feskanich, D., Freedman, N. D., Hartge, P., Lewis, C. E., Ockene, J. K., Prentice, R. L., Speizer, F. E., Thun, M. J. & Jacobs, E. J. 2015. Smoking and Mortality — Beyond Established Causes. *The New England Journal of Medicine* 372 (7), 631–640.
- Chen, B. H., Marioni, R. E., Colicino, E., Peters, M. J., Ward-Caviness, C. K., Tsai, P. C., Roetker, N. S., Just, A. C, Demerath, E. W., Guan, W., Bressler, J., Fornage, M., Studenski, S., Vandiver, A. R., Moore, A. Z., Tanaka, T., Kiel, D. P., Liang, L., Vokonas, P., Schwartz, J., Lunetta, K. L., Murabito, J. M., Bandinelli, S., Hernandez, D. G., Melzer, D., Nalls, M., Pilling, L. C., Price, T. R., Singleton, A. B., Gieger, C., Holle, R., Kretschmer, A., Kronenberg, F., Kunze, S., Linseisen, J., Meisinger, C.,

- Rathmann, W., Waldenberger, M., Visscher, P. M., Shah, S., Wray, N. R., McRae, A. F., Franco, O. H., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., Absher, D., Assimes, T., Levine, M. E., Lu, A. T., Tsao, P. S., Hou, L., Manson, J. E., Carty, C. L., LaCroix, A. Z., Reiner, A. P., Spector, T. D., Feinberg, A. P., Levy, D., Baccarelli, A., van Meurs, J., Bell, J. T., Peters, A., Deary, I. J., Pankow, J. S., Ferrucci, L. & Horvath, S. 2016. DNA methylation-based measures of biological age: meta-analysis predicting time to death. *Aging* 8 (9), 1844–1859.
- Choi, B., Schnall, P. L., Yang, H., Dobson, M., Landsbergis, P., Israel, L., Karasek, R. & Baker, D. 2010. Psychosocial working conditions and active leisure-time physical activity in middle-aged US workers. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 23 (3), 239–253.
- Christiansen, L., Lenart, A., Tan, Q., Vaupel, J. W., Aviv, A., McGue, M. & Christensen, K. 2016. DNA methylation age is associated with mortality in a longitudinal Danish twin study. *Aging cell* 15 (1), 149–154.
- Coleman, N. C., Burnett, R. T., Higbee, J. D., Lefler, J. S., Merrill, R. M., Ezzati, M., Marshall, J. D., Kim, S-Y., Bechle, M., Robinson, A. L. & Pope III, C. A. 2020. Cancer mortality risk, fine particulate air pollution, and smoking in a large, representative cohort of US adults. *Cancer Causes & Control* 31, 767–776.
- Cutler, D. M., Huang, W. & Lleras-Muney, A. 2016. Economic conditions and mortality: evidence from 200 years of data (No. w22690). National Bureau of Economic Research.
- Cutler, D. M., Lleras-Muney, A. & Vogl, T. 2008. Socioeconomic Status and Health: Dimensions and Mechanisms (No. w14333). National Bureau of Economic Research.
- Dare, S., Mackay, D. F. & Pell, J. P. 2015. Relationship between Smoking and Obesity: A Cross-Sectional Study of 499,504 Middle-Aged Adults in the UK General Population. *PLoS One* 10 (4), e0123579. doi:10.1371/journal.pone.0123579.
- Del Boca, F. K. & Darkes, J. 2003. The validity of self-reports of alcohol consumption: state of the science and challenges for research. *Addiction* 98, 1–12.
- Dodig, S., Čepelak, I. & Pavić, I. 2019. Hallmarks of senescence and aging. *Biochemia Medica* 29 (3), 483–497.
- El-Maarri, O., Becker, T., Junen, J., Manzoor, S. S., Diaz-Lacava, A., Schwaab, R., Wienker, T. & Oldenburg, J. 2007. Gender specific differences in levels of DNA methylation at

- selected loci from human total blood: a tendency toward higher methylation levels in males. *Human Genetics* 122 (5), 505–514.
- Elo, I. T., Martikainen, P. & Myrskylä, M. 2014. Socioeconomic status across the life course and all-cause and cause-specific mortality in Finland. *Social Science & Medicine* 119, 198–206.
- Florath, I., Butterbach, K., Müller, H., Bewerunge-Hudler, M. & Brenner, H. 2014. Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Human Molecular Genetics* 23 (5), 1186–1201.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J. C., Urioste, M., Benitez, J. Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T. D., Wu, Y-Z., Plass, C. & Esteller, M. 2005. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (30), 10604–10609.
- Fransquet, P. D., Wigglesworth, J., Woods, R. L., Ernst, M. E. & Ryan, J. 2019. The epigenetic clock as a predictor of disease and mortality risk: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Epigenetics* 11, 62. doi:10.1186/s13148-019-0656-7.
- Gao, X., Jia, M., Zhang, Y., Breitling, L. P. & Brenner, H. 2015. DNA methylation changes of whole blood cells in response to active smoking exposure in adults: a systematic review of DNA methylation studies. *Clinical Epigenetics* 7, 113. doi:10.1186/s13148-015-0148-3.
- GBD 2017 Diet Collaborators: Afshin, A., Sur, P. J., Fay, K. A., Cornaby, L., Ferrara, G., Salama, J. S., ... & Murray, C. J. 2019. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* 393 (10184), 1958–1972.
- GBD 2019 Risk Factors Collaborators: Murray, C. J., Aravkin, A. Y., Zheng, P., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abbasi-Kangevari, M., ... & Lim, S. S. 2020. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *The Lancet* 396 (10258), 1223–1249.
- Global BMI Mortality Collaboration; Di Angelantonio, E., Bhupathiraju, S., Wormser, D., Gao, P., Kaptoge, S., Berrington de Gonzalez, A., Cairns, B. J., Huxley, R., Jackson, C., Joshy, G., Lewington, S., Manson, J.A., Murphy, N., Patel, A., Samet, J., Woodward,

- M., Zheng, W., Zhou, M., Bansal, N., Barricarte, A., Carter, B., Cerhan, J., Smith, G., Fang, X., Franco, O., Green, J., Halsey, J., Hildebrand, J., Jung, K., Korda, R., McLerran, D., Moore, S., O'Keefe, L., Paige, E., Ramond, A., Reeves, G., Rolland, B., Sacerdote, C., Sattar, N., Sofianopoulou, E., Stevens, J., Thun, M., Ueshima, H., Yang, L., Yun, Y., Willeit, P., Banks, E., Beral, V., Chen, Z., Gapstur, S., Gunter, M., Hartge, P., Jee, S., Lam, T-H., Peto, R., Pot-ter, J., Willett, W., Thompson, S., Danesh, J. & Hu, F. 2016. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet* 388 (10046), 776–786.
- Gravina, S. & Vijg, J. 2010. Epigenetic factors in aging and longevity. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 459 (2), 247–258.
- Grimby, G. & Frändin, K. 2018. On the use of a six-level scale for physical activity. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports* 28 (3), 819–825.
- Guida, F., Sandanger, T. M., Castagné, R., Campanella, G., Polidoro, S., Palli, D., Krogh, V., Tumino, R., Sacerdote, C., Panico, S., Severi, G., Kyrtopoulos, S. A., Georgiadis, P., Vermeulen, R. C. H., Lund, E., Vineis, P. & Chadeau-Hyam, M. 2015. Dynamics of smoking-induced genome-wide methylation changes with time since smoking cessation. *Human Molecular Genetics* 24 (8), 2349–2359.
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S.V., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J-B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T. & Zhang, K. 2013. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Molecular Cell* 49 (2), 359–367.
- Helldán, A. & Helakorpi, S. 2015. Suomalaisen aikuisväestön terveystilanne ja terveys, kevät 2014. Raportti 6/2015. Helsinki: Terveystieteiden tutkimuskeskus ja Hyvinvointinlaitos.
- Hillary, R. F., Stevenson, A. J., McCartney, D. L., Campbell, A., Walker, R. M., Howard, D. M., Ritchie, C. W., Horvath, S., Hayward, C., McIntosh, A. M., Porteous, D. J., Deary, I. J., Evans, K. L. & Marioni, R. E. 2020. Epigenetic measures of ageing predict the prevalence and incidence of leading causes of death and disease burden. *Clinical Epigenetics* 12, 115. doi:10.1186/s13148-020-00905-6.
- Hjelmborg, J. vB., Iachine, I., Skytthe, A., Vaupel, J. W., McGue, M., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Pedersen, N. L. & Christensen, K. 2006. Genetic influence on human lifespan and longevity. *Human genetics* 119 (3), 312–321.

- Horvath, S. 2013. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* 14, 3156. doi:10.1186/gb-2013-14-10-r115.
- Huang, Y., Yan, J., Hou, J., Fu, X., Li, L. & Hou, Y. 2015. Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain. *Forensic Science International: Genetics* 17, 129–136.
- Huttunen, J. 2003. Jääkaappi, kahvinsuodatin ja kännykkä – terveyden ihmeelliset tiet. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 119 (20), 1927–1928.
- Huttunen, J. 2018. Elinikä ja elinajanodote. *Lääkärikirja Duodecim*. Viitattu 9.12.2020. https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01025.
- Jiang, H., Livingston, M., Room, R., Chenhall, R. & English, D. R. 2018. Temporal associations of alcohol and tobacco consumption with cancer mortality. *JAMA network open* 1 (3), e180713. doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.0713.
- Jin, K. 2010. Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease* 1 (2), 72–74.
- Jousilahti P, Kuulasmaa K, Koskinen S, Tolonen H, Pietilä A & Peltonen M. 2019. Kansantautikuolleisuus vähenee edelleen – WHO:n tavoite voidaan saavuttaa. Tutkimuksesta tiiviisti 32. Helsinki: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.
- Jung, M. & Pfeifer, G. P. 2015. Aging and DNA methylation. *BMC Biology* 13, 7. doi:10.1186/s12915-015-0118.
- Jylhävä, J., Pedersen, N. L. & Hägg, S. 2017. Biological age predictors. *EBioMedicine* 21, 29–36.
- Jääskeläinen, M. & Virtanen, S. 2019. Tupakkatilasto 2018. Tilastoraportti 44. Suomen virallinen tilasto. Helsinki: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.
- Kaczynski, A. T., Manske, S. R., Mannell, R. C. & Grewal, K. 2008. Smoking and Physical Activity: A Systematic Review. *American Journal of Health Behavior* 32 (1), 93–110.
- Kananen, L. & Marttila, S. 2019. Mikä meitä vanhentaa? Vanhenemisen biologiset mekanismit ja miten niihin voi vaikuttaa. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 135 (11), 1098–1106.
- Kankaanpää, A., Tolvanen, A., Bollepalli, S., Leskinen, T., Kujala, U. M., Kaprio, J., Ollikainen, M. & Sillanpää, E. 2021. Leisure-Time and Occupational Physical Activity Associates Differently with Epigenetic Aging. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 53 (3), 487–495.

- Kaplanis, J., Gordon, A., Shor, T., Weissbrod, O., Geiger, D., Wahl, M., Gershovits, M., Markus, B., Sheikh, M., Gymrek, M., Bhatia, G., MacArthur, D. G., Price, A. L. & Erlich, Y. 2018. Quantitative analysis of population-scale family trees with millions of relatives. *Science* 360 (6385), 171–175.
- Kaprio, J., Bollepalli, S., Buchwald, J., Iso-Markku, P., Korhonen, T., Kovanen, V., Kujala, U., Laakkonen, E. K., Latvala, A., Leskinen, T., Lindgren, N., Ollikainen, M., Piirtola, M., Rantanen, T., Rinne, J., Rose, R. J., Sillanpää, E., Silventoinen, K., Sipilä, S., Viljanen, A., Vuoksimaa, E. & Waller, K. 2019. The Older Finnish Twin Cohort - 45 Years of Follow-up. *Twin Research and Human Genetics* 22 (4), 240–254.
- Kaprio, J. & Koskenvuo, M. 2002. Genetic and environmental factors in complex diseases: The older Finnish Twin Cohort. *Twin Research* 5 (5), 358–365.
- Karvinen, S., Waller, K., Silvennoinen, M., Koch, L. G., Britton, S. L., Kaprio, J., Kainulainen, H. & Kujala, U. M. 2015. Physical activity in adulthood: genes and mortality. *Scientific Reports* 5, 18259. doi:10.1038/srep18259.
- Karvonen, S., Martelin, T., Kestilä, L. & Junna, L. 2017. Tulotason mukaiset terveysterot ovat edelleen suuria. Tutkimuksesta tiiviisti 16/2017. *Suomen sosiaalinen tila* 3/2017. Helsinki: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.
- Kauhanen, J., Korhonen, M., Erkkilä, A., Myllykangas, M. & Pekkanen, J. 2013. *Kansanterveystiede. 4. uudistettu painos*. Helsinki: Sanoma Pro.
- Kauppinen, T. M., Angelin, A., Lorentzen, T., Bäckman, O., Salonen, T., Moisio, P. & Dahl, E. 2014. Social background and life-course risks as determinants of social assistance receipt among young adults in Sweden, Norway and Finland. *Journal of European Social Policy* 24 (3), 273–288.
- Klatsky, A. L., Zhang, J., Udaltsova, N., Li, Y. & Tran, H. N. 2017. Body Mass Index and Mortality in a Very Large Cohort: Is It Really Healthier to Be Overweight? *The Permanente journal* 21, 16–142. doi:10.7812/TPP/16-142.
- Koch, C. M. & Wagner, W. 2011. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging* 3 (10), 1018–1027.
- Koponen, P., Borodulin, K., Lundqvist, A., Sääksjärvi, K. & Koskinen, S. 2018. *Terveys, toimintakyky ja hyvinvointi Suomessa: FinTerveys 2017 -tutkimus. Raportti 4/2018*. Helsinki: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.

- Kujala, U. M., Kaprio, J. & Koskenvuo, M. 2002. Modifiable Risk Factors as Predictors of All-Cause Mortality: The Roles of Genetics and Childhood Environment. *American Journal of Epidemiology* 156 (11), 985–993.
- Lahelma, E. & Rahkonen, O. 2017. Sosiaalinen rakenne ja terveyst. Teoksessa S. Karvonen, L. Kestilä & T. Mäki-Opas (toim.) *Terveyssosiologian linjoja*. Helsinki: Gaudeamus, 19–39.
- Lara, J., Cooper, R., Nissan, J., Ginty, A. T., Khaw, K-T., Deary, I. J., Lord, J. M., Kuh, D. & Mathers, J. C. 2015. A proposed panel of biomarkers of healthy ageing. *BMC Medicine* 13, 222. doi:10.1186/s12916-015-0470-9.
- Leenen, F. A., Muller, C. P. & Turner, J. D. 2016. DNA methylation: conducting the orchestra from exposure to phenotype? *Clinical Epigenetics* 8, 92. doi:10.1186/s13148-016-0256-8.
- Levine M. E. 2013. Modeling the Rate of Senescence: Can Estimated Biological Age Predict Mortality More Accurately Than Chronological Age? *Journals of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences* 68 (6), 667–674.
- Levine, M. E. 2020. Assessment of Epigenetic Clocks as Biomarkers of Aging in Basic and Population Research. *Journals of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences* 75 (3), 463–465.
- Levine, M. E., Lu, A. T., Quach, A., Chen, B. H., Assimes, T. L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A. A., Stewart, J. D., Li, Y., Whitsel, E. A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Lohman, K., Liu, Y., Ferrucci, L. & Horvath, S. 2018. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging* 10 (4), 573–591.
- Li, K., Hüsing, A. & Kaaks, R. 2014. Lifestyle risk factors and residual life expectancy at age 40: a German cohort study. *BMC Medicine* 12, 59. doi:10.1186/1741-7015-12-59.
- Li, S., Nguyen, T. L., Wong, E. M., Dugué, P-A., Dite, G. S., Armstrong, N. J., Graig, J. M., Mather, K. A., Sachdev, P. S., Saffery, R., Sung, J., Tan, Q., Thalamuthu, A., Milne, R. L., Giles, G. G., Southey, M. C. & Hopper, J. L. 2020. Genetic and environmental causes of variation in epigenetic aging across the lifespan. *Clinical Epigenetics* 12, 158. doi:10.1186/s13148-020-00950-1.
- Lin, Q., Weidner, C. I., Costa, I. G., Marioni, R. E., Ferreira, M. R., Deary, I. J. & Wagner, W. 2016. DNA methylation levels at individual age-associated CpG sites can be indicative for life expectancy. *Aging* 8 (2), 394–401.

- Lisha, N. E., Martens, M. & Leventhal, A. M. 2011. Age and gender as moderators of the relationship between physical activity and alcohol use. *Addictive Behaviors* 36 (9), 933–936.
- Loef, M. & Walach, H. 2012. The combined effects of healthy lifestyle behaviors on all cause mortality: A systematic review and meta-analysis. *Preventive Medicine* 55 (3), 163–170.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. 2013. The Hallmarks of Aging. *Cell* 153 (6), 1194–1217.
- Lu, A. T., Quach, A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Raj, K., Hou, L., Baccarelli, A. A., Li, Y., Stewart, J. D., Whitsel, E. A., Assimes, T. L., Ferrucci, L. & Horvath, S. 2019. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging* 11 (2), 303–327.
- Löllgen, H., Böckenhoff, A. & Knapp, G. 2009. Physical activity and all-cause mortality: An updated meta-analysis with different intensity categories. *International Journal of Sports Medicine* 30 (3), 213–224.
- Manzoli, L., Villari, P., Pirone, G. M. & Boccia, A. 2007. Marital status and mortality in the elderly: A systematic review and meta-analysis. *Social Science & Medicine* 64 (1), 77–94.
- Marioni, R. E., Shah, S., McRae, A. F., Chen, B. H., Colicino, E., Harris, S. E., Gibson, J., Henders, A. K., Redmond, P., Cox, S. R., Pattie, A., Corley, J., Murphy, L., Martin, N. G., Montgomery, G. W., Feinberg, A. P., Fallin, M. D., Multhaup, M. L., Jaffe, A. E., Joehanes, R., Schwartz, J., Just, A. C., Lunetta, K. L., Murabito, J. M., Starr, J. M., Horvath, S., Baccarelli, A. A., Levy, D., Visscher, P. M., Wray, N. R. & Deary, I. J. 2015. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biology* 16, 25. doi:10.1186/s13059-015-0584-6.
- Marioni, R. E., Suderman, M., Chen, B. H., Horvath, S., Bandinelli, S., Morris, T., Beck, S., Ferrucci, L., Pedersen, N. L., Relton, C. L., Deary, I. J. & Hägg, S. 2019. Tracking the Epigenetic Clock Across the Human Life Course: A Meta-analysis of Longitudinal Cohort Data. *Journals of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences* 74 (1), 57–61.

- Martos, S. N., Tang, W-y. & Wang, Z. 2015. Elusive inheritance: Transgenerational effects and epigenetic inheritance in human environmental disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 118, 44–54.
- Mattila, Y. 2012. Potilaan aseman ja oikeuksien kehitys Suomen terveydenhuollossa. Teoksessa H. Mikkola, J. Blomgren & H. Hiilamo (toim.) *Kansallista vai paikallista. Puheenvuoroja sosiaali- ja terveydenhuollosta*. Helsinki: Kelan tutkimusosasto, 10–23.
- McCartney, G., Mahmood, L., Leyland, A. H., G David Batty, G. D. & Hunt, K. 2011. Contribution of smoking-related and alcohol-related deaths to the gender gap in mortality: evidence from 30 European countries. *Tobacco Control* 20, 166–168.
- McCrary, C., Fiorito, G., Hernandez, B., Polidoro, S., O'Halloran, A. M., Hever, A., Cheallaigh, C. N., Lu, A. T., Horvath, S., Vineis, P. & Kenny, R. A. 2021. GrimAge Outperforms Other Epigenetic Clocks in the Prediction of Age-Related Clinical Phenotypes and All-Cause Mortality. *Journals of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences* 76 (5), 741–749.
- McNaughton, S. A., Bates, C. J. & Mishra, G. D. 2012. Diet Quality is Associated With All-Cause Mortality in Adults Aged 65 Years and Older. *The Journal of Nutrition* 142 (2), 320–325.
- Mensaert, K., Denil, S., Trooskens, G., Van Criekinge, W., Thas, O. & De Meyer, T. 2014. Next-Generation Technologies and Data Analytical Approaches for Epigenomics. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 55 (3), 155–170.
- Moon, J. R., Kondo, N., Glymour, M. M. & Subramanian, S. V. 2011. Widowhood and Mortality: A Meta-Analysis. *PloS One* 6 (8), e23465. doi:10.1371/journal.pone.0023465.
- Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. 2013. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* 38 (1), 23–38.
- Muller, D. C., Murphy, N., Johansson, M., Ferrari, P., Tsilidis, K. K., Boutron-Ruault, M-C., Clavel, F., Dartois, L., Li, K., Kaaks, R., Weikert, C., Bergmann, M., Boeing, H., Tjønneland, A., Overvad, K., Redondo, M. L., Agudo, A., Molina-Portillo, E., Altzibar, J. M., Cirera, L., Ardanaz, E., Khaw, K-T., Wareham, N. J., Key, T. J., Travis, R. C., Bamia, C., Orfanos, P., Trichopoulou, A., Palli, D., Pala, V., Tumino, R., Vineis, P., Panico, S., Bueno-de-Mesquita, H. B., Verschuren, W. M. M., Struijk, E. A., Peeters, P. H., Engström, G., Melander, O., Sund, M., Weiderpass, E., Skeie, G., Lund, E., Norat,

- T., Gunter, M., Riboli, E. & Brennan, P. 2016. Modifiable causes of premature death in middle age in Western Europe: results from the EPIC cohort study. *BMC Medicine* 14, 87. doi:10.1186/s12916-016-0630-6.
- Noble, N., Paul, C., Turon, H. & Oldmeadow, C. 2015. Which modifiable health risk behaviours are related? A systematic review of the clustering of Smoking, Nutrition, Alcohol and Physical activity ('SNAP') health risk factors. *Preventive Medicine* 81, 16–41.
- Nocon, M., Hiemann, T., Müller-Riemenschneider, F., Thalau, F., Roll, S. & Willich, S. N. 2008. Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation* 15 (3), 239–246.
- Nordström, P., Pedersen, N., Gustafson, Y., Michaëlsson, K. & Nordström, A. 2016. Risks of Myocardial Infarction, Death, and Diabetes in Identical Twin Pairs With Different Body Mass Indexes. *JAMA Internal Medicine* 176 (10), 1522–1529.
- OECD/EU. 2016. *Health at a Glance: Europe 2016 – State of Health in the EU Cycle*. Pariisi: OECD Publishing. doi:10.1787/9789264265592-en.
- OECD/EU. 2020. *Health at a Glance: Europe 2020 – State of Health in the EU Cycle*. Pariisi: OECD Publishing. doi:10.1787/82129230-en.
- Paananen, R., Ristikari, T., Merikukka, M., Rämö, A., & Gissler, M. 2012. Lasten ja nuorten hyvinvointi Kansallinen syntymäkohortti 1987-tutkimusaineiston valossa. Raportti 52/2012. Helsinki: Terveystieteiden tutkimuskeskus.
- Patil, V., Ward, R. L. & Hesson, L. B. 2014. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics* 9 (6), 823–828.
- Patja, K. 2020. Tupakka ja sairaudet. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 20.6.2021. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01066>.
- Patrick, D. L., Chedale, A., Thompson, D. C., Diehr, P., Koepsell, T. & Kinne, S. 1994. The Validity of Self-Reported Smoking: A Review and Meta-Analysis. *American Journal of Public Health* 84 (7), 1086–1093.
- Perna, L., Zhang, Y., Mons, U., Hollecsek, B., Saum, K. U. & Brenner, H. 2016. Epigenetic age acceleration predicts cancer, cardiovascular, and all-cause mortality in a German case cohort. *Clinical Epigenetics* 8, 64. doi:10.1186/s13148-016-0228-z.

- Peschansky, V. J. & Wahlestedt, C. 2014. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* 9 (1), 3–12.
- Plunk, A. D., Syed-Mohammed, H., Cavazos-Rehg, P., Bierut, L. J. & Grucza, R. A. 2014. Alcohol consumption, heavy drinking, and mortality: rethinking the j-shaped curve. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 38 (2), 471–478.
- Popkin, B. M., Adair, L. S., & Ng, S. W. 2012. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews* 70 (1), 3–21.
- Porta, M. S. & Last, J. M. 2018. *A dictionary of public health. 2. painos.* New York: Oxford University Press. Viitattu 13.11.2020. <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780191844386.001.0001/acref-9780191844386>.
- Portegijs, E., Sipilä, S., Viljanen, A., Rantakokko, M. & Rantanen, T. 2017. Validity of a single question to assess habitual physical activity of community-dwelling older people. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 27 (11), 1423–1430.
- Prentice, A. M. & Jebb, S. A. 2001. Beyond body mass index. *Obesity Reviews* 2 (3), 141–147.
- Rebello-Marques, A., De Sousa Lages, A., Andrade, R., Ribeiro, C. F., Mota-Pinto, A., Carrilho, F. & Espregueira-Mendes, J. 2018. Aging Hallmarks: The Benefits of Physical Exercise. *Frontiers in Endocrinology* 9, 258. doi:10.3389/fendo.2018.00258.
- Ristikari, T., Törmäkangas, L., Lappi, A., Haapakorva, P., Kiilakoski, T., Merikukka, M., Hautakoski, A., Pekkarinen, E. & Gissler, M. 2016. Suomi nuorten kasvu ympäristönä - 25 vuoden seuranta vuonna 1987 Suomessa syntyneistä nuorista aikuisista. Raportti 9/2016. Helsinki: Terveystieteiden tutkimuskeskus/Nuorisotutkimusseura.
- Roelfs, D. J., Shor, E., Curreli, M., Clemow, L., Burg, M. M. & Schwartz, J. E. 2012. Widowhood and mortality: A meta-analysis and meta-regression. *Demography* 49 (2), 575–606.
- Roerecke, M. & Rehm, J. 2013. Alcohol use disorders and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Addiction* 108 (9), 1562–1578.
- Sakata, R., McGale, P., Grant, E. J., Ozasa, K., Peto, R. & Darby, S. C. 2012. Impact of smoking on mortality and life expectancy in Japanese smokers: a prospective cohort study. *BMJ* 345, e7093. doi:10.1136/bmj.e7093.

- Sillanpää, E., Ollikainen, M., Kaprio, J., Wang, X., Leskinen, T., Kujala, U. M. & Törmäkangas, T. 2019. Leisure-time physical activity and DNA methylation age—A twin study. *Clinical Epigenetics* 11, 12. doi:10.1186/s13148-019-0613-5.
- Smith, Z. D. & Meissner, A. 2013. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* 14 (3), 204–220.
- Stringhini, S., Carmeli, C., Jokela, M., Avendaño, M., Muennig, P., Guida, F., Ricceri, F., d’Errico, A., Barros, H., Bochud, M., Chadeau-Hyam, M., Clavel-Chapelon, F., Costa, G., Delpierre, C., Fraga, S., Goldberg, M., Giles, G. G., Krogh, V., Kelly-Irving, M., Layte, R., Lasserre, A. M., Marmot, M. G., Preisig, M., Shipley, M. J., Vollenweider, P., Zins, M., Kawachi, I., Steptoe, A., Mackenbach, J. P., Vineis, P. & Kivimäki, M. 2017. Socioeconomic status and the 25×25 risk factors as determinants of premature mortality: a multicohort study and meta-analysis of 1,7 million men and women. *The Lancet* 389 (10075), 1229–1237.
- Suomen virallinen tilasto. 2020a. Kuolemansyyt. ISSN=1799–5051. Helsinki: Tilastokeskus Viitattu 27.5.2021. <http://www.stat.fi/til/ksyyt/index.html>.
- Suomen virallinen tilasto. 2020b. Kuolleet. ISSN=1798–2529. Helsinki: Tilastokeskus. Viitattu 27.5.2021. <http://www.stat.fi/til/kuol/index.html>.
- Suomen virallinen tilasto. 2020c. Tieliikenneonnettomuustilasto. ISSN=1798-758X. Helsinki: Tilastokeskus. Viitattu: 27.5.2021. <http://www.stat.fi/til/ton/index.html>.
- Talens, R. P., Christensen, K., Putter, H., Willemsen, G., Christiansen, L., Kremer, D., Suchiman, H. E. D., Slagboom, P. E., Boomsma, D. I. & Heijmans, B. T. 2012. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* 11 (4), 694–703.
- Tan, Q., Heijmans, B. T., Hjelmborg, J. V. B., Soerensen, M., Christensen, K. & Christiansen, L. 2016. Epigenetic drift in the aging genome: a ten-year follow-up in an elderly twin cohort. *International Journal of Epidemiology* 45 (4), 1146–1158.
- Tarkiainen, L., Martikainen, P., Peltonen, R. & Remes, H. 2017. Sosiaaliryhmien elinajanodote-erojen kasvu on pääosin pysähtynyt. *Suomen Lääkärilehti* 72 (9), 588–593.
- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2012. Terveys, toimintakyky ja hyvinvointi Suomessa 2011. Koskinen, S., Lundqvist, A. & Ristiluoma, N. (toim.) Raportti 68/2012. Helsinki: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.

- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2020. Sydän- ja verisuonitautien yleisyys. Viitattu 10.1.2021. <https://thl.fi/fi/web/kansantaudit/sydan-ja-verisuonitaudit/sydan-ja-verisuonitautien-yleisyys>.
- Thebault, J. L., Ringa, V., Panjo, H., Bloy, G., Falcoff, H. & Rigal, L. 2018. Accumulation of unhealthy behaviors: Marked social inequalities in men and women. *Preventive Medicine Reports*, 12, 1–5. doi:10.1016/j.pmedr.2018.07.008.
- Tiainen, K., Sipila, S., Alen, M., Heikkinen, E., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Tolvanen, A., Pajala, S. & Rantanen, T. 2004. Heritability of maximal isometric muscle strength in older female twins. *Journal of Applied Physiology* 96 (1), 173–180.
- Tieteen termipankki. 2014. Biomarkkeri. Viitattu 11.1.2021. tieteentermipankki.fi/wiki/Biologia:biomarkkeri.
- Tilastokeskus 2021. Käsitteet, mediaani. Viitattu 4.1.2021. <https://www.stat.fi/meta/kas/mediaani.html>.
- Tra, J., Kondo, T., Lu, Q., Kuick, R., Hanash, S. & Richardson, B. 2002. Infrequent occurrence of age-dependent changes in CpG island methylation as detected by restriction landmark genome scanning. *Mechanisms of ageing and development* 123 (11), 1487–1503.
- Traversy, G. & Chaput, J. P. 2015. Alcohol Consumption and Obesity: An Update. *Current Obesity Reports* 4 (1), 122–130.
- van den Berg, N., ks. kohdasta Berg, N. van den
- Voisin, S., Harvey, N. R., Haupt, L. M., Griffiths, L. R., Ashton, K. J., Coffey, V. G., Doering, T. M., Thompson, J-L. M., Benedict, C., Cedernaes, J., Lindholm, M. E., Craig, J. M., Rowlands, D. S., Sharples, A. P., Horvath, S. & Eynon, N. 2020. An epigenetic clock for human skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 11 (4), 887–898.
- Wang, Y., Karlsson, R., Lampa, E., Zhang, Q., Hedman, Å. K., Almgren, M., Almqvist, C., McRae, A. F., Marioni, R. E., Ingelsson, E., Visscher, P. M., Deary, I. J., Lind, L., Morris, T., Beck, S., Pedersen, N. L. & Hägg, S. 2018. Epigenetic influences on aging: a longitudinal genome-wide methylation study in old Swedish twins. *Epigenetics* 13 (9), 975–987.
- Watson, J. D. & Crick, F. H. 1953. The structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 18, 123–131.

- Weidner, C. I., Lin, Q., Koch, C. M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Bauerschlag, D. O., Jöckel, K-H., Erbel, R., Mühleisen, T. W., Zenke, M., Brümmendorf, T. H. & Wagner, W. 2014. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome biology* 15, R24. doi:10.1186/gb-2014-15-2-r24.
- Werneck, A. O., Oyeyemi, A. L., Szwarcwald, C. L. & Silva, D. R. 2019. Association between physical activity and alcohol consumption: Sociodemographic and behavioral patterns in Brazilian adults. *Journal of Public Health* 41 (4), 781–787.
- Winter, J. E., MacInnis, R. J., Wattanapenpaiboon, N. & Nowson, C. A. 2014. BMI and all-cause mortality in older adults: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 99 (4), 875–890.
- World Health Organization. 2018. WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2000–2025. 2. painos. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. 2020. The top 10 causes of death. Viitattu 10.12.2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- Yang, Z., Wong, A., Kuh, D., Paul, D. S., Rakyant, V. K., Leslie, R. D., Zheng, S. C., Widschwendter, M., Beck, S. & Teschendorff, A. E. 2016. Correlation of an epigenetic mitotic clock with cancer risk. *Genome Biology* 17, 205. doi:10.1186/s13059-016-1064-3.
- Yousefi, P., Huen, K., Davé, V., Barcellos, L., Eskenazi, B. & Holland, N. 2015. Sex differences in DNA methylation assessed by 450 K BeadChip in newborns. *BMC Genomics* 16, 911. doi:10.1186/s12864-015-2034-y.
- Yusuf, S., Joseph, P., Rangarajan, S., Islam, S., Mente, A., Hystad, P., Brauer, M., Kutty, V. R., Gupta, R., Wielgosz, A., AlHabib, K. F., Dans, A., Lopez-Jaramillo, P., Avezum, A., Lanas, F., Oguz, A., Kruger, I. M., Diaz, R., Yusoff, K., Mony, P., Chifamba, J., Yeates, K., Kelishadi, R., Yusufali, A., Khatib, R., Rahman, O., Zatonska, K., Iqbal, R., Wei, L., Bo, H., Rosengren, A., Kaur, M., Mohan, V., Lear, S. A., Teo, K. K., Leong, D., O'Donnell, M., McKee, M. & Dagenais, G. 2020. Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): A prospective cohort study. *The Lancet* 395 (10226), 795–808.
- Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Parys-Proszek, A., Makowska, Ż., Pałeczka, A., Kucharczyk, K., Płoski, R. & Branicki, W. 2015. Development of a forensically

- useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Science International: Genetics* 17, 173–179.
- Zhang, F. F., Cardarelli, R., Carroll, J., Fulda, K. G., Kaur, M., Gonzalez, K., Vishwanatha, J. K., Santella, R. M. & Morabia, A. 2011. Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. *Epigenetics* 6 (5), 623–629.
- Zhang, Q., Vallerga, C. L., Walker, R. M., Lin, T., Henders, A. K., Montgomery, G. W., He, J., Fan, D., Fowdar, J., Kennedy, M., Pitcher, T., Pearson, J., Halliday, G., Kwok, J. B., Hickie, I., Lewis, S., Anderson, T., Silburn, P. A., Mellick, G. D., Harris, S. E., Redmond, P., Murray, A. D., Porteous, D. J., Haley, C. S., Evans, K. L., McIntosh, A. M., Yang, J., Gratten, J., Marioni, R. E., Wray, N. R., Deary, I. J., McRae, A. F. & Visscher, P. M. 2019. Improved precision of epigenetic clock estimates across tissues and its implication for biological ageing. *Genome Medicine* 11, 54. doi:10.1186/s13073-019-0667-1.
- Zhang, Y., Schöttker, B., Florath, I., Stock, C., Butterbach, K., Holleczeck, B., Mons, U. & Brenner, H. 2016. Smoking-Associated DNA Methylation Biomarkers and Their Predictive Value for All-Cause and Cardiovascular Mortality. *Environmental Health Perspectives* 124 (1), 67–74.
- Zhang, Y., Wilson, R., Heiss, J., Breitling, L. P., Saum, K. U., Schöttker, B., Holleczeck, B., Waldenberger, M., Peters, A. & Brenner, H. 2017. DNA methylation signatures in peripheral blood strongly predict all-cause mortality. *Nature Communications* 8, 14617. doi:10.1038/ncomms14617.
- Zhang, Y., Yang, R., Burwinkel, B., Breitling, L. P. & Brenner, H. 2014. F2RL3 methylation as a biomarker of current and lifetime smoking exposures. *Environmental Health Perspectives* 122 (2), 131–137.
- Zheng, W., McLerran, D. F., Rolland, B., Zhang, X., Inoue, M., Matsuo, K., He, J., Matsuo, K., He, J., Gupta, P. C., Ramadas, K., Tsugane, S., Irie, F., Tamakoshi, A., Gao, Y-T., Wang, R., Shu, X-O., Tsuji, I., Kuriyama, S., Tanaka, H., Satoh, H., Chen, C-J., Yuan, J-M., Yoo, K-Y., Ahsan, H., Pan, W-H., Gu, D., Pednekar, M. S., Sauvaget, C., Sasazuki, S., Sairenchi, T., Yang, G., Xiang, Y-B., Nagai, M., Suzuki, T., Nishino, Y., You, S-L., Koh, W-P., Park, S. K., Chen, Y., Shen, C-Y., Thornquist, M., Feng, Z., Kang, D., Boffetta, P. & Potter, J. D. 2011. Association between Body-Mass Index and

Risk of Death in More Than 1 Million Asians. *The New England Journal of Medicine* 364 (8), 719–729.

Zheng, Y., Joyce, B. T., Colicino, E., Liu, L., Zhang, W., Dai, Q., Shrubsole, M. J., Kibbe, W. A., Gao, T., Zhang, Z., Jafari, N., Vokonas, P., Schwartz, J., Baccarelli, A. A. & Hou, L. 2016. Blood epigenetic age may predict cancer incidence and mortality. *EBioMedicine* 5, 68–73.