

## **Recenzja Rozprawy Doktorskiej**

**Lek. Kamili Migacz-Gruszki**

### **„Genetyka oraz tempo starzenia pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem złośliwym skóry”**

Pani lek. Kamila Migacz-Gruszka jest absolwentką kierunku lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego i jest związana z Katedrą i Kliniką Dermatologii tej Uczelni od początku pracy zawodowej. Praca w niezwykle aktywnym naukowo zespole kierowanym przez Panią Profesor Annę Wojas-Pelc zaowocowała nowatorską pracą dotyczącą analizy wybranych parametrów związanych z profilem genetycznym i procesem starzenia u pacjentów z czerniakiem.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie monografii, która stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, Układ monografii jest typowy z dołączonym streszczeniem w języku angielskim.

Kandydatka w przedstawionym do oceny kompleksowym badaniu naukowym postawiła istotne cele naukowe, w tym: 1) Ocena wpływu czynników środowiskowych na rozwój czerniaka, 2) Porównanie szybkości starzenia się skóry mierzonego obiektywnymi parametrami klinicznymi u pacjentów z rozpoznaniem czerniaka, 2) epigenetyczna charakterystyka wieku biologicznego pacjentów, 3) Analiza ewentualnej korelacji parametrów starzenia skóry z epigenetycznymi parametrami starzenia, 4) ocena ewentualnego związku zachorowania na czerniaka z parametrami wieku epigenetycznego, 5) analiza zaburzeń metylacji DNA w kontekście czynników środowiskowych u pacjentów z czerniakiem w wywiadzie, 6) Szeroka analiza polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) u pacjentów z czerniakiem

Do badania włączono 202 osoby dorosłe, w tym 101 osób z czerniakiem w wywiadzie oraz 101 osób grupy kontrolnej dobranej pod względem płci i wieku.

Metodologia obejmowała uzyskanie odpowiedzi pacjentów na standaryzowany zestaw wielu pytań przygotowanych w formie kwestionariusza, w tym pytanie Międzynarodowego Kwestionariusza Aktywności Fizycznej (International Physical Activity Questionnaire, IPAQ). Oceniano cechy fotostarzenia skóry wg skali Dr. Richarda Glogaua. Analizowane parametry dotyczące starzenia skóry dokumentowano w formie obrazów 2D i 3D. Analizy epigenetyczne, genetyczne oraz statystyczne zostały przeprowadzone we współpracy z Małopolskim Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Analizę asocjacji w skali całego genomu (ang. genome-wide association study; GWAS) przeprowadzono u wszystkich badanych. Dane wielkoskalowe typu SNP zostały zgromadzone z zastosowaniem technologii mikromacierzy typu Infinium Global Screening Array-24 Kit, a wygenerowane dane zostały poddane analizie jakościowej i filtrowaniu ze względu na kryteria m.in. częstości rzadszego allelu ( $MAF > 0.05$ ) i zgodności z prawem Hardy'ego-Weinberga ( $P > 1 \times 10^{-6}$ ). Łączna liczba 477 828 polimorfizmów SNP została poddana analizie asocjacyjnej z zastosowaniem oprogramowania PLINK (v 1.9) i środowiska R (4.2.1). Manhattan Plot został utworzony za pomocą oprogramowania Haploview.

Analizę metylacji DNA przeprowadzono przy zastosowaniu technologii mikromacierzy i zestawu Infinium Methylation EPIC. Liczba sond CpG wynosiła 865 918. Surowe dane zostały poddane analizie jakościowej z zastosowaniem programów minfi, limma i RnBeads zaimplementowanych w środowisku R. Wstępną analizę jakości przeprowadzono na plikach idat z zastosowaniem oprogramowania GenomeStudio. Badania obejmowały analizę pakietu sond wewnętrznych odpowiadających kontroli konwersji wodorosiarczynem sodu, kontroli specyficzności i wydajności hybrydyzacji. Status metylacji dla każdej analizowanej pozycji CpG został zdefiniowany jako średnia wartość B (0-1), która wyliczana była jako proporcja sygnału metylacji do sygnału całkowitego. Wygenerowane wartości B metylacji zostały wykorzystane do różnych parametrów epigenetycznego starzenia się.

Wiek epigenetyczny ocenioną na podstawie oceny metodą zegara Horvath, Skin and Blood Clock, zegara Hannuma, PhenoAge oraz GrimAge. W badaniu wykorzystano również metody: PoAm (Pace of Aging Methylation), epigenetyczny wskaźnik ryzyka śmiertelności wg. Zhang (Zhang mortality score), a także estymator długości telomerów leukocytów oparty na metylacji DNA DNAmTL (DNA methylation-based estimator of telomere length).

Następnie obliczono epigenetyczne przyspieszenie wieku (Epigenetic Age Acceleration, EAA), które stanowi miarę różnicy między wiekiem chronologicznym a wiekiem epigenetycznym. Wszystkie wygenerowane wartości parametru EAA dla poszczególnych zegarów zostały następnie przeanalizowane pod kątem korelacji z parametrami klinicznymi. W części dotyczącej metodyki podano numer zgody komisji etycznej.

W części dotyczącej wyników przedstawiono szczegółową charakterystykę pacjentów z czerniakiem i grupy kontrolnej. Wyniki zostały szczegółowo bardzo opisane oraz przedstawione na wykresach pudełkowych, słupkowych, liniowych, punktowych i w tabelach.

Uzyskane w pierwszej części badania wyniki częściowo potwierdziły dotychczasowe dane literaturowe. Dotyczy to na przykład związku czerniaka z korzystaniem z lamp emitujących promienie UV (solariów).

Autorka dokonała również analizy ewentualnego związku między ilością spożywanej kawy i rozwojem czerniaka. Związek między spożyciem kawy i herbaty a czerniakiem pozostaje przedmiotem kontrowersji. Oszacowano nawet, iż ryzyko zachorowania na czerniaka zmniejsza się średnio o 4,5 procent dla każdej filiżanki kawy dziennie w porównaniu do osób nie spożywających kawy. W przeprowadzonej w przedstawionej do oceny analizie nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy między pacjentami i grupą kontrolną. Te wyniki w sposób istotny wpisują się do dyskusji nad potencjalną rolą chemoprewencyjną kawy. Interesująca w tym aspekcie byłaby pogłębiona analiza potencjalnej roli protekcyjnej kofeiny w kontekście uzyskanych przez Autorkę parametrów epigenetycznych.

zaobserwowali pierwsze oznaki siwienia pomiędzy grupą badawczą a kontrolną.

W pracy potwierdzono też dotychczasowe obserwacje o większym ryzyku rozwoju czerniaka u osób z nasilonymi cechami fotostarzenia skóry, jednak odmiennie niż dotychczas do oceny wykorzystano metodę oceny fotostarzenia wg skali Glogaua, co powoduje, że wyniki tych badań łatwiej jest przenieść do praktyki klinicznej i profilaktycznych akcji społecznych.

Wśród licznych uzyskanych w projekcie naukowym wyników badań moją uwagę zwróciły w szczególności niektóre nowatorskie dane.

W pracy podjęto próbę identyfikacji czynników zewnętrznych wywołujących zmiany w metylacji DNA w badanej populacji. W przeprowadzonej analizie pomiędzy grupami nie zaobserwowano pozycji różniących się istotnie w średnich poziomach metylacji. Podzielałam pogląd autorki, że czynniki egzogenne różnicujące obydwie grupy (pacjentów czerniakiem i grupą kontrolną), czyli głównie korzystanie z solarium i oparzenia słoneczne mogą nie wpływać długofalowo na metylację DNA, mimo że pozostawiają wieloletni ślad biologiczny zwiększający ryzyko zachorowania na czerniaka po kilku lub kilkunastu latach.

W pracy oceniono wiek epigenetyczny pacjentów zegarów Horvath, Skin and Blood Clock, Hannum, PhenoAge, GrimAge, Telomere Length, parametru szybkości starzenia się PoAm i epigenetycznego wskaźnika ryzyka śmiertelności Zhang mortality score. Dla każdego z zegarów oszacowano parametr przyspieszenia epigenetycznego.

Nie stwierdzono istotnych różnic między średnimi wartościami wieku epigenetycznego i w zakresie parametrów przyspieszenia wieku. Zwraca uwagę, że wiek zachorowania na czerniaka wykazywał szeroką rozpiętość od 16 do 80 roku życia, co mogło dodatkowo utrudnić analizę wyników, z czym Doktorantka poradziła sobie doskonale wykonując dodatkowe subanalizy w podziale na podgrupy pacjentów.

W przedstawionej do oceny pracy zaobserwowano ponadto, iż pacjenci z czerniakiem wywodzącym się z płamy soczewicowatej charakteryzowali się istotnie wyższą średnią wartością DNAmTL (DNA methylation-based estimator of telomere length) w porównaniu z czerniakiem szerzącym się powierzchownie. Wynik ten jest szczególnie interesujący i wart szybkiej publikacji gdyż może pośrednio wskazywać, że przewlekła ekspozycja na światło słoneczne wpływa na wydłużanie telomerów. Znaczenie kliniczne tej obserwacji jest trudne do oszacowania, ale może być niezwykle istotne.

W analizie ogólnogenomowej zmienności SNP nie zidentyfikowano żadnego nowego istotnego polimorfizmu związanego z czerniakiem skóry. W zakresie znanych SNP związanych z czerniakiem przeprowadzone przez Autorkę badania wykazały, że badana populacja charakteryzowała się podobnymi asocjacjami jak w dotychczas opublikowanych badaniach. Te wyniki są również zbieżne z wynikami uzyskanymi przez zespół naszej Kliniki w analizach SNP przeprowadzonych przy użyciu innej, starszej, metodologii.

We wnioskach Autorka podkreśliła między innymi iż: 1) W badanej grupie stwierdzono związek czerniaka z czynnikami egzogennymi, w tym intensywną ekspozycją na UV (sztuczne lub naturalne, powodujące oparzenia skóry), 2) Nie istnieje bezpośrednia korelacja między metylacją DNA, czynnikami środowiskowymi a wystąpieniem czerniaka złośliwego skóry oraz, że czynniki zewnętrzne takie jak korzystanie z lamp emitujących promienie UV lub oparzenia słoneczne nie wpływają długofalowo na metylację DNA, dlatego metylacja DNA nie jest adekwatnym narzędziem wykrywania czynników ryzyka czerniaka i jego wczesnej diagnostyki, 3) potwierdzono w badanej grupie istotnie częstsze występowanie znanych markerów SNP charakterystycznych dla czerniaka w populacji europejskiej. Uzyskane wyniki mogą być praktyczną rekomendacją do oznaczania SNP w określaniu predyspozycji genetycznej do wystąpienia czerniaka u pacjentów z grupy ryzyka, 4) pacjenci z czerniakiem inwazyjnym charakteryzowali się wolniejszym tempem epigenetycznego starzenia niż pacjenci bez rozpoznanego czerniaka złośliwego skóry, co wydaje się różnić czerniaka od innych nowotworów, w których uzyskano wyniki wskazujące przyspieszony wiek biologiczny. 5) pacjenci z czerniakiem zlokalizowanym na skórze twarzy charakteryzowali się dłuższymi telomerami oszacowanymi na podstawie metylacji DNA w porównaniu do pacjentów u których czerniak został zdiagnozowany w lokalizacjach o mniejszej typowej ekspozycji na UV. Wydaje się, że przewlekła ekspozycja na światło UV spowalnia proces starzenia się epigenetycznego, zatem nie jest czynnikiem ryzyka chorób związanych z wiekiem oraz 6) pacjenci z czerniakiem charakteryzowali się bardziej nasilonym starzeniem i fotostarzeniem skóry twarzy wg. stosowanej skali analizy klinicznej.

W najistotniejszej w mojej ocenie konkluzji z przeprowadzonych badań naukowych Autorka wskazuje, że „Mając na uwadze całokształt uzyskanych wyników, można wnioskować, że starzenie się skóry nie koreluje z wiekiem epigenetycznym”. Jest to nowatorska, a nawet można uznać, że przełomowa w skali dotychczasowej wiedzy naukowej obserwacja.

Do tej, ogólnie znakomitej pracy mam jedno przemyślenie dotyczące możliwości ewentualnej modyfikacji w przyszłych publikacjach. Stosowane przez część ekspertów nazewnictwo uległo modyfikacji z „czerniak złośliwy” na „czerniak”, gdy nazwę zmiany łagodnej nazywanej poprzednio „juvenile melanoma” zmieniono na „znięcie Spitz”. Wobec nieistnienia od tego momentu czerniaka „łagodnego”, wielu ekspertów

uprościło nazewnictwo do „czerniak” zamiast „czerniak złośliwy”. Jednak nazwa „czerniak złośliwy” jest stosowana w piśmiennictwie międzynarodowym i polskim jako równorzędna z „czerniak” i powyższe przemyślenie ma wyłącznie związek z moją indywidualną preferencją dotyczącą nazewnictwa.

W podsumowaniu przedstawiona do oceny rozprawa doktorska doskonale prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemów naukowych związanych z czerniakiem, a wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie w zakresie potencjalnego zastosowania wyników w dermatologii praktycznej.

**W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie pani lek. Kamili Migacz-Gruszki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**

**W związku z wyjątkowo wysokim poziomem naukowym rozprawy doktorskiej, wnoszę o jej wyróżnienie.**

Uzasadnienie:

Praca jest metodologicznie niezwykle rozbudowana oparta na najbardziej współczesnych metodach oceny klinicznej i molekularnej. Zwraca uwagę niezwykle różnorodność form prezentacji wyników, bardzo dobrze dostosowana to rodzaju wyników i planowanego zwrócenia uwagi czytelnika na najważniejsze parametry. Forma prezentacji wyników i dyskusja świadczą o głębokim zrozumieniu metodologii naukowej i tematyki niezwykle szeroko związanej z rozprawą. W najistotniejszej w mojej ocenie konkluzji z przeprowadzonych badań naukowych Autorka wskazuje, że starzenie skóry nie koreluje z wiekiem epigenetycznym. Jest to nowatorska, a nawet można uznać że przełomowa dobrze udokumentowana koncepcja, która zapewne znajdzie odzwierciedlenie w publikacji w jednym z najbardziej prestiżowych pism medycznych.

Signature Not Verified

Digitally signed by  Lidia Rudnicka  
Date: 2023.07.16 16:43:43 CST