

Badanie roli zmienności genetycznej i epigenetycznej w starzeniu się skóry twarzy i włosów głowy oraz genetyczna predykcja związanych z wiekiem cech wyglądu człowieka

Abstrakt

Proces starzenia charakteryzuje się stopniowym pogorszeniem czynności fizjologicznej narządów. Na ten złożony proces wpływa wiele czynników wewnętrznych i zewnętrznych, takich jak czynniki genetyczne, epigenetyczne i różne czynniki ryzyka związane ze stylem życia. Starzeniu się towarzyszą również zmiany w wyglądzie fizycznym człowieka, które mogą służyć jako wskaźnik wieku biologicznego i są powiązane z zaburzeniem procesów fizjologicznych, chorobami związanymi z wiekiem i współczynnikiem przeżycia.

Z tego względu badanie molekularnych podstaw związanych z wiekiem zmian w wyglądzie fizycznym człowieka może zapewnić wgląd w podstawowe mechanizmy starzenia. Poprzednie badania wykazały, że zależne od wieku zmiany w wyglądzie są powiązane ze zmiennością genetyczną. Na potrzeby badań kryminalistycznych opracowano metody genetyczne umożliwiające predykcję cech fizycznych człowieka (ang. *externally visible characteristics*, EVC), takich jak wzrost, kolor skóry, oczu i włosów, łysienia androgenicznego, a także cech twarzy nieznaney osoby, w celu zawężenia kręgu osób podejrzanych w prowadzonej sprawie kryminalnej.

Dodatkowo, poszerzenie wiedzy na temat genetycznych podstaw związanych z wiekiem cech wyglądu człowieka ma praktyczne zastosowanie w dermatologii i przemyśle kosmetycznym, koncentrując się na badaniu genów i mechanizmów, których analiza może być wykorzystana do opracowywania nowych leków, których zastosowanie prowadzi do zapobiegania lub spowalniania klinicznych oznak starzenia się skóry.

Oprócz zmienności genetycznej biomarkerem starzenia fenotypowego są również zmiany epigenetyczne, w szczególności związane z wiekiem zmiany w metylacji DNA (ang. *DNA methylation*, DNAm). W literaturze dostępne są oparte na analizie DNAm estymatory wieku epigenetycznego, które zostały opracowane poprzez regresję wieku chronologicznego na poziom metylacji wybranych miejsc CpG w genomie. Powszechnie stosowane estymatory

wieku, znane również jako zegary epigenetyczne, wykorzystano do śledzenia zachodzącego w różnych tkankach procesu starzenia komórek i na podstawie zmierzonych wartości estymatory podzielono na różne generacje zegarów, które mogą uwzględniać różne aspekty procesów starzenia się. W szczególności analizie poddaje się parametr przyspieszenia wieku epigenetycznego (EAA), który odzwierciedla różnicę między wiekiem chronologicznym a wiekiem epigenetycznym i dla którego wykazano związek z różnymi chorobami wieku starczego. Co istotne, korelacja wzorów metylacji, starzenia epigenetycznego, a przede wszystkim parametrów EAA z zależnymi od wieku cechami wyglądu człowieka nie została do tej pory dobrze opisana.

W związku z powyższym, głównym celem niniejszej pracy było zbadanie różnych aspektów molekularnych związanych z wiekiem cech wyglądu człowieka, w tym podstaw genetycznych i epigenetycznych, a także powiązanie wybranych cech wyglądu z czynnikami środowiskowymi i indywidualnym tempem starzenia się. Plan badań obejmował cztery etapy, a przeprowadzone analizy dostarczyły dowodów wspierających cztery podstawowe hipotezy:

1) Wiek metylacyjny DNAm i parametr przyspieszenia wieku epigenetycznego są skorelowane z cechami wyglądu człowieka i mogą dostarczać szerszej informacji w procesie przewidywania wieku postrzeganego i związanych z wiekiem cech wyglądu niż informacja na temat wieku chronologicznego.

2) Powiązane z cechami wyglądu markery metylacyjne typu CpG i warianty genetyczne, zidentyfikowane w drodze badań asocjacyjnych całego genomu i epigenomu (ang. *genome-wide and epigenome-wide association studies*; GWAS, EWAS), mogą dostarczyć nowych informacji na temat biologii leżącej u podstaw starzenia się skóry i włosów.

3) Związane z wiekiem cechy wyglądu i wiek postrzegany twarzy można przewidzieć poprzez opracowanie dokładniejszych lub nowych modeli predykcyjnych, wykorzystując unikatową kombinację informacji na temat polimorfizmu SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*), CpG, wieku DNAm i parametrów EAA.

4) Poprzez badanie wariantów SNP powiązanych istotnie statystycznie w skali całego genomu z różnymi parametrami EAA można ocenić rolę genów w determinacji epigenetycznego starzenia.

Aby osiągnąć powyższe cele zgromadzono próbki DNA, szczegółowe dane dotyczące stylu życia i wysokiej jakości skany 3D twarzy od reprezentatywnej grupy osób z Polski.

Przeprowadzone badania obejmowały analizę metylacji DNA w celu oceny indywidualnego tempa starzenia epigenetycznego i analizy jego korelacji z określonymi cechami EVC. Analizie poddano także korelacje pomiędzy różnymi cechami starzenia się skóry twarzy i włosów głowy a stopniem epigenetycznego starzenia. Dodatkowo z wykorzystaniem badania GWAS oceniono asocjację parametrów EAA z polimorfizmem typu SNP. Na koniec zestaw zidentyfikowanych markerów SNP, CpG, pomiary wieku DNAm i wartości parametrów EAA wykorzystano w celu opracowania nowych modeli predykcyjnych dla różnych EVC związanych z wiekiem i postrzeganego wieku twarzy.

W rezultacie, porównując różne metody wstępnej analizy danych metylacyjnych, wykazano, że zegar Skin&Blood ma najwyższą dokładność w przewidywaniu wieku chronologicznego zarówno w próbkach krwi, jak i wymazach z jamy ustnej, ze średnim błędem bezwzględnym (ang. *mean absolute error*, MAE) wynoszącym odpowiednio 2,47 i 3,86 lat. Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że metoda normalizacji danych typu ssNoob jest odpowiednio zoptymalizowana do wstępnego przetwarzania danych metylacyjnych, poprzedzającego zastosowanie różnych zegarów epigenetycznych do predykcji wieku chronologicznego. Przeprowadzone analizy ujawniły wysoką korelację pomiędzy wiekiem chronologicznym a wynikami analizy uzyskanymi z zastosowaniem różnych wykorzystanych w niniejszym badaniu zegarów epigenetycznych ($r > 0,9$), podczas gdy pomiędzy parametrami EAA wyznaczonymi z zastosowaniem różnych zegarów epigenetycznych stwierdzono jedynie umiarkowane lub słabe korelacje.

Analiza asocjacji różnych czynników socjodemograficznych z cechami starzenia się skóry twarzy wykazała, że posiadanie wykształcenia wyższego jest istotnie statystycznie związane z niższym wiekiem postrzeganym twarzy, fotostarzeniem, opadaniem powiek, subiektywnym tempem starzenia się i pomiarami morfologicznymi, takimi jak wysokość twarzy i ust. Analizy wykazały, że osoby o wyższym statusie społeczno-ekonomicznym postrzegane są jako młodsze i wykazują mniej oznak starzenia się skóry. Osoby mieszkające na obszarach miejskich mają istotnie statystycznie mniej zmarszczek i niższą subiektywną ocenę starzenia. Zaobserwowano, że siedzący tryb pracy koreluje z młodszym wyglądem i związaną z wiekiem krótszą wysokością twarzy, podczas gdy praca fizyczna może skutkować opadaniem powiek, co może być związane z większą ekspozycją na słońce i promieniowanie UV.

Stwierdzono także związek różnych czynników związanych ze stylem życia ze starzeniem się skóry twarzy i włosów głowy w populacji polskiej. Praktykowanie jogi zostało powiązane ze zmniejszonym stopniem występowania tzw. „kurzych łapek” i niższym subiektywnym tempem

starzenia się. Stres był w analizach istotnie statystycznie powiązany ze starszym wiekiem postrzeganym, zwiększoną liczbą „kurzych łapek” oraz zmniejszeniem morfologicznej wysokości twarzy i ust. Odkryto, że aktywność fizyczna może mieć wpływ na starzenie się skóry. Analizy wykazały również, że wyższy wskaźnik masy ciała (BMI) jest istotnie powiązany z różnymi wskaźnikami starzenia się skóry, takimi jak opadanie powiek, zwiększony stopień występowania teleangiektazji (tj. rozszerzonych naczyń krwionośnych) i wypadaniem włosów. Badanie ujawniło istotny związek pomiędzy paleniem tytoniu a występowaniem zmarszczek na całej twarzy, które, jak stwierdzono, nasila się w sposób zależny od dawki.

Co istotne, przeprowadzone badania wykazały związek pomiędzy cechami EVC a wiekiem metylacyjnym i różnymi miarami EAA. Estymator Skin&Blood został istotnie powiązany z wyższym wiekiem postrzeganym twarzy, a kalkulator Hannum wykazał istotny związek z wypadaniem włosów. Wyższe epigenetyczne przyspieszenie wieku powiązane z siwieniem włosów. Ponadto parametry EAA wyznaczone z zastosowaniem kalkulatorów PhenoAge, GrimAge, FitAge, estymatora tempa starzenia, wskaźnika ryzyka śmiertelności (ang. *mortality risk score*, MRS) i zegar metylacyjny długości telomerów wykazały związek z różnymi miarami starzenia się skóry i siwienia włosów.

Wyniki analizy GWAS wykazały, że przyspieszone starzenie wyznaczone zegarem GrimAge, będące oceną ryzyka zgonu, jest powiązane z polimorfizmem rs73218878 ($P = 2,87 \times 10^{-8}$). Zidentyfikowany SNP zlokalizowany jest w genie *SOCS2*, który jest znany ze swojej roli w mechanizmach związanych z długowiecznością. Stwierdzono także istotne w skali ogólnogenomowej asocjacje dla stopnia występowania zmarszczek z pozycją rs73943403 zlokalizowaną w obrębie występującego na chromosomie 18 genu RP11-78F17.1 ($P = 3,72 \times 10^{-8}$) oraz dla postrzeganego wieku z pozycją rs113125564 zlokalizowanego na chromosomie 19 genu *ZC3H4* ($P = 1,23 \times 10^{-8}$). Ponadto za pomocą szeregu przeprowadzonych analiz EWAS zidentyfikowano istotne statystycznie markery metylacyjne pod kątem cech starzenia się twarzy, a analiza ontologii genów (GO) wykrytych markerów zmapowała je do 162 unikalnych genów, w tym genu *EDAR*, który jest zaangażowany we wzrost włosów, zębów oraz rozwój chorób skóry. Zidentyfikowane GO przypisano szlakom biochemicznym zaangażowanym w procesy rozwojowe i komórkowe. Wyniki przeprowadzonych analiz pozwoliły zidentyfikować nowe geny kandydackie i ścieżki zaangażowane w procesy starzenia się skóry, których dalsza analiza może zostać wykorzystana w przemyśle kosmetycznym i dermatologii przy

opracowywaniu terapii i leków zapobiegających powstawaniu zmarszczek na twarzy lub zmniejszających ich zakres.

Ostatecznie, wykorzystując zidentyfikowane markery genetyczne i epigenetyczne, opracowano nowe modele predykcyjne do estymacji wieku postrzeganego twarzy ze średnim błędem bezwzględnym na poziomie 4,07 lat oraz do predykcji stopnia występowania zmarszczek z dokładnością określoną przez parametr AUC-ROC na poziomie 0,95. Opracowane modele stanowią obiecujące narzędzia o praktycznym zastosowaniu w dochodzeniach kryminalistycznych i mogą zastępować rolę świadków zdarzenia, szczególnie w sprawach, w których nie ma podejrzanego, gdy informacje o wieku i cechach twarzy są niedostępne.

Podsumowując, przeprowadzone badania umożliwiły pogłębienie wiedzy w zakresie procesów starzenia się skóry twarzy i włosów głowy oraz wykazały znaczący wpływ zarówno stylu życia, jak i zmienności DNA na determinację cech EVC związanych z wiekiem. Opracowane modele wskazują, że wiek metylacyjny i parametry EAA są przydatne w analizie predykcyjnej cech wyglądu. Ma to istotne implikacje dla badań kryminalistycznych, a także otwiera nowe możliwości w badaniach klinicznych. Modele mogą znaleźć zastosowanie jako narzędzia do oceny skuteczności zastosowanych planów interwencji przeciwstarzeniowej i zabiegów kosmetycznych. Pomiar wpływu zastosowanego planu interwencji na zmiany widoczne w zakresie cech wyglądu może dostarczyć cennych informacji w zakresie badań nad starzeniem się biologicznym. Należy zauważyć, że systematyczna ewaluacja różnych zegarów epigenetycznych wykazała, że najwyższą przydatnością i najsilniejszym związkiem z cechami starzenia się skóry twarzy charakteryzują się estymatory GrimAge, FitAge i DunedinPoAm. Wskazane estymatory mogą służyć jako biomarkery w przyszłych badaniach nad starzeniem się skóry i badaniach kryminalistycznych. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują obiecujące kierunki dla dalszych badań zarówno w dziedzinie starzenia się, jak i kryminalistyki.

Słowa kluczowe: starzenie się skóry, starzenie się włosów skóry głowy, zegary epigenetyczne, przyspieszenie wieku epigenetycznego