

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum

Lek. Kamila Migacz-Gruszka

Genetyka oraz tempo starzenia pacjentów ze zdiagnozowanym  
czerniakiem złośliwym skóry.

*Praca doktorska*

Promotor: prof. dr hab. n. med. Anna Wojas-Pelc

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Dermatologii UJ CM

Kierownik jednostki: prof. dr hab. n. med. Anna Wojas-Pelc

Kraków, rok 2023



*Chciałabym szczególnie podziękować Pani Prof. dr hab. n. med. Annie Wojas-Pelc za umożliwienie rozwoju naukowego, zaangażowanie, poświęcony czas, okazaną życzliwość, cierpliwość, a także cenne uwagi oraz wskazówki nadające ostateczny kształt tej pracy.*

*Wyrazy podziękowania Prof. dr hab. Wojciechowi Branickiemu oraz dr Ewelinie Pośpiech za owocną współpracę, realizację czasochłonnych analiz genetycznych, oraz umożliwienie sfinansowania niniejszych badań.*

*Moim Najbliższym, Mężowi, Córce i Rodzicom dziękuję za motywację oraz wszelkie wsparcie na każdym etapie tworzenia niniejszej pracy.*



## Spis treści

<b>WYKAZ SKRÓTÓW .....</b>	<b>7</b>
<b>1. WSTĘP .....</b>	<b>10</b>
1.1 WPROWADZENIE I UZASADNIENIE CELOWOŚCI PRACY DOKTORSKIEJ.....	10
OBRAZ MAKROSKOPOWY CZERNIAKA ZŁOŚLIWEGO SKÓRY. ....	12
1.3 CZERNIAK – EPIDEMIOLOGIA .....	15
1.3.1 <i>Epidemiologia czerniaka na świecie</i> .....	15
1.3.2 <i>Epidemiologia czerniaka w Polsce</i> .....	16
1.4 CZERNIAK – CZYNNIKI RYZYKA.....	16
1.4.1 <i>Czynniki środowiskowe</i> .....	17
1.4.2 <i>Pigmentacja skóry</i> .....	18
1.4.3 <i>Znamiona melanocytowe</i> .....	18
1.4.4 <i>Immunosupresja</i> .....	19
1.4.5 <i>Wywiad rodzinny</i> .....	19
1.5 CZERNIAK – KLASYFIKACJA. ....	20
1.6 CZERNIAK – CZYNNIKI ROKOWNICZE W OCENIE HISTOPATOLOGICZNEJ .....	21
1.7 CZERNIAK – UWARUNKOWANIA GENETYCZNE .....	22
1.7.1 <i>Geny o wysokiej penetracji</i> .....	23
1.7.2 <i>Geny o pośredniej penetracji</i> .....	28
1.8.1 <i>Metylacja DNA</i> .....	31
1.8.2 <i>Modyfikacja histonów</i> .....	32
1.9 WIEK CHRONOLOGICZNY VS BIOLOGICZNY .....	34
1.10 POLIMORFIZM POJEDYNCZEGO NUKLEOTYDU (SNP, ANG. SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM).....	37
<b>2. CELE BADANIA .....</b>	<b>39</b>
<b>3. OPIS MATERIAŁU BADAWCZEGO I METODYKI .....</b>	<b>41</b>
3.1 GRUPA BADAWCZA – CHARAKTERYSTYKA .....	41
3.2. GRUPA KONTROLNA – CHARAKTERYSTYKA .....	41
3.3. SCHEMAT PRZEBIEGU BADANIA W CZASIE .....	42
3.4 SZCZEGÓŁY DOTYCZĄCE METODOLOGII ANALIZY GENETYCZNEJ ORAZ EPIGENETYCZNEJ. ....	45
3.5 INFORMACJE DODATKOWE.....	47
<b>4. WYNIKI .....</b>	<b>48</b>
4.1 DANE DEMOGRAFICZNE – CHARAKTERYSTYKA BADANEJ POPULACJI. ....	48
4.2 STYL ŻYCIA – CHARAKTERYSTYKA BADANEJ POPULACJI.....	50
4.3 CECHY PROGRESYWNE WYGLĄDU – CHARAKTERYSTYKA BADANEJ POPULACJI.....	54
4.4 OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADAWCZEJ UWZGLĘDNIAJĄCA SZCZEGÓŁY DOTYCZĄCE ZDIAGNOZOWANEGO CZERNIAKA ZŁOŚLIWEGO SKÓRY. ....	56
4.5 OCENA WPLYWU CZYNNIKÓW ZEWNĘTRZNYCH NA METYLACJĘ DNA (ANALIZA EWAS).....	59
4.6 OCENA WIEKU BIOLOGICZNEGO BADANEJ POPULACJI.....	62
4.6.1 <i>Porównanie wieku biologicznego pomiędzy grupą badawczą i kontrolną</i> .....	62
4.6.2 <i>Analiza wieku wyselekcjonowanych podgrup spośród grupy badawczej</i> .....	64
4.7 OGÓLNOGENOMOWA ANALIZA ZMIENNOŚCI SNP BADANEJ POPULACJI (ANALIZA GWAS).....	67
4.8 ANALIZA ZESTAWU LITERATUROWYCH SNP .....	68
<b>5. DYSKUSJA.....</b>	<b>69</b>
5.1 DANE DEMOGRAFICZNE BADANEJ POPULACJI – OMÓWIENIE .....	70
5.2 EKSPozyCJA NA CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE BADANEJ POPULACJI – OMÓWIENIE .....	72
5.3 CECHY PROGRESYWNE WYGLĄDU BADANEJ POPULACJI - OMÓWIENIE .....	77
5.4 DANE SZCZEGÓŁOWE DOTYCZĄCE ROZPOZNANEGO CZERNIAKA ZŁOŚLIWEGO W GRUPIE BADAWCZEJ – OMÓWIENIE .....	79
5.5 OCENA WPLYWU CZYNNIKÓW ZEWNĘTRZNYCH NA METYLACJĘ DNA – OMÓWIENIE .....	82
5.6 OCENA WIEKU BIOLOGICZNEGO BADANEJ POPULACJI - OMÓWIENIE .....	85
5.7 OGÓLNOGENOMOWA ANALIZA ZMIENNOŚCI SNP BADANEJ POPULACJI – OMÓWIENIE.....	90

5.8 MOCNE I SŁABE STRONY BADANIA. ....	91
5.9. PODSUMOWANIE.....	92
<b>6. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI I WNIOSKI. ....</b>	<b>93</b>
<b>7. STRESZCZENIE PRACY .....</b>	<b>95</b>
<b>8. STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM (SUMMARY) .....</b>	<b>98</b>
<b>9. PIŚMIENICTWO.....</b>	<b>100</b>

## Wykaz skrótów

ACD, homolog białkowy dysplazji kory nadnerczy (ang. Adrenocortical dysplasia homolog)

AJCC, Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka (ang. American Joint Committee on Cancer)

AKT, kinaza białkowa alfa serynowo-treoninowa (ang. Alpha serine/threonine-protein kinase)

BAP1, białko 1 związane z BRCA1 (ang. BRCA1-associated protein-1)

BINs, znamię BAP1 inaktywowane (ang. *BAP1*-inactivated nevi)

BMI, wskaźnik masy ciała (ang. Body mass index)

BRAF, kinaza białkowa biała B-Raf (ang. B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase)

BRCA1, gen kodujący nowotwór sutka (ang. Breast Cancer gene 1)

CDKN2A, inhibitor kinazy zależnej od cyklin 2A (ang. Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

CDK4, kinaza cyklinozależna 4, (ang. Cyclin-dependent kinase 4)

cfDNA i cfRNA, wolne od komórek krążących kwasy nukleinowe (ang. Cell-free circulating nucleic acids)

CI, przedział ufności (ang. Confidence interval)

CIMP, fenotyp metylatora wyspy CpG (ang. CpG Island methylator phenotype)

CM, (łac. Collegium Medicum)

CTCs, krążące komórki guza (ang. Circulating tumor cells)

EAA, przyspieszenie wieku epigenetycznego (ang. Epigenetic age acceleration)

EPIC, Prospektywne badania oceniające wieloczynnikowy wpływ na wystąpienie nowotworów (ang. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition)

ERK, kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. Extracellular signal-regulated kinases)

EWAS, analiza asocjacyjna epigenomu (ang. Epigenome-wide association study)

EVs, pęcherzyki pozakomórkowe (ang. Extracellular vesicles)

FDR, ang. False discovery rate

GWAS, badanie asocjacyjne całego genomu (ang. Genome-wide association study)

HDAC, deacetylazy histonowe (ang. Histone deacetylases)

HDM2, ludzki homolog podwójnej minuty 2 (ang. Human homolog of double minute 2)

HR, współczynnik ryzyka (ang. Hazard ratio)

IARC, Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem Światowej Organizacji Zdrowia (ang. International Agency for Research on Cancer)

KIT, KIT Protoonkogen, receptorowa kinaza tyrozynowa (ang. KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase)

LMM, czerniak wywodzący się z plamy soczewicowatej (ang. Lentigo malignant melanoma)

MAPK=MEK, kinaza białkowa aktywowana mitogenami (ang. Mitogen-activated protein kinase)

MBAIT, melanocytowe atypowe śródskórne guzy z mutacją BAP1 (ang. Melanocytic BAP1-mutated atypical intradermal tumors)

MBD, metylowane białka wiążące DNA (ang. Methylated proteins binding DNA)

MC1R, receptor melanokortyny 1 (ang. Melanocortin receptor 1)

MDS, skalowanie wielowymiarowe (ang. Multidimensional scaling)

MITF, czynnik transkrypcyjny indukujący melanocyty (ang. Melanocyte inducing transcription factor)

mPoA, metylacyjne tempo starzenia (ang. **methylation Pace** of Aging)

MSH, hormon stymulujący melanocyty (ang. Melanocyte-stimulating hormone)

ncRNA, niekodujący RNA, (ang. Non-coding RNA)

NF1, gen neurofibromatozy (ang. Neurofibromatosis 1 gene)

NSNM, przerzuty do węzłów niewartowniczych (ang. Nonsentinel node metastases)

NRAS, protoonkogen NRAS, (ang. NRAS Proto-Oncogene)

OR, iloraz szans (ang. Odds ratio)

PCB, polichlorowane bifenyle (ang. Polychlorinated biphenyls)

PIB5PA, fosfatydyloinozytolu-4,5-bifosforan 5-fosfataza A (ang. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase A)

PI3K, 3-kinazy fosfoinozytydu (ang. Phosphoinositide 3-kinases)

PoAm, tempo starzenia się metylacji (ang. Pace of Aging Methylation),

POT1, białko ochrony telomerów 1 (ang. Protection Of Telomeres 1)

PTEN, homolog fosfatazy i tensyny (ang. Phosphatase And Tensin Homolog)

PUFAs, wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. Polyunsaturated fatty acids)

RAF, rodzina kinaz (ang. Rapidly Accelerated Fibrosarcoma kinases)

RAS, rodzina onkogenów

RB1, białko kodowane przez gen supresorowy RB1, nazwa białka RB pochodzi od siatkówczaka (ang. Retinoblastoma protein 1)

RR, ryzyko względne (ang. Relative risk)

SD, odchylenie standardowe (ang. Standard deviation)



SETDB1, N-metylotransferaza histonowo-lizynowa SETDB1 (ang. SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1)

SLN, węzeł wartowniczy (ang. Sentinel lymph node)

SNP, polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. Single nucleotide polymorphism)

SSM, czerniak szerzący się powierzchownie (ang. Superficial spreading melanoma)

SUMO, mały modyfikator podobny do ubikwityny (ang. Small ubiquitin-like modifier)

TERF2IP, białko oddziałujące z telomerycznym czynnikiem wiążącym powtórzenia (ang. Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein)

TERT, Odwrotna transkryptaza telomerazy (ang. Telomerase reverse transcriptase)

TET, ang. ten-eleven translocation (TET) methylcytosine dioxygenases

TP53, gen kodujący białko supresorowe p53

UJ, Uniwersytet Jagielloński

5hmC, 5-hydroksymetylocytozyna (ang. 5-hydroxymethylcytosine)

## 1. Wstęp

### 1.1 Wprowadzenie i uzasadnienie celowości pracy doktorskiej

Nowotwory skóry są jednymi z najczęściej spotykanych nowotworów, a spośród nich najbardziej agresywnym typem jest czerniak złośliwy. Ze względu na szybkie tempo wzrostu, dynamiczny rozwój i częste przerzuty jest najtrudniejszy w leczeniu i w związku z tym charakteryzuje się najgorszym rokowaniem oraz największą śmiertelnością. Wywodzi się z komórek barwnikowych, zwanych melanocytami (1). Pod wpływem czynników genetycznych oraz środowiskowych dochodzi do niekontrolowanej proliferacji melanocytów wynikających z kumulacji w nich mutacji, mogących zarówno pobudzać podziały komórkowe jak i hamować mechanizmy obronne komórki. Obecnie koncepcja onkogenezy czerniaka jest uważana za proces wieloczynnikowy obejmujący czynniki genetyczne, epigenetyczne i środowiskowe (2). Czerniak skóry występuje głównie u dorosłych i może pochodzić de novo bądź wywodzić się ze znamion barwnikowych lub plamy soczewicowatej. Należy podkreślić, że czerniaki są to nowotwory o wysokim odsetku wyleczeń, gdy zaawansowanie choroby ograniczone jest miejscowo do skóry. Odpowiednio wcześniej zdiagnozowane wymagają najczęściej prostej interwencji chirurgicznej i monitorowania zmian na skórze. Zdiagnozowane natomiast w późniejszym etapie, z uwagi na częste przerzuty m.in. do regionalnych węzłów chłonnych, wątroby, płuc i mózgu wymagają leczenia kompleksowego, skojarzonego i wielospecjalistycznego (3). Ryzyko zachorowania na czerniaka skóry wzrasta z wiekiem, osiągając maksimum w ósmej dekadzie życia. Wg najnowszych danych epidemiologicznych liczba zachorowań na czerniaki gwałtownie rośnie we wszystkich częściach świata, także wśród młodszej populacji (4). Wykrywanie czerniaka na wczesnym etapie zaawansowania, dokładniejsze poznanie czynników ryzyka zwiększających jego występowanie oraz ich prewencja stanowią zatem priorytet w walce o zmniejszenie śmiertelności.

Wiek chronologiczny stanowi jedynie przybliżoną miarę procesów starzenia się organizmu i w związku z tym niezbędne jest zidentyfikowanie wiarygodnych biomarkerów, na podstawie których będziemy w stanie określić różnice w tempie starzenia się osób jak i prawidłowo ocenić ryzyko wystąpienia chorób związanych z wiekiem. Poprzez dokładne określenie wieku biologicznego vs wieku chronologicznego (i ocenę tzw. tempa starzenia się organizmu) można przewidzieć długość życia i zapobiec chorobom wieku starczego. Jednym z potencjalnych

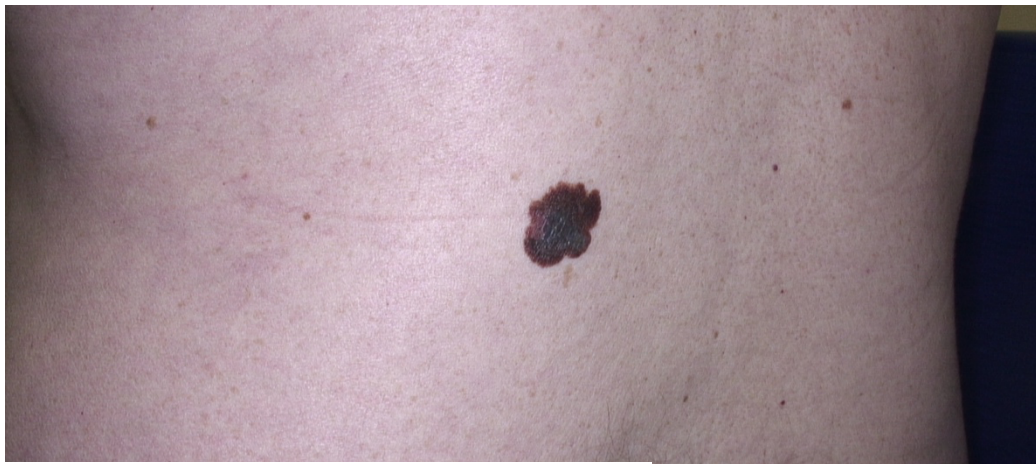
biomarkerów starzenia się oceniającego wiek biologiczny, który zyskał na znaczeniu w ostatnich latach i wzbudza wciąż zainteresowanie jest epigenetyczna ocena starzenia się określana na podstawie analizy stopnia metylacji DNA (DNAm) w zakresie określonych loci (5). W ostatnich latach coraz więcej uwagi przywiązuje się do wpływu czynników środowiskowych na metylację DNA. Badając wiek biologiczny, w kontekście czynników środowiskowych, możliwe jest badanie przyczyny starzenia, ale także związku z wystąpieniem różnego rodzaju chorób. Badania naukowe dowodzą o istotnym związku między zmianami w metylacji DNA, a występowaniem różnego rodzaju schorzeń. W ostatnim czasie w literaturze ukazały się intrygujące badania sugerujące, iż zmiana wzoru metylacji wywołana czynnikiem zewnętrznym, może przyczynić się do wystąpienia chorób, takich jak np. nowotwór złośliwy sutka czy choroba wieńcowa serca (6,7). Najnowsze badania nad różnymi typami nowotworów wskazują na znaczenie epigenetycznych mechanizmów w procesie onkogenezy i ich potencjalnego wykorzystania do przewidywania ryzyka zachorowania na nowotwory (7). Ponadto identyfikacja czynników wywołujących zmiany w metylacji oraz możliwość badania zmian we wzorze metylacji może pozwolić na opracowanie narzędzia służącego do wczesnej diagnostyki oraz zrozumienia mechanizmów niektórych chorób, co może stanowić istotny przełom w medycynie.

W niniejszej dysertacji doktorskiej podjęto próbę wytłumaczenia patogenezy czerniaka złośliwego skóry kilkietapowo, a zarazem kompleksowo obejmując ocenę wpływu czynników środowiskowych, epigenetycznych i genetycznych na rozwój czerniaka.

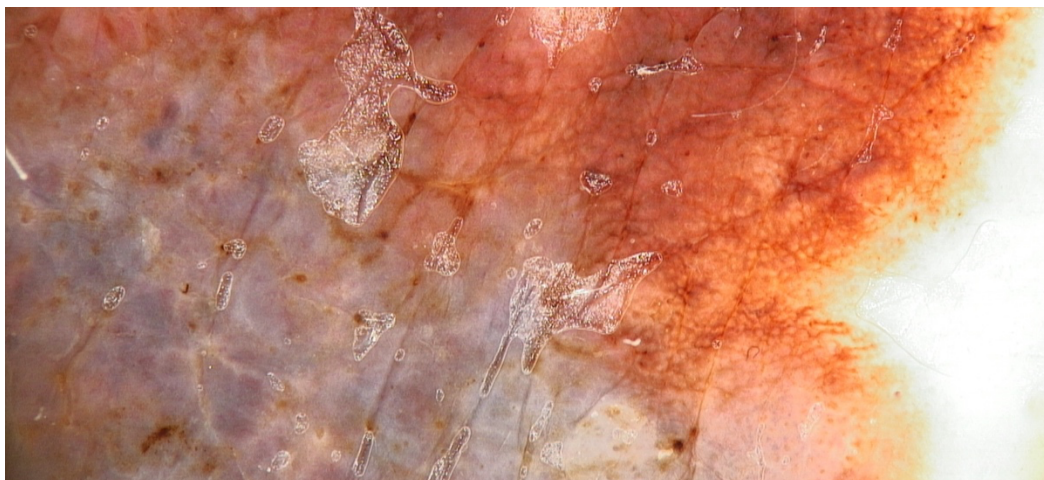
Zgodnie z moją najlepszą wiedzą, w literaturze istnieją zaledwie trzy prace których celem była ocena wpływu czynników środowiskowych na metylację DNA, a co więcej brakuje badań analizujących epigenetyczne tempo starzenia się pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem złośliwym. W niniejszej pracy doktorskiej postanowiono zatem zweryfikować hipotezę czy nowotwory – w tym przypadku czerniak złośliwy skóry, a także czynniki środowiskowe (na które pacjenci z czerniakiem złośliwym byli i są ekspozycyjni) są skorelowane z wiekiem epigenetycznym. U wszystkich pacjentów wg naszej aktualnej wiedzy po raz pierwszy został oceniony wiek epigenetyczny, oraz podjęta została próba identyfikacji przyczyn powstawania czerniaka złośliwego skóry wynikających z wpływu różnych czynników środowiskowych na metylację DNA.

Co więcej, należy podkreślić, że zmienność fenotypowa populacji człowieka determinowana jest przez dwa uzupełniające się czynniki: wpływ środowiska oraz wpływ informacji genetycznej. W mojej pracy oprócz analizy wpływu środowiska postanowiłam jednocześnie przeprowadzić analizę markerów genetycznych SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu,

ang. single nucleotide polymorphism,), czyli najczęściej występującej zmienności sekwencji DNA. Przeprowadzone dotychczas badania asocjacyjne całego genomu ujawniły liczne polimorfizmy określające zwiększoną podatność zachorowania na czerniaka złośliwego. Istnieją natomiast doniesienia sugerujące niejednokrotnie rozbieżności pomiędzy obecnością danego wariantu genetycznego SNP a występowaniem czerniaka złośliwego (8–10). W niniejszej pracy postanowiono zatem zweryfikować predyspozycję genetyczną badanej grupy pacjentów pochodzącej z polskiej populacji do rozwoju czerniaka w zakresie wszystkich dotychczas odkrytych markerów SNP, zasocjowanych wcześniej z czerniakiem w europejskiej populacji. Podjęto również próbę zidentyfikowania nowych, dotychczas nieznanymi wariantów SNP zwiększających podatność na zachorowanie na czerniaka złośliwego, poprzez przeprowadzenie porównawczej analizy GWAS (badanie asocjacyjne całego genomu, ang. Genome-wide association study) w grupie pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry i w grupie kontrolnej.



Obraz makroskopowy czerniaka złośliwego skóry.



Obraz dermatoskopowy czerniaka złośliwego skóry.

## 1.2 Czerniak – informacje ogólne oraz etiopatogeneza

Czerniak złośliwy (łac. *melanoma malignum*) jest nowotworem złośliwym skóry powstałym w wyniku złośliwej transformacji komórek barwnikowych, zwanych melanocytami. Komórkami macierzystymi dla melanocytów są melanoblasty, powstające z ektodermalnych komórek grzebieni nerwowych. Głównym miejscem występowania melanocytów, a zarazem najczęstszą lokalizacją czerniaka jest warstwa podstawna naskórka. Czerniaki jednakże mogą powstawać również w innych miejscach, do których migrują komórki grzebienia nerwowego, takich jak błona naczyniowa oka, błony śluzowe, ucho wewnętrzne oraz opony mózgowo-rdzeniowe (11).

Pod wpływem czynników genetycznych oraz środowiskowych, z których najważniejszym jest promieniowanie ultrafioletowe (UV) dochodzi do niekontrolowanej proliferacji melanocytów wynikających z kumulacji w nich mutacji, mogących zarówno pobudzać podziały komórkowe jak i hamować mechanizmy obronne komórki. W odpowiedzi na uszkodzenie DNA wywołane promieniowaniem UV, keratynocyty skóry wytwarzają hormon stymulujący melanocyty (MSH), który wiąże się z receptorem melanokortyny 1 (MC1R) na melanocytach, które następnie produkują i uwalniają melanicę. Pigment melaniny ostatecznie działa jako osłona dla promieniowania UV, zapobiegając w ten sposób dalszym zmianom DNA.

Dokładne przyczyny powstawania czerniaka nadal pozostają nie w pełni wyjaśnione, natomiast w ostatnich latach poczyniono duży postęp w poznaniu rozwoju tego nowotworu.

Czerniaka skóry można ogólnie sklasyfikować na podstawie jego pochodzenia ze skóry przewlekłe lub okresowo ekspozowanej na działanie promieni słonecznych, co wiąże się z jego lokalizacją, wiekiem pacjenta w momencie rozpoznania, stopniem skumulowanej ekspozycji na promieniowanie UV, rodzajem czynników onkogennych i obciążeniem mutacyjnym (12).

Najczęstsze mutacje somatyczne w czerniakach powstających w obrębie skóry przewlekłe lub okresowo wystawionej na słońce dotyczą genów kontrolujących procesy komórkowe, takie jak:

- proliferacja (BRAF, NRAS i NF1),
- wzrost i metabolizm (homolog fosfatazy i tensyny – PTEN oraz receptor protoonkogenu KIT kinaza tyrozynowa - KIT),
- oporność na apoptozę (białko nowotworowe p53 – TP53),
- kontrola cyklu komórkowego (inhibitor kinazy zależnej od cyklin 2A - CDKN2A)
- długość życia replikacyjnego (odwrotna transkryptaza telomerazy - TERT) (13).

Występowanie mutacji w obrębie tych genów zazwyczaj prowadzi do nieprawidłowej aktywacji dwóch głównych szlaków sygnałowych w czerniaku: kaskady sygnałowej

RAS/RAF/MEK/ERK [znanej również jako szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK)] i kinazy 3-fosfoinozytolu ( szlak PI3K)/AKT (14).

Czerniaki na skórze przewlekle ekspozowanej na słońce zwykle pojawiają się u osób w starszym wieku (>55 lat), w lokalizacjach najczęściej wystawianych na słońce, takich jak głowa i szyja, a także na grzbietowych powierzchniach kończyn górnych. Zwykle czerniaki pochodzące ze skóry przewlekle wystawianej na słońce mają wysoki ładunek mutacyjny wtórny do długotrwałej ekspozycji na UV. Głównymi czynnikami genetycznymi w tych przypadkach jest mutacja protoonkogenu B-Raf (BRAF), mutacje neurofibrominy 1 (NF1) i NRAS. Czerniak związany z intensywną, okresową ekspozycją na słońce występuje u osób w młodszym wieku (<55 lat), w lokalizacjach mniej nasłonecznionych, takich jak tułów oraz części proksymalne kończyn, zwykle wiąże się z mutacją BRAFV600E i niższym obciążeniem mutacyjnym (15).

Natomiast za rozwój czerniaka ze zmian przednowotworowych nie jest odpowiedzialny jeden wzorzec. Poszczególne podtypy histologiczne czerniaka mogą ewoluować z różnych zmian prekursorowych i mogą obejmować różne mutacje genowe. Mutacja BRAF jest obecna nawet w 80% łagodnych znamion, co skutkuje ograniczoną proliferacją melanocytów poprzez aktywację starzenia się komórek, w której pośredniczy onkogen. Te znamiona pozostają nieaktywne przez dziesięciolecia, również z powodu nadzoru immunologicznego (16,17). Występowanie izolowanej mutacji BRAF nie jest wystarczające do powstania czerniaka zatem stosunkowo rzadko obserwuje się jego rozwój pochodzący z łagodnych znamion (18). Zazwyczaj do jego progresji niezbędne jest nabycie kolejnych mutacji w kluczowych genach, takich jak TERT czy CDKN2A.

Charakterystyka histologiczna jest obecnie podstawą diagnostyki neoplazji melanocytów i określenia ich potencjału złośliwości. Należy podkreślić, że zależność od samej histopatologii prowadzi często do niejednoznacznej oceny zmian i niewłaściwej stratyfikacji ryzyka ze względu na różne patofizjologiczne czynniki wyzwalające onkogenezę (19). Być może zastosowanie nowych metod oceny czynników genetycznych, epigenetycznych i biologicznych wpływających na powstawanie czerniaka może prowadzić do poprawy diagnostyki czerniaka, wczesnego rozpoznawania pacjentów ze zwiększonym ryzykiem progresji i ogólnie uzyskania lepszych wyników onkologicznych.

## 1.3 Czerniak – epidemiologia

### 1.3.1 Epidemiologia czerniaka na świecie

Częstość występowania czerniaka skóry na całym świecie rośnie z roku na rok w zatrważająco szybszym tempie w porównaniu z jakimkolwiek innym rodzajem nowotworu u obu płci. Szacuje się, że współczynnik zachorowalności w ciągu trzech dekad wzrósł prawie 3-krotnie (20). Rocznie na świecie notuje się ponad 100000 zachorowań (3). Pomimo faktu, że czerniak jest odpowiedzialny za jedynie 5% wszystkich przypadków nowotworów skóry, stanowi on główną przyczynę zgonów z tego powodu (20). Częstość występowania czerniaka skóry jest zróżnicowana w poszczególnych krajach, a różne wzorce zachorowalności przypisuje się różnicom w stopniu nasłonecznienia, fototypie skóry oraz uwarunkowaniom behawioralnym i kulturowym populacji zamieszkującej dany teren. Czerniak skóry z największą częstością występuje wśród osób rasy kaukaskiej szczególnie narażonych na promieniowanie słoneczne (21). Najwyższą zachorowalność notuje się w Australii i Nowej Zelandii, Stanach Zjednoczonych oraz w bogatych krajach europejskich (Szwajcaria, Norwegia, Szwecja), natomiast najniższą w Azji Środkowej (22). Szacuje się, że w Stanach Zjednoczonych średnie ryzyko wystąpienia czerniaka skóry w ciągu życia wynosi 1: 56 mężczyzn oraz 1:37 kobiet, podczas gdy szacunki dla krajów Europy Zachodniej podają, że 1:50 osób jest zagrożona zachorowaniem na czerniaka skóry, niezależnie od płci. Ryzyko zachorowania na czerniaka skóry wzrasta z wiekiem, osiągając maksimum w ósmej dekadzie życia. Należy jednak podkreślić, że w przeciwieństwie do innych guzów litych, czerniak występuje również stosunkowo częściej u osób młodych i w średnim wieku. Przeprowadzone dotychczas badania epidemiologiczne sugerują, że mediana wieku w chwili rozpoznania czerniaka złośliwego dla obu płci wynosi 57 lat. Analizując dane dotyczące zapadalności w zależności od płci, u płci żeńskiej zachorowalność wzrasta liniowo od 25. do 50. roku życia, a następnie maleje, podczas gdy u płci męskiej obserwuje się gwałtowny wzrost częstości występowania po 55 roku życia (4). Ponadto mężczyźni ze zdiagnozowanym czerniakiem skóry charakteryzują się gorszym rokowaniem niż kobiety, z wyższym odsetkiem nawrotów choroby, progresji choroby i śmiertelności (23). Możliwym uzasadnieniem tych wyników jest fakt, że pacjenci płci męskiej rzadko przeprowadzają u siebie samoobserwację zmian skórnych, rzadko wykonują badanie

dermatoskopowe znamion u dermatologów i ostatecznie do lekarzy zgłaszają się w bardziej zaawansowanych stadiach choroby niż kobiety.

### 1.3.2 Epidemiologia czerniaka w Polsce

Wg ostatnich dostępnych danych z 2010r. w Polsce czerniak stanowi u mężczyzn około 1,7% zachorowań, natomiast u kobiet 1,9% zachorowań, co wynosi około 1200 przypadków u mężczyzn i 1350 u kobiet. Model wiekowy zapadalności na czerniaka jest podobny jak w innych krajach europejskich. Ryzyko zachorowania na czerniaka skóry wzrasta z wiekiem, osiągając maksimum w ósmej dekadzie życia. Do połowy szóstej dekady życia cząstkowe współczynniki zachorowalności są wyższe u kobiet niż u mężczyzn, a następnie utrzymują się na podobnym poziomie u obu płci.

Od trzech dekad obserwuje się wzrost zagrożenia czerniakiem skóry u obu płci i we wszystkich grupach wiekowych. Wzrost ten może być związany z nadmierną ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe oraz inne środowiskowe czynniki ryzyka, starzeniem się populacji, zwiększoną wykrywalnością wynikającą z udoskonaleniem technik diagnostycznych takich jak dermatoskopia oraz upowszechnieniem wiedzy o czerniaku złośliwym w społeczeństwie. Wśród młodych kobiet oraz mężczyzn (20-44 lat) w latach 1980-2010 zachorowalność wzrosła ponad dwukrotnie; wśród kobiet i mężczyzn w średnim wieku (45-64 lat) obserwowano prawie 3-krotny wzrost zachorowalności; w najstarszej grupie wiekowej przyrost zachorowalności był największy – prawie 5-krotny u mężczyzn i ponad 3-krotny u kobiet.

Ryzyko zgonu z powodu tego nowotworu również wzrasta wraz z wiekiem począwszy od piątej dekady życia. Niewątpliwie niepokojącym jest fakt, że umieralność z powodu czerniaka skóry w Polsce jest wyższa niż przeciętna dla Unii Europejskiej o około 20% (3).

### 1.4 Czerniak – czynniki ryzyka

Podobnie jak w przypadku innych nowotworów, synergistyczne oddziaływanie pomiędzy różnymi czynnikami endogennymi i egzogennymi przyspiesza onkogenezę czerniaka złośliwego skóry.



#### 1.4.1 Czynniki środowiskowe

Promieniowanie ultrafioletowe (UV) jest uważane za główny środowiskowy czynnik ryzyka rozwoju czerniaka skóry (24). Zwiększone ryzyko czerniaka spowodowane ekspozycją na słońce jest związane z długością fali UV, w szczególności z widmem UV-B (25). Ponadto w wielu badaniach wzorce i czas ekspozycji na słońce zostały powiązane ze zwiększonym ryzykiem czerniaka. W szczególności intensywna i okresowa ekspozycja na słońce (typowa dla oparzeń słonecznych) wiąże się z wyższym ryzykiem w porównaniu z przewlekłym narażeniem na słońce, które częściej wiąże się z rogowaceniem słonecznym i nieczerniakowymi nowotworami skóry (26).

Co więcej, historia oparzeń słonecznych w dzieciństwie lub okresie dojrzewania wiąże się z najwyższym ryzykiem zachorowania na czerniaka, a osoby doświadczające >5 epizodów ciężkiego oparzenia słonecznego mają 2-krotnie większe ryzyko (27). Ekspozycja na promieniowanie UV-A ze sztucznych źródeł została również powiązana ze zwiększonym ryzykiem rozwoju czerniaka. Obserwacja pacjentów z łuszczycą poddawanych fototerapii promieniami UV-A, a także osób korzystających z solarium wykazała zwiększone ryzyko czerniaka w tej populacji. Ponadto przeprowadzone dotychczas badania wykazały istotny związek między ryzykiem zachorowania na czerniaka, a częstotliwością korzystania z solarium, szczególnie w młodym wieku (28). Promieniowanie UV pochodzące z łóżek opalających zostało oficjalnie uznane jako czynnik rakotwórczy (29).

Chemiczne i termiczne oparzenia skóry są również związane ze zwiększoną częstością występowania czerniaka, jednak stanowią znacznie bardziej istotne czynniki ryzyka w przypadku innych nowotworów skóry jak np. raka podstawnokomórkowego i raka płaskonabłonkowego (30).

W ostatnich latach wyniki badań epidemiologicznych i eksperymentalnych wykazały, że czynniki dietetyczne mogą również wpływać na rozwój czerniaka. Wykazano, że podaż kofeiny w diecie jest powiązana z niższym ryzykiem wystąpienia czerniaka, natomiast owoców cytrusowych i alkoholu – ze zwiększonym ryzykiem. Zależności pomiędzy wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, niacyną/nikotynamidem, kwasem foliowym i witaminą D z czerniakiem pozostają kontrowersyjne (31). Ponadto nie wykazano związku pomiędzy paleniem tytoniu, a występowaniem czerniaka złośliwego (32). Dieta prawdopodobnie wpływa na rozwój czerniaka poprzez kilka potencjalnych mechanizmów, takich jak zwiększenie apoptozy indukowanej promieniowaniem UV i zwiększeniem

wrażliwości na światło. Opublikowane wyniki badań są intrygujące i mogą mieć istotne implikacje pod względem zmniejszenia zachorowalności na czerniaka poprzez modyfikację diety (31).

#### 1.4.2 Pigmentacja skóry

Kolor skóry to kolejny niepodważalny, niemodyfikowalny czynnik ryzyka, wpływający na zwiększone prawdopodobieństwo rozwoju czerniaka skóry. Klasyfikacja fototypów skóry zaproponowana przez Thomasa B. Fitzpatricka została pozytywnie zweryfikowana i uznana przez dermatologów w ciągu ostatnich czterech dekad jako miara wrażliwości na światło słoneczne i związane z nią ryzyko rozwoju nowotworów skóry. Fototyp skóry według Fitzpatricka jest odwrotnie proporcjonalny z ryzykiem wystąpienia nowotworu skóry. Jasny fenotyp skóry, określony jako typ I lub II wg skali Fitzpatricka (rasa biała, włosy rude albo blond, zielona lub niebieska pigmentacja tęczówki, wysoka skłonność do oparzeń słonecznych) charakteryzuje się największą predyspozycją do rozwoju czerniaka (26,33).

#### 1.4.3 Znamiona melanocytowe

Obecność znamion na skórze jest niewątpliwie silnie związana z czerniakiem złośliwym. Znamiona melanocytowe to rodzaj łagodnej proliferacji melanocytów, które mogą być wrodzone lub nabyte. Całkowita liczba znamion jest dodatnio skorelowana z ryzykiem czerniaka i różni się w zależności od liczby, wielkości i rodzaju znamion (34). Duża liczba znamion, duże znamiona (>6 mm), znamiona wrodzone lub o średnicy większej niż 20 mm, a także zespół znamion dysplastycznych (występowanie minimum 50 znamion o średnicy powyżej 2 mm) wiążą się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju czerniaka (3). W dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano, że około 25% przypadków czerniaka występuje w połączeniu z istniejącym wcześniej łagodnym znamieniem, natomiast od 29%-49% przypadków czerniaka rozwija się na podłożu wcześniej istniejącego znamienia dysplastycznego (34). Znamiona zwykle ulegają involucji po czwartej dekadzie życia w populacjach rasy kaukaskiej i są rzadkie u osób starszych. Ten proces jest prawdopodobnie częściowo uwarunkowany genetycznie. Tempo, w jakim znamiona zanikają wraz z wiekiem,

jest bardzo zróżnicowane, a niektórzy pacjenci nadal mają dużą liczbę znamion w późnym średnim wieku. Osoby, które utrzymują wysoką liczbę znamion po 50. roku życia, są bardziej narażone na czerniaka, ponieważ ich zmiany nie starzeją się. Sugeruje to, że opóźnione starzenie się w układzie melanocytowym może być dobrym predyktorem ryzyka czerniaka. W melanocytach istotne jest starzenie się komórek sterowane przez geny onkogenne (BRAF i RAS) oraz supresorowe nowotworu (p16, p14arf, p53, PTEN, Rb) (35).

#### 1.4.4 Immunosupresja

Ponadto należy podkreślić, że pacjenci z obniżoną odpornością są znacznie bardziej narażeni na rozwój nowotworów niż osoby z prawidłową odpowiedzią immunologiczną. W konsekwencji czerniak i inne nowotwory skóry występują częściej w populacji z obniżoną odpornością, a niedobór odporności jest uznawany za istotny czynnik ryzyka powstawania nowotworów. W biologii czerniaka skóry supresja typowej odpowiedzi immunologicznej ma kluczowe znaczenie dla proliferacji czerniaka złośliwego, co nieuchronnie prowadzi do onkogenezy w obrębie melanocyty (36).

#### 1.4.5 Wywiad rodzinny

Definicja dodatniego wywiadu rodzinnego może różnić się w zależności od dostępnych badań, jednak zazwyczaj jest on definiowany jako występowanie czerniaka u dwóch lub więcej krewnych pierwszego stopnia. Chociaż większość zmian genetycznych związanych z rozwojem czerniaka ma charakter somatyczny, obecność dziedziczonych genów ryzyka czerniaka jest ważnym czynnikiem zwiększającym częstość występowania tego nowotworu skóry. Obecnie uważa się, że dodatni wywiad rodzinny odpowiedzialny jest za dwukrotne zwiększenie ryzyka wystąpienia czerniaka złośliwego, a ryzyko to znacząco wzrasta, gdy u krewnych tych rozpoznano więcej niż jeden przypadek czerniaka. Należy pamiętać, że czerniak nie jest chorobą dziedziczną, dziedziczona jest natomiast predyspozycja do zachorowania, która może być związana z utrwalonymi zmianami w genomie. Około 5–10% przypadków czerniaka występuje u pacjentów z rodzinną historią czerniaka (9). U pacjentów z genetyczną predyspozycją zwykle występuje on w młodszym wieku (<40 lat), zazwyczaj u jednego

pacjenta rozpoznaje się mnogie przypadki czerniaka, najczęściej powstaje na podłożu istniejącego znamienia dysplastycznego oraz cechuje się on lepszym rokowaniem (37). Pacjenci z podejrzeniem występowania mutacji predysponujących do wystąpienia czerniaka powinni być kierowani do poradni genetycznych oraz objęci częstszą kontrolą dermatoskopową, a u członków ich rodziny powinny zostać wykonane odpowiednie badania genetyczne celem zmniejszenia zachorowalności i śmiertelności. Podatność rodzinna wynika najczęściej z mutacji w jednym ze znanych genów predysponujących do czerniaka o wysokiej penetracji: CDKN2A, CDK4, BAP1, POT1, ACD, TERT i TERT (9). W zespołach spowodowanych mutacjami tych genów czerniak jest najczęściej spotykanym nowotworem. Inne schorzenia dziedziczne są związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju czerniaka, ale nie jest on w nich najczęstszym nowotworem. Wiązą się m.in. z mutacjami genów takich jak PTEN, TP 53, RB1 i są one odpowiednio powiązane z zespołem Cowdena, zespołem rakowym Li-Fraumeni, czy siatkówczakiem rodzinnym. Najwyższe, nawet 1000-krotne w stosunku do populacji ogólnej ryzyko występuje u pacjentów z xeroderma pigmentosum, rzadką dermatozą dziedziczną autosomalnie recesywnie. W tym przypadku dochodzi do częstego i łatwego uszkodzenia genomu melanocytów spowodowanego genetycznym defektem zdolności do naprawy uszkodzeń DNA wywołanych przez promieniowanie UV (38).

### 1.5 Czerniak – klasyfikacja.

Wyróżnia się następujące typy histomorfologiczne czerniaka:

1. Czerniak szerzący się powierzchownie (SSM, ang. superficial spreading melanoma) jest najczęstszym podtypem histologicznym, stanowi około 70% wszystkich czerniaków (39). Charakteryzuje się początkowo wzrostem radialnym (poziomym), a następnie wertykalnym (pionowym). Ponad 60% powierzchownie szerzących się czerniaków jest diagnozowanych jako cienkie, guzy o grubości  $\leq 1$  mm (40). Około dwie trzecie wszystkich czerniaków powstaje de novo, chociaż powierzchownie szerzący się czerniak jest podtypem, który najprawdopodobniej jest związany z wcześniej istniejącym znamieniem. Czerniak szerzący się powierzchownie może wystąpić w dowolnej lokalizacji, ale najczęściej ma skłonność do występowania u mężczyzn na plecach, a kończynach dolnych u kobiet.

2. Czerniak guzkowy jest drugim najczęstszym podtypem, stanowiącym 15-30 % wszystkich czerniaków (39). Charakteryzuje się szybkim wzrostem oraz brakiem fazy wzrostu radialnego. Jest on najgorzej rokującym podtypem czerniaka. Podczas gdy większość powierzchownie szerzących się czerniaków i czerniaków wywodzących się z plamy soczewicowatej rozpoznaje się przy grubości mniejszej niż 1 mm, większość czerniaków guzkowych w momencie rozpoznania ma grubość większą niż 2 mm. Podobnie ponad 50% czerniaków o grubości powyżej 2 mm to podtyp guzkowy (41).

3. Czerniak wywodzący się z plamy soczewicowatej, zwany też czerniakiem lentiginalnym (LMM, ang. lentigo malignant melanoma) charakteryzuje się powolnym wzrostem, początkowo o typie radialnym. Zlokalizowany jest najczęściej na obszarach skóry przewlekle ekspozowanej na słońce, typowo w obrębie głowy i szyi u osób starszych. Stanowi od 10-15% wszystkich czerniaków (39).

4. Czerniak akralny stanowi mniej niż 5% wszystkich czerniaków (39). Jest to najczęstszy typ czerniaka wśród osób o ciemnej karnacji (60-72% u Afroamerykanów i 29-46% u Azjatów), u których występuje mniejsze ryzyko wystąpienia innych podtypów czerniaka związanych z ekspozycją na słońce. Czerniaki akralne powstają najczęściej na powierzchni dłoniowej rąk, podeszwy stóp, a także podpaznokciowo (pod płytką paznokcia). Czerniak podpaznokciowy wywodzi się z macierzy paznokcia i zwykle ma postać podłużnego, brązowego lub czarnego pasma na paznokciu dłoni lub stopy. Czerniak podpaznokciowy może występować w postaci masy pod płytką paznokciową (z pigmentacją lub bez) z owrzodzeniem i destrukcją płytki paznokciowej. Może również naśladować stany takie jak grzybica paznokci czy zanokcica, co prowadzi do opóźnienia rozpoznania (42).

Do innych rzadszych podtypów czerniaka zaliczamy również czerniaka bezbarwnikowego oraz desmoplastycznego.

## 1.6 Czerniak – czynniki rokownicze w ocenie histopatologicznej

Podstawą rozpoznania czerniaka jest badanie mikroskopowe zmiany barwnikowej wyciętej chirurgicznie (biopsja wycinająca). Biopsja wycinająca to jedyna metoda zapewniająca prawidłowe rozpoznanie czerniaka złośliwego. Ocena histopatologiczna wyciętego czerniaka powinna zawierać następujące czynniki rokownicze:

- grubość nacieku w milimetrach (skala grubości nacieku według Breslow),
- obecności lub braku owrzodzenia na powierzchni zmiany,
- liczbę figur podziału (indeks mitotyczny – liczba komórek w trakcie podziału na 1 mm<sup>2</sup>)
- obecność ognisk mikrosatelitarnych

Inne czynniki prognostyczne które powinny być zamieszczone w raporcie histopatologicznym to: podtyp czerniaka, szerokość marginesu wycięcia (obwodowego oraz wgłęb), obecność inwazji nowotworowej naczyń i pni nerwowych, stopień zaawansowania pT, obecność nasilenia nacieku zmiany przez komórki układu odpornościowego oraz stopień zajęcia warstw skóry (wg skali Clarka) (3).

### 1.7 Czerniak – uwarunkowania genetyczne

Pojęcie ryzyka zachorowania na czerniaka jest dynamiczne i wieloaspektowe ze względu na zróżnicowaną etiologię i niejednorodny charakter choroby. Na predyspozycje do czerniaka wpływają genetyczne, fenotypowe oraz środowiskowe czynniki ryzyka. Większość zmian leżących u podstaw genetycznych tej choroby występują jako losowo nabyte mutacje w melanocytach, a nagromadzenie zmian genomowych przyczynia się do rozwoju, progresji i ewolucji czerniaka. Najprościej mutację możemy zdefiniować jako zmianę w obrębie genu, której skutkiem jest powstanie nieprawidłowego białka. Mutacje można podzielić na somatyczne i dziedziczne (germinalne). Mutacje somatyczne występują w części komórek ciała, zostały nabyte w ciągu życia, zwykle nie stwierdza się tych mutacji w komórkach rozrodczych organizmu. Natomiast mutacje germinalne są obecne we wszystkich komórkach ciała, w tym w komórkach rozrodczych, i są one przekazywane z pokolenia na pokolenie najczęściej w sposób autosomalny dominujący, co oznacza, że jedna kopia zmienionego genu w każdej komórce wystarcza do zwiększenia ryzyka rozwoju czerniaka (3).

Większość przypadków czerniaka ma charakter sporadyczny, a obecność mutacji germinalnych jest ważnym elementem podatności na czerniaka (9). Geny predysponujące do czerniaka możemy podzielić na te o niskiej, średniej i wysokiej penetracji. Penetracja wiąże się z prawdopodobieństwem rozwoju choroby u nosiciela mutacji w czasie i odzwierciedla ogólny udział polimorfizmu określonego genu lub mutacji w ryzyku wystąpienia czerniaka (43). Chociaż żadna pojedyncza dotychczas ze znanych mutacji w linii zarodkowej nie gwarantuje

rozwoju czerniaka, głównym wpływem genów predysponujących jest zwiększenie wyjściowego ryzyka czerniaka. W przypadku osób o umiarkowanej do wysokiej podatności genetycznej, prawdopodobne jest, że przed osiągnięciem poziomu krytycznego dla onkogenezy potrzeba mniej mutacji somatycznych. Ponadto geny zwiększające ryzyko czerniaka mogą wchodzić w bezpośrednią interakcję z innymi genami lub środowiskowymi czynnikami ryzyka, aby aktywować szlaki rozwoju czerniaka.

Pomimo kilku znanych genów o wysokiej penetracji, wiele przypadków czerniaka rodzinnego nie jest wyjaśnionych molekularnie, a genetyczna podstawa podatności pozostaje niewyjaśniona dla dużego odsetka rodzin. Sugeruje to prawdopodobnie poligenowy mechanizm dziedziczenia, a także możliwość rzadkich mutacji w innych genach o wysokiej penetracji, które nie zostały jeszcze odkryte. Geny zwiększające ryzyko występowania czerniaka rodzinnego, mogą mieć również znaczenie dla innych nowotworów, jak np. nowotworu trzustki związanego z mutacją CDKN2A (44).

### 1.7.1 Geny o wysokiej penetracji

#### *CDKN2A*

Mutacja inhibitora kinazy zależnej od cyklin 2A (CDKN2A) to najczęstsza mutacja występująca w postaci rodzinnej czerniaka. Mutacja germinalna CDKN2A zwiększa ryzyko wystąpienia czerniaka aż 65-krotnie (45). CDKN2A jest genem supresorowym kodującym dwa transkrypty, p16 i p14ARF, które regulują dwa krytyczne szlaki cyklu komórkowego. p16 hamuje CDK4, a zatem fosforylację RB. p14ARF hamuje HDM2, a tym samym ubikwitynację p53. Oprócz mutacji germinalnych, CDKN2A może również występować jako mutacja somatyczna spotykana w sporadycznej postaci czerniaka (46). W rodzinach z obecną mutacją genu CDKN2A często występują osoby z licznymi (>50) atypowymi znamionami melanocytowymi. Pacjenci ze znamionami zlokalizowanymi na pośladkach lub grzbietowych powierzchniach stóp posiadają największe ryzyko nosicielstwa tej mutacji (44). Znamiona u tych pacjentów często są zróżnicowane morfologicznie, od łagodnych do posiadających atypowe cechy w dermatoskopii, a histologicznie wykazujących cechy znamion dysplastycznych (47). U nosicieli mutacji CDKN2A czerniak występuje około 15 lat wcześniej

niż w populacji ogólnej, z medianą wieku zachorowania około 33-45 lat w porównaniu z 53-61 lat w populacji ogólnej (44). Co więcej, w porównaniu z populacją ogólną u nosicieli mutacji CDKN2A diagnozuje się czerniaki o niższym stopniu zaawansowania co może być spowodowane wzmożonym nadzorem onkologicznym nad tymi pacjentami, a najczęstszym diagnozowanym typem histopatologicznym jest czerniak szerzący się powierzchownie. Podobnie jak w postaci sporadycznej czerniaka, w czerniakach związanych z germinálną mutacją CDKN2A również występują mutacje somatyczne BRAF i NRAS, jednakże mutacje BRAF obserwuje się rzadziej, a mutacje NRAS stosunkowo częściej.

Należy nadmienić, że oprócz czerniaka skóry, nosiciele mutacji CDKN2A mogą być bardziej narażeni na rozwój nowotworów trzustki, nowotworów górnego odcinka przewodu pokarmowego, oraz układu oddechowego, szczególnie u palaczy, co może oznaczać że CDKN2A podwyższa wrażliwość na karcynogeny zawarte w tytoniu (9).

#### *CDK 4*

Gen kinazy cyklinozależnej 4 (CDK4) zlokalizowany jest na chromosomie 12q14, a onkogenne skutki jego mutacji wynikają głównie z kontroli cyklu komórkowego w fazie G1. CDK4 jest onkogenem, który po zmutowaniu hamuje wiązanie p16, prowadząc do fosforylacji RB i pobudzenia cyklu komórkowego (48). Mutacje germinálne CDK4 są rzadkie, w literaturze opisano jej występowanie w mniej niż 20 rodzinach (49). Podobnie do mutacji CDKN2A, mutacje CDK4 predysponują do wczesnego wystąpienia licznych pierwotnych czerniaków i zwiększonej liczby atypowych znamion. Najczęstszym podtypem histologicznym czerniaka związanym z mutacją CDK 4 jest czerniak szerzący się powierzchownie, zlokalizowany w obrębie kończyn dolnych, a mediana wieku pacjentów w momencie rozpoznania to 39 lat. Oprócz czerniaków, nosiciele mutacji CDK4 mogą być bardziej narażeni na rozwój między innymi nieczerniakowych raków skóry, a także nowotworów piersi, trzustki, jajnika, szyjki macicy i żołądka (48).



## *BAP1*

Białko 1 związane z BRCA1 (ang. BRCA1 Associated Protein 1 = BAP1) jest enzymem deubikwitynującym, który u ludzi jest kodowany przez gen supresorowy BAP1 zlokalizowany na 3p21 (50). Bierze ono udział w modulacji chromatyny, regulacji transkrypcji, naprawie uszkodzeń DNA i kontrolowaniu aktywności genów. Chociaż dokładny mechanizm jest niejasny, białko BAP1 działa jako supresor nowotworu. Białka supresorowe guza pomagają zapobiegać zbyt szybkiemu lub niekontrolowanemu wzrostowi i podziałowi komórek. Zmniejszenie lub utrata funkcji BAP1 spowodowana mutacją prawdopodobnie zapobiega usuwaniu cząsteczek ubikwityny z niektórych białek. Zmieniona aktywność białek prawidłowo regulowanych przez deubikwitynację BAP1 może sprzyjać proliferacji lub przeżyciu komórek, powodując powstawanie nowotworu (51). U nosicieli mutacji germlinalnej BAP1 utrata heterozygotyczności poprzez wystąpienie drugiej, niedziedzicznej (somatycznej) mutacji w prawidłowej kopii genu w komórkach prowadzi do utraty funkcji białka BAP1 w komórkach nowotworowych i rozwoju nowotworów. Mutacje germlinalne u nosicieli BAP1 predysponują do wystąpienia zespołu predyspozycji do nowotworów związanej z BAP1. Najczęściej występujące w tym zespole typy nowotworów to czerniak błony naczyniowej oka występujący nawet u 29% pacjentów, międzybłoniak złośliwy (22%), rak nerkowokomórkowy (9%), rak płuc, jajnika, trzustki, piersi i oponiak, przy czym wiek ich wystąpienia jest zróżnicowany. Najczęstsze skórne manifestacje zespołu obejmują czerniaka złośliwego (18%), raka podstawnokomórkowego i łagodne melanocytowe atypowe śródskórne guzy z mutacją BAP1 (ang. melanocytic BAP1-mutated atypical intradermal tumors, MBAIT), które przyjmują postać mnogich grudek w kolorze skóry lub o barwie czerwono-brązowej, kopulastego kształtu lub uszypułowanych, dobrze ograniczonych zmian o średniej wielkości 5 mm. Zmiany te również określane jako BINs (*BAP1*-inactivated nevi) są obecne u ponad 90 % nosicieli mutacji i rozwijają się we wczesnym okresie życia (mediana 31 lat, zakres 10-56 lat), a ich liczba wzrasta wraz z wiekiem (52).

## *TERT*

Rola telomerów jest silnie związana z nowotworzeniem. Mutacje germlinalne i somatyczne TERT (ang. telomerase reverse transcriptase), czyli genu odwrotnej transkryptazy telomerazy

są powszechne w nowotworach, w tym czerniaku. Somatyczne mutacje promotora TERT są jednymi z najwcześniejszych mutacji zaraz po mutacjach BRAF i NRAS i znajdują się w 30% do 70% sporadycznych czerniaków, zwłaszcza guzkowych lub szerzących się powierzchownie (53). Gen TERT dostarcza instrukcji tworzenia enzymu zwanego telomerazą. Telomeraza utrzymuje struktury zwane telomerami, które składają się z powtarzających się segmentów DNA znajdujących się na końcach chromosomów. Telomery chronią chromosomy przed nieprawidłowym sklejeniem się lub rozpadem (degradacją). W większości komórek telomery stają się coraz krótsze w miarę podziału komórki. Po określonej liczbie podziałów komórki telomery stają się tak krótkie, że powodują, że komórka przestaje się dzielić lub ulega apoptozie. Telomeraza przeciwdziała skracaniu telomerów poprzez dodawanie małych, powtarzających się odcinków DNA na końcach chromosomów za każdym razem, gdy komórka się dzieli. W większości typów komórek telomeraza jest niewykrywalna lub aktywna na bardzo niskim poziomie. W komórkach szybko dzielących się, takich jak komórki wyściełające płuca i przewód pokarmowy, komórki szpiku kostnego czy komórkach rozwijającego się płodu jej aktywność jest bardzo wysoka umożliwiając tym komórkom wielokrotne dzielenie się bez uszkodzenia lub apoptozy. Niefizjologicznie telomeraza jest również bardzo aktywna w większości komórek nowotworowych, które rosną i dzielą się bez kontroli.

Mutacje germinalne promotora TERT są rzadkie, ale predysponują do wczesnego wystąpienia czerniaka i innych typów nowotworów. W dotychczas opisanych pracach czerniak związany z tą mutacją germinalną charakteryzuje się wczesnym wiekiem w momencie rozpoznania (średnia wieku 34; 18-46) oraz agresywnym przebiegiem klinicznym (większość pacjentów zmarło w ciągu 3 lat od rozpoznania). Mutacje somatyczne TERT również związane są ze złymi czynnikami prognostycznymi, w tym zwiększoną grubością guza, owrzodzeniem, wysokim indeksem mitotycznym, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych oraz często współwystępują z mutacjami BRAF i CDKN2A (54,55).

Ponadto mutacje w genie TERT są związane ze zwiększonym ryzykiem innych nowotworów, takich jak ostrej białaczki szpikowej, nowotworu sutka, raka dróg żółciowych, a także innych chorób jak idiopatycznym zwłóknieniem płuc czy izolowaną niedokrwistością aplastyczną (56).

### *POT1*

Gen POT1 (ang. Protection of telomeres 1) koduje białko należące do kompleksu białek shelterin, czyli złożonej wielobiałkowej struktury związanej z telomerami. Białka te rozpoznają końce chromosomów i związane z nimi sekwencje telomerowe. Białka shelterin chronią przed niepożądanymi aktywnościami szlaków naprawczych, a swoją obecnością zapewniają stabilność genomu, poprzez regulacje długości telomerów oraz ochronę przed ich uszkodzeniem. Mutacja POT1 jest związana ze zwiększonym ryzykiem występowania czerniaka złośliwego skóry, szczególnie z jego histologicznym podtypem czerniakiem szerzącym się powierzchownie. Z mutacją POT1 związane są również inne nowotwory takie jak glejak złośliwy, przewlekła białaczka limfocytowa, nowotwór jelita grubego, piersi i płuc (57).

### *TERF2IP/ACD*

ACD (ang. Adrenocortical dysplasia homolog) oraz TERF2IP (ang. Telomeric repeat binding factor 2, interacting protein) to dwa niedawno zidentyfikowane geny, których mutacja zwiększa ryzyko występowania czerniaka. Geny te kodują białka, które podobnie jak białko POT1 należą do kompleksu białek ochronnych shelterin. Osoby z mutacją genów ACD oraz TERF2IP mają zwiększone ryzyko występowania mnogich czerniaków, rozpoznawanych w młodym wieku. Najczęstszymi typami histologicznymi są czerniaki szerzące się powierzchownie oraz czerniaki wywodzące się z plamy soczewicowatej. Ponadto mutacje w genach ACD oraz TERF2IP są związane ze zwiększonym ryzykiem innych nowotworów, jak nowotworem piersi, jajnika, szyjki macicy, macicy, tarczycy, okrężnicy, płuc, nerek, dróg moczowych, prostaty i przełyku, a także chłoniaków i białaczek (58).

## 1.7.2 Geny o pośredniej penetracji

### *MITF*

Gen MITF (ang. Melanocyte inducing transcription factor) odpowiada za wytwarzanie białka zwanego czynnikiem transkrypcyjnym indukującym melanocyty. Czynnikiem transkrypcyjnym indukującym melanocyty pomaga kontrolować rozwój i funkcję melanocytów. W tych komórkach białko to kontroluje produkcję melaniny, która wpływa na kolor włosów, oczu i skóry. Wykazano, że wariant germinalny MITF p.E318K predysponuje do występowania czerniaka i raka nerkowokomórkowego (59). Wariant ten występuje u około 1% osób pochodzenia europejskiego i jest związany z 3 do 5 razy większym ryzykiem zachorowania na czerniaka. U nosicieli MITF, u których w wywiadzie osobistym lub rodzinnym występuje również rak trzustki lub raka nerkowokomórkowy, ryzyko zachorowania na czerniaka jest odpowiednio 31-krotnie lub 8-krotnie większe (60).

Jako część rodziny genów Myc, MITF koduje czynnik transkrypcyjny specyficzny dla linii melanocytów, który reguluje różnicowanie, proliferację i przeżycie melanocytów. MITF p.E318K jest wariantem przejmowania funkcji, który powoduje upośledzoną sumoilację białka, a co za tym idzie nieprawidłową regulację dalszych szlaków docelowych (59).

Co ciekawe, warianty MITF są związane z ciemniejszymi włosami, jasną skórą i innym niż niebieski kolorem oczu. Wykazano, że są one również związane ze zwiększoną liczbą znamion, znamionami atypowymi i czerniakami bezbarwnikowymi, a histopatologicznie z czerniakiem guzkowym oraz wyższym stopniem zaawansowania ocenianego za pomocą skali Breslow. Większość mutacji MITF ma charakter somatyczny, co oznacza, że pojawiają się w ciągu życia danej osoby i są obecne tylko w komórkach, z których powstaje czerniak. Podobnie jak w przypadku mutacji germinalnych, mutacje somatyczne genu MITF wiążą się z jego bardziej agresywną postacią i gorszym rokowaniem (60,61).

## MC1R

Gen MC1R zwany receptorem dla melanokortyny 1 (ang. melanocortin-receptor 1) reguluje pigmentację włosów, oczu oraz skóry. Receptor znajduje się na powierzchni melanocytów, które wytwarzają pigment zwany melanimą. Po aktywacji przez promieniowanie ultrafioletowe (UV), receptor wiąże hormon stymulujący melanocyty, co powoduje zwiększenie poziomu melanimy w melanocytach i stymulację mechanizmów naprawczych DNA (62).

Melanocyty tworzą dwie formy melanimy: eumelaninę i feomelaninę. Względne ilości tych dwóch pigmentów definiują kolor włosów i skóry osoby. Osoby, które produkują głównie eumelaninę, mają zwykle brązowe lub czarne włosy i ciemniejszą skórę, która łatwo się opala. Eumelanina chroni również skórę przed uszkodzeniami powodowanymi przez promieniowanie ultrafioletowe (UV). Osoby, które produkują głównie feomelaninę, mają rude lub blond włosy, piegi i jasną skórę, która słabo się opala. Ponieważ feomelanina nie chroni skóry przed promieniowaniem UV, osoby z większą ilością feomelaniny mają zwiększone ryzyko uszkodzenia skóry spowodowanego ekspozycją na słońce.

MC1R kontroluje, jaki rodzaj melanimy jest wytwarzany przez melanocyty. Kiedy receptor jest aktywowany, wywołuje szereg reakcji chemicznych wewnątrz melanocytów, które stymulują te komórki do wytwarzania eumelaniny. Jeśli receptor nie jest aktywowany lub jest zablokowany, melanocyty wytwarzają feomelaninę zamiast eumelaniny. Polimorfizmy genu MC1R są zatem związane z różnicami w kolorze skóry i włosów. Pewne polimorfizmy genu MC1R zwiększają ryzyko rozwoju czerniaka. Warianty te najczęściej zmniejszają zdolność receptora melanokortyny 1 do stymulowania produkcji eumelaniny w melanocytach, co skutkuje jasną karnacją. Eumelanina chroni skórę przed szkodliwym działaniem promieniowania UV, zatem mniejsza ilość tego pigmentu sprawia, że skóra jest bardziej podatna na uszkodzenia spowodowane ekspozycją na słońce. Uszkodzenie skóry spowodowane promieniowaniem UV jest głównym czynnikiem ryzyka rozwoju czerniaka. Badania sugerują, że inne zmiany w genie MC1R mogą również zwiększać ryzyko rozwoju czerniaka przy braku uszkodzeń skóry związanych z promieniowaniem UV. W takich przypadkach czerniaki mogą wystąpić u osób o ciemnej lub jasnej karnacji. Nowotwory te są często związane z mutacjami w dodatkowych genach związanych z ryzykiem czerniaka, takich jak BRAF i CDKN2A. Wciąż trwają badania nad wyjaśnieniem złożonego związku między odmianami MC1R, innymi czynnikami genetycznymi i środowiskowymi oraz ryzykiem czerniaka (62–64).

Przeprowadzone niedawno badanie wykazało, że 66% kohorty pacjentów z czerniakiem było nosicielami wariantów MC1R, a 28% czerniaków można przypisać genowi MC1R. Ponadto wykazano, że osoby z dwoma wariantami MC1R mają wyższe ryzyko czerniaka w porównaniu z osobami z pojedynczymi wariantami. W przypadku wariantów MC1R można spodziewać się 1,5 do 4-krotnego wzrostu ryzyka czerniaka oraz 3- do 4-krotnego ryzyka występowania czerniaków o wysokim stopniu zaawansowania. W badaniu z udziałem 2160 pacjentów nie wykryto znaczących powiązań między wariantami MC1R a zmiennymi histopatologicznymi, w tym grubością guza w skali Breslowa oraz Clarka, indeksem mitotycznym, owrzodzeniem, pionową fazą wzrostu, regresją, limfocytami naciekającymi nowotwór lub elastozą słoneczną. Wykazano natomiast związek pomiędzy występowaniem więcej niż jednego wariantu wysokiego ryzyka MC1R, a predyspozycją do występowania czerniaka zlokalizowanego na ramionach (65).

#### 1.8 Czerniak – aspekty epigenetyczne

Oprócz kilku dobrze udokumentowanych mutacji genów, które powiązano z rozwojem czerniaka, w ostatnim czasie dużą wagę przywiązuje się do udziału mechanizmów epigenetycznych. Zmiany epigenetyczne regulują ekspresję genów bez wpływu na sekwencję nukleotydów w DNA. Ekspresja ta może być modyfikowana przez czynniki zewnętrzne i podlegać dziedziczeniu. Wzajemne oddziaływanie pomiędzy mechanizmami epigenetycznymi wpływa na regulację procesów transkrypcyjnych i/lub translacyjnych. Ta regulacja ekspresji genów może odbywać się poprzez nieprawidłową metylację DNA w cytozynie (5mC), 5-hydroksymetylocytozynę (5hmC), modyfikacje histonów, ekspresję ncRNA, przebudowę chromatyny i pozycjonowanie nukleosomów (66,67). Spośród nich nieprawidłowa metylacja DNA i modyfikacje histonów zostały najintensywniej zbadane (68). Charakterystyka zmian epigenetycznych, które inicjują i promują rozwój czerniaka u ludzi, może zidentyfikować biomarkery, które można wykorzystać do zapobiegania, wczesnego wykrywania, leczenia i monitorowania postępu tego nowotworu.

### 1.8.1 Metylacja DNA

Metylacja to proces w którym metylotransferaza DNA dodaje grupę metylową przy użyciu S-adenozylometioniny jako donora metylu. Grupy metylowe są dodawane do piątego atomu węgla występującego w dinukleotydach CpG, co prowadzi do powstania 5-metylocytozyny (5mc). Następnie następuje rekrutacja kilku białek, mianowicie metylowanych białek wiążących DNA (MBD), które tworzą kompleks z deacetylazami histonowymi i czynnikami przebudowy chromatyny, co skutkuje supresyjnym statusem chromatyny. Metylację CpG można odwrócić, a główną rolę w demetylacji DNA odgrywają białka TET (ten-eleven translocation) należące do rodziny dioksygenaz. Enzymy te nie są w stanie usunąć grupy metylowej z reszty cytozyny, ale zamiast tego hydroksylują grupę metylową, tworząc 5-hydrometylocytozynę (5hmC). Zmodyfikowane cytozyny są następnie usuwane przez demetylujące enzymy zaangażowane w naprawę DNA (66). Poziom metylacji można określać na poziomie globalnym (tj. analizować całkowitą zawartość 5-metylocytozyny) w komórkach obwodowych krwi jak i nowotworowych, a także dla konkretnych genów (wówczas oznacza się poziom 5-metylocytozyny zlokalizowanej w specyficznym genie bądź promotorze) w komórkach nowotworowych.

Dzięki rozwojowi badań w zakresie biologii molekularnej stwierdzono, że zmiany we wzorze metylacji są podłożem do rozwoju wielu chorób, w tym nowotworów. Komórki nowotworowe charakteryzują się zazwyczaj globalną hipometylacją DNA bądź hipo/hipermetylacją wysp CpG (66). Globalna hipometylacja nie jest zależna od lokalnych zmian w metylacji DNA zlokalizowanych w regionach regulatorowych genów. Uważa się, że odpowiedni stopień metylacji DNA jest odpowiedzialny za integralność genomu, a globalna hipometylacja może prowadzić do zmniejszenia stabilności i aberracji chromosomów.

Dinukleotydy CpG są rozmieszczone w ludzkim genomie w precyzyjny sposób. Zlokalizowane są one zazwyczaj powyżej promotora genu, w pierwszym eksonie, gdzie epigenetycznie regulują ekspresję genów, w których się znajdują. W warunkach prawidłowych wyspy CpG są hipometylowane lub niemetylowane. Hiper- i hipometylacja w zależności od miejsca w genomie w którym zachodzą mogą skutkować nieprawidłową ekspresją genów związanych z nowotworami. W komórkach nowotworowych dochodzi zazwyczaj do hipermetylacji genów supresorowych nowotworu, gdzie po rekrutacji białek przebudowujących chromatynę hamowany jest proces transkrypcji. Hipermetylacja prowadzi do utraty kontroli nad cyklem komórkowym, przyczyniając się tym samym do rozwoju nowotworu, poprzez pobudzenie proliferacji komórek. Natomiast hipometylacja CpG może prowadzić do demetylacji regionów

promotorowych protoonkogenów prowadzącej do ich nadmiernej ekspresji i w efekcie skutkującej zwiększoną proliferacją komórek (69).

Czynniki środowiskowe, jak styl życia czy dieta wpływają na metylację DNA, prowadząc do globalnej hipometylacji DNA, zmiany ekspresji genów bądź genetycznej niestabilności. Natomiast analiza stopnia metylacji poszczególnych wysp CpG w komórkach nowotworowych może prowadzić do określenia wzorów metylacji wybranych chorób, a także stanowić potencjalne biomarkery dla nowotworów.

Wysoki poziom 5hmC zidentyfikowano jako charakterystyczną cechę epigenetyczną dla melanocytów i znamion, podczas gdy jego poziom zmniejsza się w czerniaku. Obserwacja ta zasugerowała, że poziom 5hmC w czerniaku może być wykorzystywany jako marker diagnostyczny lub prognostyczny u pacjentów. Natomiast regulacja w dół enzymów z rodziny TET, z najbardziej dramatycznym spadkiem TET2, została wykryta w czerniaku w porównaniu ze znamionami (70,71).

Dotychczas zidentyfikowano dużą grupę hipermetylowanych genów związanych z rozwojem czerniaka, do której należą m.in.: PTEN, BRIMS1, FERMT3 (KIND3), AKAP12 (SSECKS), CDKN2A, APAF-1, MTAP, MEN1, WFDC1, RASSF1A, RASSF8, RASSF6, SOCS1, MITF, TSPY, CYBA, MTA2, MX1, RPL37A, HSPB1, SYK, CDH13, CDH1, TRIM16, RUNX3, APC, MAPK13, RAR, AGTR1, SERPINB5, TCF21, SPINT2 (72).

Natomiast do grupy hipometylowanych genów występujących w czerniaku należą: CD2, CARD15, COL19A1, DDX26B, EMR3, EVI2A, GAGE 1-6, GPR89A, HLA-DP1, IFNG, IL2, ITK, KLK10, LAT, LARP7, MPO, MAGE-A1/A2/A4/A6, NY-ESO-1, NIPBL, p15, PRAME, PSCA, PTHLH, PTHR1, POLA1, SSX1-5, TNFSF8, TAF1 (73).

### 1.8.2 Modyfikacja histonów

Histon jest białkiem rdzeniowym, które odgrywa kluczową rolę w organizacji DNA w nukleosomach. Nukleosomy są podstawową jednostką strukturalną struktury chromatyny w komórkach eukariotycznych. Modyfikacje epigenetyczne histonów są złożone i mogą obejmować acetylację, metylację (jedno-, dwu- lub trój- cząsteczkową), fosforylację, ubikwitynację lub koniugację z cząsteczkami SUMO (small ubiquitin-likemodifier), tzw. sumoilację. Polegają one na przyłączeniu do cząsteczek histonów odpowiednio grup: acetylowych, metylowych, fosforanowych, ubikwityny lub białka SUMO (67). Najbardziej



poznanyimi modyfikacjami histonów są acetylacja i deacetylacja, które są inicjowane odpowiednio przez białka acetylotransferazy histonowej i deacetylazy histonowej. Acetylotransferaza histonowa dodaje grupę acetylową, która neutralizuje dodatnio naładowany histon, co prowadzi do rozluźnienia ścisłego wiązania między DNA (naładowany ujemnie) a histonem. To działanie zmienia zamkniętą heterochromatynę w otwartą euchromatynę, umożliwiając dostęp do czynników transkrypcyjnych, a tym samym transkrypcję genów. Deacetylaza histonowa wykonuje odwrotne działanie, przekształcając otwartą chromatynę w zamkniętą, zapobiegając ekspresji odpowiedniego genu. Jeśli te działania mają miejsce w regionie promotorowym genów związanych z nowotworem, aktywność deacetylazy histonowej może powodować rozwój raka. Metylacja histonów odgrywa również kluczową rolę w przebudowie chromatyny, a tym samym w regulacji ekspresji genów (66). Modyfikacje białek histonowych są bardziej złożonym mechanizmem, niż metylacja DNA. Wiążą się one z większą liczbą możliwych modyfikacji potranslacyjnych histonów, które zależą nie tylko od rodzaju modyfikacji, ale także od miejsca wystąpienia takiej modyfikacji na białku histonowym oraz przyłączaniu różnej liczby i różnych dodatkowych cząsteczek lub grup funkcyjnych. Daje to ogromną liczbę możliwych „kombinacji” wpływających na strukturę chromatyny i ekspresję genów, co wywołuje różnorodne skutki, a potencjał i ważność tego zjawiska odzwierciedla, stosowane coraz częściej pojęcie kodu histonowego (histonecode) i sprzęgania histonów (histone cross-talk) (74). Uważa się, że nieprawidłowa acetylacja histonów, w szczególności hipoacetylacja, wpływa na rozwój czerniaka poprzez zakłócenie tych samych szlaków, na które wpływają mutacje i hipermetylacja wysp CpG. W czerniaku profile ekspresji genów ujawniły utratę ekspresji genów supresorowych guza poprzez odwracalną deacetylację reszt lizyny w lokalnych histonach przez deacetylazy histonowe (HDAC). CDKN1A jest jednym z takich genów supresorowych czerniaka i ekspresja jego produktu, p21cip1, była podwyższona po zahamowaniu deacetylazy histonowej. Wskazuje to, że hipoacetylacja histonów prowadzi do utraty mechanizmów supresorowych guza w czerniaku i pobudzenie proliferacji komórek nowotworowych. Hipoacetylacja histonów została również powiązana z regulacją w dół niektórych białek proapoptotycznych, takich jak Bim, Bax i Bak. Niedawne badania wykazały, że fosfatydyloinozytolu-4,5-bisfosforan 5-fosfataza A (PIB5PA) odgrywa rolę w supresji nowotworu i jest często zmniejszony w czerniaku. Jego nadekspresja blokuje sygnalizację PI3K/Akt, hamuje proliferację i zmniejsza przeżywalność komórek czerniaka in vitro. Obniżenie poziomu PIB5PA, stwierdzone w części czerniaków, było spowodowane hipoacetylacją histonów, w której pośredniczą deacetylazy histonów poprzez wiązanie z czynnikiem transkrypcyjnym Sp1 na promotorze genu PIB5PA (75,76). Ponadto metylacja

histonów również odgrywa rolę w rozwoju i progresji czerniaka. Regulacja w górę Ezh2, która przyłącza potrójne grupy metylowe do K27 w H3, prowadzi do regulacji w dół ekspresji p21Cip1 w ludzkim czerniaku. Tymczasem enzymy demetylujące, takie jak demetylaza H3K4 JARID1B, H3K4, H3K9, H3K27 również biorą udział w rozwoju czerniaka (77,78). Ponadto wykazano, że metylotransferaza histonowa SETDB1 (SET Domain, Bifurcated 1) jest podwyższona w czerniaku i przyspiesza rozwój tego nowotworu skóry powiązanego z mutacją BRAFV600E. SETDB1 katalizuje trimetylację histonu H3K9 i w ten sposób promuje represję docelowych genów. W przeciwieństwie do BRAFV600E, który jest obecny zarówno w czerniaku, jak i w łagodnych znamionach, białko SETDB1 jest podwyższone w czerniaku, ale nie w łagodnych znamionach lub prawidłowych melanocytach (79).

## 1.9 Wiek chronologiczny vs biologiczny

Wiek chronologiczny stanowi jedynie przybliżoną miarę procesów starzenia się organizmu i w związku z tym niezbędne jest zidentyfikowanie wiarygodnych biomarkerów, na podstawie których będziemy w stanie określić różnice w tempie starzenia się osób jak i prawidłowo ocenić ryzyko wystąpienia chorób związanych z wiekiem. Chociaż wiek chronologiczny jest prawdopodobnie najsilniejszym czynnikiem ryzyka zgonów i chorób związanych ze starzeniem się, ważne jest, aby odróżnić czas chronologiczny od starzenia biologicznego.

Osoby o tym samym wieku chronologicznym mogą bowiem wykazywać różną podatność na związane z wiekiem choroby i śmierć, mogą też charakteryzować się różnym tempem zmian w cechach progresywnych wyglądu, które jak wskazują badania odzwierciedlają różnice w leżącym u ich podstaw biologicznym procesie starzenia się (5,80,81). Biomarkery starzenia mogą mieć kluczowe znaczenie, umożliwiając ocenę interwencji mających na celu promocję zdrowszego starzenia się poprzez zapewnienie mierzalnych rezultatów, które, w przeciwieństwie do przypadków śmierci i / lub choroby, nie wymagają wyjątkowo długiej obserwacji. Poprzez dokładne określenie wieku biologicznego vs wieku chronologicznego (i ocenę tzw. tempa starzenia się organizmu) można przewidzieć długość życia i zapobiec chorobom wieku starczego.

Idealny kalkulator wieku biologicznego jest uważany za użyteczny biomarker, jeśli koreluje z wiekiem chronologicznym, ale, co ważne, również z dodatkowymi informacjami na temat

indywidualnego ryzyka chorób związanych z wiekiem. Ponadto, ważne jest aby biomarkery starzenia mogły być oznaczane bez potrzeby przeprowadzania inwazyjnych procedur pobrania materiału, na podstawie którego biomarker starzenia będzie analizowany. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat zaproponowano wiele cech fizjologicznych, funkcjonalnych, komórkowych i molekularnych jako predyktorów wieku biologicznego, ale niewiele z nich okazało się precyzyjnych. W ostatnim czasie zidentyfikowano wiele obiecujących biomarkerów wieku biologicznego, w tym estymatory wieku biologicznego oparte na metylacji DNA, długości telomerów, transkryptomice, proteomice, metabolomice i złożonych panelach biomarkerów (82). Spośród nich w wielu badaniach wykazano, że predyktory wieku oparte na metylacji DNA (DNAm) w zakresie określonych loci, zwane zegarami epigenetycznymi najlepiej sprawdzają się jako kalkulatory wieku biologicznego (5,81). Wraz ze starzeniem się osób, wzorce DNAm przechodzą charakterystyczne zmiany związane z wiekiem, wtórnie do skutków wywołanych przez styl życia i czynniki środowiskowe. Do najbardziej znanych oraz dokładnych ogólnodostępnych zegarów epigenetycznych należą m.in. Horvath's clock, Hannum's clock, DNAm PhenoAge, Skin & Blood clock i DNAm GrimAge (5,81,83–85). Należy przy tym zauważyć, że powiązane z wiekiem markery metylacyjne DNA dzielą się na markery korelujące silniej z wiekiem chronologicznym i markery opisujące precyzyjniej wiek biologiczny. W związku z tym poszczególne kalkulatory i markery w nich zawarte mogą różnić się w ocenie wieku biologicznego. Na przykład markery zawarte w zegarze Horvatha są mniej podatne na wpływ czynników środowiskowych i w związku z tym lepiej opisują wiek chronologiczny (5). Natomiast wykazano, że kalkulatory Hannum, PhenoAge i GrimAge dobrze opisują wiek biologiczny osób, a wyznaczone tempo starzenia się skorelowane jest z długością życia oraz podatnością na choroby (83). Na podstawie wyznaczonych wartości wieku epigenetycznego można także obliczyć współczynnik tempa starzenia się (EAA score, ang. epigenetic age acceleration), który jest różnicą pomiędzy wiekiem chronologicznym, a wiekiem biologicznym.

Metylacja jest modyfikacją DNA, która ulega zmianom w trakcie całego życia. Już na wczesnych etapach rozwoju embrionalnego wzór metylacji podlega silnym zmianom, natomiast wraz z wiekiem obserwuje się spadek metylacji w skali całego genomu. Z drugiej strony w starzejących się komórkach obserwuje się także stopniową utratę ekspresji niektórych genów w wyniku hipo bądź hipermetylacji wysp CpG. Do tych genów należą między innymi te, które kodują białka blokujące namnażanie komórek, białka p53 blokujące wzrost nowotworów, czynniki transkrypcyjne związane z mitochondriami, dysmutazy ponadtlenkowe oraz lipooksygenazy. Szacuje się, że zmiany metylacji DNA związane ze starzeniem się

organizmu są w ok. 40% dziedziczne, a więc tempo starzenia w znacznym stopniu podlega regulacji genetycznej. Związek pomiędzy wiekiem chronologicznym, wynikającym z daty urodzenia, a wiekiem biologicznym, wyznaczonym na podstawie metylacji DNA, jest istotny pod względem medycznym. Dzięki określeniu, a także monitorowaniu wieku biologicznego człowieka można przewidywać długość życia lub także zidentyfikować przyspieszone starzenie (ang. age acceleration). Zjawisko takie powiązano np. z wcześniejszym wystąpieniem menopauzy (86). W ostatnich latach coraz więcej uwagi przywiązuje się do wpływu czynników środowiskowych na metylację DNA. Oczywistym jest fakt, że środowisko zewnętrzne, styl życia, rodzaj diety, uprawianie sportu ma duży wpływ na zdrowie człowieka. Czynniki środowiskowe powiązane są z metylacją DNA, a tym samym z wiekiem biologicznym (87). W literaturze istnieją doniesienia naukowe, traktujące o różnych czynnikach zewnętrznych mogących нефизjologicznie przyspieszać wiek biologiczny, jak np. palenie papierosów, spożywanie alkoholu, nieprawidłowa dieta, promieniowanie UV (6,7,86,87). Badając wiek biologiczny, w kontekście czynników środowiskowych, możliwe jest badanie przyczyny starzenia, ale także związku z wystąpieniem różnego rodzaju chorób. Identyfikacja czynników wywołujących zmiany w metylacji oraz możliwość badania zmian we wzorze metylacji może pozwolić na opracowanie narzędzi służących do wczesnej diagnostyki oraz pełniejszego zrozumienia mechanizmów niektórych chorób. Badania naukowe dowodzą o istotnym związku między zmianami w metylacji DNA, a występowaniem różnego rodzaju schorzeń. Prawdopodobnie zmiana wzoru metylacji, wywołana czynnikiem zewnętrznym, może przyczyniać się do wystąpienia chorób, takich jak np. choroby wieńcowej serca czy nowotworu złośliwego sutka (6,7).

Zapadalność na nowotwory, jest bezpośrednio związana z wiekiem, a zaawansowany wiek metrykalny jest jednym z najistotniejszych czynników ryzyka zachorowania na nowotwory, w tym czerniaka złośliwego skóry (2). Ostatnie badania nad różnymi typami nowotworów wskazują na znaczenie epigenetycznego starzenia się w procesie onkogenezy i jego potencjalnego wykorzystania do przewidywania ryzyka zachorowania na nowotwory (7).

Powszechnie wiadomo, że zmiany statusu metylacji dinukleotydów CpG w całym genomie, dobrze zbadanej cechy epigenetycznej genomu ludzkiego, zachodzą podczas procesu onkogenezy. Proces epigenetycznego starzenia ma szczególne znaczenie dla zrozumienia procesu nowotworzenia w świetle wielu badań nad nieprawidłowymi zmianami metylacji DNA. Niedawno badania epigenetyczne całego genomu ujawniły szczególne cechy epigenomiczne wspólne dla starzenia się i procesu onkogenezy (81,88). W literaturze brakuje natomiast podobnych badań przeprowadzonych u pacjentów z czerniakiem złośliwym skóry.

Koncepcja, iż zależna od wieku metylacja DNA może indukować proces onkogenezy w prawidłowych komórkach jest poparta obserwacjami zachodzących zmian związanych z dryfem epigenetycznym w tkankach takich jak okrężnica, błona śluzowa policzków palaczy czy skóra (89–91). Ponadto Klutstein i inni (2017) wykazali, że specyficzne dla tkanki ryzyko nowotworu jest silnie skorelowane ze stopniem nieprawidłowej, zależnej od wieku metylacji (92). Obserwacje te sugerują, że epigenetyczne starzenie się może predysponować do przekształcenia się prawidłowych komórek w komórki rakowe.

Ostatnie badania wykazały przyspieszenie epigenetycznego tempa starzenia wykrytego w próbkach krwi pobranych od pacjentów, u których rozwinął się nowotwór, w porównaniu z pacjentami bez rozpoznanego nowotworu. Warto zauważyć, że zaobserwowane przyspieszone tempo starzenia w próbkach krwi tych pacjentów prawdopodobnie odzwierciedla także ogólnoustrojowy, a nie tylko miejscowy, wpływ zmian metylacji DNA na predyspozycje do wystąpienia nowotworu (93,94).

#### 1.10 Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. single nucleotide polymorphism)

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. single nucleotide polymorphism) to najczęściej występująca zmienność sekwencji DNA. Polega na zastąpieniu pojedynczego nukleotydu w sekwencji innym nukleotydem. SNP może pozostawiać cichą modyfikacją (tzw. zmiana synonimiczna) lub nieść ze sobą zmianę sensu kodonu (tzw. zmiana niesynonimiczna). Warianty danej sekwencji (nazywane allelami) różnią się między osobnikami populacji. Zmiany w sekwencji ludzkiego DNA mogą wywoływać choroby, wiązać się z określonym fenotypem, zmieniać odpowiedź organizmu na pewne patogeny, substancje chemiczne, leki itp. Największe znaczenie mają badania porównawcze sekwencji DNA osób chorujących na dane schorzenie i bez tej choroby pozwalające na identyfikację markerów genetycznych. Prawidłowe badanie asocjacyjne całego genomu (GWAS, ang. Genome-wide association study) jest badaniem epidemiologicznym, prowadzonym na tysiącach osób. Badanie to polega na utworzeniu dwóch grup: jednej - badanej, wyodrębnionej pod kątem żądanej cechy oraz drugiej - kontrolnej. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie informacji na temat częstości występowania polimorfizmu w poszczególnych grupach.

Przeprowadzone dotychczas analizy GWAS ujawniły liczne polimorfizmy określające zwiększoną podatność zachorowania na różne schorzenia, w tym czerniaka złośliwego. Do dotychczas odkrytych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu zwiększających ryzyko

wystąpienia czerniaka złośliwego należą te zlokalizowane w obrębie m.in. następujących genów: PARP1, CYP1B1, TERT, CDKALI, POT1, TP53, MITF, AGR3TYR, CDK10, MYH7B, SLC45A2, MTAP, CASP8, AGR3, CDKN2A, TMEM38B, OBFC1, CCND1, TYR, ATM, OCA2, MC1R, ASIP, MX2, MAFF (95) .

## 2. Cele badania

Celami niniejszej pracy doktorskiej w badanej grupie pacjentów było:

1. Ocena wpływu czynników środowiskowych na rozwój czerniaka złośliwego.
2. Porównanie tempa starzenia się skóry mierzonego obiektywnymi parametrami klinicznymi pacjentów z rozpoznaniem czerniaka złośliwego w porównaniu do grupy kontrolnej składającej się z osób zdrowych, dobranych do grupy badawczej pod względem płci i wieku.
3. Scharakteryzowanie epigenetycznego wieku biologicznego za pomocą różnych zegarów biologicznych oraz określenie współczynnika tempa starzenia się pacjentów z rozpoznaniem czerniaka złośliwego w porównaniu do grupy kontrolnej składającej się z osób zdrowych, dobranych do grupy badawczej pod względem płci i wieku.
4. Określenie czy starzenie się skóry koreluje z wiekiem epigenetycznym.
5. Określenie czy czerniak złośliwy skóry, a także czynniki środowiskowe (na które pacjenci z czerniakiem złośliwym byli i są ekspozycyjni) są skorelowane z wiekiem epigenetycznym.
6. Ocena korelacji między danymi metylacyjnymi i czynnikami środowiskowymi a wystąpieniem czerniaka złośliwego skóry u pacjentów.
7. Analiza ogólnogenomowych danych SNP pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym w porównaniu do grupy kontrolnej składającej się z osób zdrowych, dobranych do grupy badawczej pod względem płci i wieku celem identyfikacji nowych, dotychczas nieznanymi wariantów SNP zwiększających genetyczną podatność na zachorowanie na czerniaka złośliwego.
8. Ocena predyspozycji genetycznych badanej populacji polskich pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry do rozwoju czerniaka poprzez

zweryfikowanie występowania SNP w zakresie wszystkich znanych wariantów, zasocjowanych wcześniej z czerniakiem w populacji europejskiej.



### 3. Opis materiału badawczego i metodyki

Badanie zostało przeprowadzone w grupie 202 pacjentów (grupa badawcza – 101 osób, grupa kontrolna – 101 osób). Czas od rozpoczęcia do zakończenia badania wynosił 2 lata.

#### 3.1 Grupa badawcza – charakterystyka

Do grupy badawczej zostali włączeni kolejno zgłaszający się do Poradni Dermatologicznej Oddziału Klinicznego Dermatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie pacjenci (mężczyźni oraz kobiety w wieku >18 r.ż.) z nowo lub w przeszłości rozpoznanym czerniakiem złośliwym skóry.

Kryteria wyłączenia: ciężkie choroby przewlekłe m.in. toczeń rumieniowaty układowy, twardzina układowa, zaostrenie niewydolności serca, zaawansowana niewydolność nerek, czynna lub obecna w przeszłości choroba nowotworowa inna niż czerniak złośliwy, nadużywanie leków lub alkoholu.

#### 3.2. Grupa kontrolna – charakterystyka

Grupa kontrolna została dobrana do grupy badawczej stosownie pod względem wieku oraz płci.

Kryteria wyłączenia: ciężkie choroby przewlekłe m.in. toczeń rumieniowaty układowy, twardzina układowa, zaostrenie niewydolności serca, zaawansowana niewydolność nerek, czynna lub obecna w przeszłości choroba nowotworowa, nadużywanie leków lub alkoholu, dodatni wywiad rodzinny w kierunku czerniaka złośliwego.

Potencjalni uczestnicy badania uzyskali szczegółową informację o planach badawczych, również w formie wydruku oraz zostali poproszeni o podpisanie formularza zgody uczestnika badania, formularza zgody na przetwarzanie danych osobowych oraz formularza zgody na wykonanie badań genetycznych. Pacjenci zostali poinformowani, że udział w badaniu jest całkowicie dobrowolny, a uczestnik może wycofać się z udziału w tym badaniu w dowolnym

momencie, bez podania przyczyn. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z zasadą jak najmniejszej ingerencji w życie prywatne badanych osób oraz wyłącznie po wyrażeniu świadomej, pisemnej zgody na udział w badaniu zgodnie z zasadami Kodeksu Etyki Lekarskiej.

### 3.3. Schemat przebiegu badania w czasie

1. Ankietowanie wszystkich uczestników badania za pomocą obszernego kwestionariusza wywiadu. Kwestionariusz składał się z 5 części, które uwzględniały szczegółowe informacje dotyczące odpowiednio:
  - a) danych demograficznych (m.in. wieku, pochodzenia biogeograficznego, statusu socjoekonomicznego)
  - b) pracy zawodowej oraz stylu życia (m.in. trybu pracy, szkodliwych warunków w miejscu pracy, diety, stosowania używek, aktywności fizycznej, ekspozycji na promieniowanie UV, obecności chorób przewlekłych, stosowanych leków)
  - c) szczegółowych pytań odnośnie aktywności fizycznej, do której został wykorzystany Międzynarodowy Kwestionariusz Aktywności Fizycznej IPAQ
  - d) cech progresywnych wyglądu oraz cech biometrycznych
  
2. U osób należących do grupy badawczej (z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry) ponadto zebrano informacje dotyczące typu histomorfologicznego rozpoznanego czerniaka, jego stopnia zaawansowania (tj. grubości nacieku wg skali Breslow oraz Clark, aktywności mitotycznej, obecności owrzodzenia, obecności przerzutów do węzłów chłonnych bądź do narządów wewnętrznych), wieku pacjenta w momencie diagnozy oraz lokalizacji czerniaka.

Każdej ankiecie został nadany unikatowy numer, który po oznaczeniu próbek stanowił ich jedyny identyfikator.

3. U wszystkich uczestników badania zostały ocenione progresywne cechy wyglądu (w tym starzenie się skóry wg skali Glogau, stopień siwienia, kolor skóry wg skali Fitzpatricka). Zebrano dokumentację fotograficzną 2D (za pomocą aparatu fotograficznego), a także wykonano skan 3D twarzy (przy użyciu profesjonalnego

skanera 3 D (VECTRA H1). Należy podkreślić, że u wszystkich uczestników cechy progresywne wyglądu zostały określone w czasie rzeczywistym (w trakcie rekrutacji do badania) oraz następnie sprawdzone pod kątem prawidłowości danych retrospektywnie na podstawie zebranej dokumentacji fotograficznej.

4. Następnie od wszystkich uczestników została pobrana krew żylna (5 ml) oraz dwukrotnie wykonano wymaz ze śluzówek policzka (tj. lewego oraz prawego policzka). Pobieranie próbek krwi oraz wymazów zostało przeprowadzone zgodnie ze wszystkimi zasadami etyki lekarskiej. Próbki krwi oraz wymazy do badań pobierane były przez uprawnione pielęgniarki zatrudnione w Klinice Dermatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Pobrane próbki były przechowywane (w temperaturze -20 stopni Celsjusza) w Katedrze i Klinice Dermatologii UJ CM do czasu ich przekazania do Małopolskiego Centrum Biotechnologii UJ, gdzie zostały poddane analizom epigenetycznym, genetycznym oraz statystycznym.
5. Po zebraniu całości grupy badawczej oraz kontrolnej dokonano oceny kompletności wszystkich próbek (tj. obecności materiału biologicznego - krwi i śliny, kompletności danych kwestionariuszowych, cech antropometrycznych, danych dotyczących charakterystyki rozpoznanego czerniaka wśród pacjentów z grupy badawczej, dokumentacji fenotypów twarzy, tj. obrazów 2D i 3 D twarzy)
6. Następnie przeprowadzono ogólnogenomową analizę metylacji DNA dla próbek pobranych od wszystkich uczestników badania z zastosowaniem technologii mikromacierzy Illuminy (Infinium® Global Screening Array i Infinium® MethylationEPIC 850K, Illumina).
  - a) Dane dotyczące metylacji uzyskane od wszystkich uczestników badania zostały wstępnie przetworzone przy użyciu standardowego przepływu pracy analizy bioinformatycznej i następnie zostały przeprowadzone różne obliczenia oparte na metylacji DNA (szczegóły zostały opisane w kolejnym rozdziale).
  - b) Na podstawie zebranych szczegółowych danych kwestionariuszowych w grupie badawczej została przeprowadzona analiza korelacji pomiędzy czynnikami środowiskowymi, danymi metylacyjnymi a wystąpieniem czerniaka złośliwego skóry.

7. Kolejno przeprowadzono ogólnogenomową analizę zmienności SNP dla próbek pobranych od wszystkich uczestników badania z zastosowaniem technologii mikromacierzy Illuminy (Infinium® Global Screening Array i Infinium® MethylationEPIC 850K, Illumina)
  - a) Na podstawie ogólnogenomowych danych SNP została przeprowadzona identyfikacja nowych, dotychczas nieznanymi wariantów SNP zwiększających podatność na zachorowanie na czerniaka złośliwego.
  - b) Na podstawie ogólnogenomowych danych SNP została przeprowadzona ocena predyspozycji genetycznych pacjentów z grupy badawczej do rozwoju czerniaka. Nastąpiło to poprzez zweryfikowanie występowania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w zakresie wszystkich znanych wariantów, zasocjowanych wcześniej z czerniakiem.
8. Finalnie została przeprowadzona analiza statystyczna wszystkich zgromadzonych danych i interpretacja uzyskanych wyników. Zmienne jakościowe zostały wyrażone jako liczebności i odpowiadające im wartości procentowe. Zmienne ilościowe wyrażono jako mediany, kwartyle oraz średnie i odchylenia standardowe. W przypadku braku rozkładu normalnego zmiennych ilościowych w obu grupach do porównania zmiennych pomiędzy grupami użyto testu Manna Whitneya, natomiast gdy zmienne ilościowe były zgodne z rozkładem normalnym, wówczas średnie były porównywane za pomocą testu T. Jednorodność wariancji oceniono za pomocą testu Levene'a jako statystycznego warunku wstępnego dla testu t. Do porównania zmiennych jakościowych pomiędzy grupami został zastosowany test Chi 2. Natomiast do sprawdzenia korelacji pomiędzy dwoma zmiennymi ilościowymi wykorzystano test korelacji Spearmana. Biorąc pod uwagę analizę danych kwestionariuszowych wartość  $p < 0,05$  uznano jako istotnie statystycznie, natomiast w analizie danych genetycznych i epigenetycznych próg istotności wynosił odpowiednio  $p < 5 \cdot 10^{-8}$  (analiza GWAS) oraz  $p < 9 \cdot 10^{-8}$  (analiza EWAS). Obliczenia zostały wykonane za pomocą programu STATISTICA, wersja 12 (StatSoft, Poland) oraz za pomocą programu SPSS.

### 3.4 Szczegóły dotyczące metodologii analizy genetycznej oraz epigenetycznej.

#### 3.4.1 Analiza asocjacyjna całego genomu.

Analizę asocjacji w skali całego genomu (ang. genome-wide association study; GWAS) przeprowadzono na 101 przypadkach ze zdiagnozowanym czerniakiem i 101 dobranych płcią i wiekiem próbkach kontrolnych z populacji polskiej. 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 ( $P > 1 \times 10^{-6}$ ). Braki danych zostały uzupełnione metodą imputacji Beagle 5.2 (96,97). Ostateczna 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.

#### 3.4.2 Analiza danych metylacyjnych, wieku epigenetycznego oraz parametrów EAA

Dane metylacyjne dla grupy badawczej i kontrolnej uzyskano przy zastosowaniu technologii mikromacierzy i zestawu Infinium MethylationEPIC (macierz Infinium, manifest MethylePIC v1 B5). Początkowa liczba sond CpG wynosiła 865 918. Surowe dane zostały poddane analizie jakościowej z zastosowaniem programów minfi, limma i RnBeads zaimplementowanych w środowisku R (98). Wstępną analizę jakości przeprowadzono na plikach idat z zastosowaniem oprogramowania GenomeStudio (Methylation Module v1.8). Obejmowała ona analizę pakietu sond wewnętrznych odpowiadających m.in. kontroli konwersji wodorosiarczynem sodu, kontroli specyficzności i wydajności hybrydyzacji. Następnie zastosowano filtrowanie danych w R (pakiet minfi) mające na celu wykluczenie z dalszych analiz sond o bardzo niskiej jakości (próg 0,01), sond zlokalizowanych na chromosomach płci, sond wykazujących reaktywność krzyżową i sond hybrydujących do miejsc występowania polimorfizmu SNP. Dokonano korekty tła metodą Noob i normalizację danych z zastosowaniem programu minfi. Status metylacji dla każdej analizowanej pozycji CpG został zdefiniowany jako średnia wartość B (0-1), która wyliczana jest jako proporcja sygnału metylacji do sygnału całkowitego. Wygenerowane wartości B metylacji zostały następnie wykorzystane celem estymacji różnych

parametrów epigenetycznego starzenia się. W tym celu użyto szereg modeli/zegarów epigenetycznych dostępnych w literaturze i zgromadzonych w narzędziu internetowym <https://dnamage.genetics.ucla.edu>

Dane dotyczące metylacji uzyskane od wszystkich uczestników badania zostały wstępnie przetworzone przy użyciu standardowego przepływu pracy analizy bioinformatycznej i następnie zostały przeprowadzone różne obliczenia oparte na metylacji DNA. Wiek epigenetyczny uzyskano dla zegara Horvath, Skin&BloodClock, zegara Hannuma, PhenoAge, GrimAge. Każdy z tych zegarów przewiduje różne aspekty procesu starzenia, w tym dokładniejsze oszacowanie wieku chronologicznego (zegary: Horvath, Hannum i Skin&Blood) lub oszacowanie wieku biologicznego (PhenoAge i GrimAge). Na podstawie wyznaczonych wartości wieku epigenetycznego dla każdego zegara, obliczono epigenetyczne przyspieszenie wieku (EAA), które stanowi miarę różnicy między wiekiem chronologicznym a wiekiem epigenetycznym, i jest obliczane jako reszta modelu regresji określającego związek wieku epigenetycznego z wiekiem chronologicznym. Wartość parametru  $EAA > 0$  oznacza przyspieszone tempo starzenia w stosunku do oczekiwanego, tj. wynikającego z wieku chronologicznego. Wartość ujemna parametru EAA oznacza spowolnione tempo starzenia w stosunku do oczekiwanego, tj. wynikającego z wieku chronologicznego.

Najpierw obliczono pierwszy typ predyktorów przyspieszenia wieku epigenetycznego tj. opartych na zegarach lepiej szacujących wiek chronologiczny (Horvath i Hannum). Obliczono HorvathAccel, IEAA (ang. Intrinsic Epigenetic Age Acceleration) a także EEAA (Extrinsic Epigenetic Age Acceleration) (5,83). IEAA obliczany jest jako reszta modelu regresji określającego związek wieku epigenetycznego oszacowanego za pomocą zegara Horvath z wiekiem chronologicznym, który następnie jest skorygowany na podstawie oszacowania liczby poszczególnych komórek krwi. Natomiast EEAA obliczany jest jako reszta modelu regresji określającego związek wieku epigenetycznego oszacowanego za pomocą zegara Hannum z wiekiem chronologicznym, ze skorygowaniem na podstawie faktycznej liczby poszczególnych komórek układu odpornościowego we krwi. IEAA jest zatem niezależny od związanych z wiekiem zmian w składzie komórek krwi, które są charakterystyczne dla starzenia się układu odpornościowego, natomiast EEAA uwzględnia je, a zatem jest miarą starzenia się układu immunologicznego (99). Następnie zostały oszacowane miary przyspieszenia wieku epigenetycznego za pomocą drugiego rodzaju kalkulatorów, do których należą PhenoAgeAccel i GrimAgeAccel (81,85). W przeciwieństwie do pierwszego typu predyktorów precyzyjniej

obliczają one przyspieszenie wieku biologicznego stanowią zatem dobre biomarkery ryzyka śmiertelności i wskaźniki długości życia i zdrowia.

Obliczono również inne miary, takie jak parametr tempa starzenia się PoAm (ang. Pace of Aging Methylation), epigenetyczny wskaźnik ryzyka śmiertelności MRS Zhang, a także DNAmTL (estymator długości telomerów leukocytów oparty na metylacji DNA) (100–102). Wszystkie wygenerowane wartości parametru EAA dla poszczególnych zegarów zostały następnie poddane asocjacji ze stanem choroby.

### *3.4.3 Analiza asocjacji w skali epigenomu (EWAS)*

Analizę różnicową metylacji przeprowadzono dla grupy badawczej i kontrolnej, poprzez określenie różnicy w średnich poziomach globalnej metylacji dwóch porównywanych grup z zastosowaniem pakietu limma w środowisku R.

### 3.5 Informacje dodatkowe

Niniejsza praca doktorska była realizowana we współpracy z Małopolskim Centrum Biotechnologii UJ. Badania zostały sfinansowane w ramach projektu pt.: "Analiza epigenomu w celach dochodzeniowo-śledczych – zwiększenie możliwości identyfikacyjnych i wykrywczych badań DNA" finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (nr DOB-BIO10/06/01/2019). Badania uzyskały zgodę komisji bioetycznej nr 1072.6120.98.2020 z dn. 23.04.2020r.

## 4. Wyniki

### 4.1 Dane demograficzne – charakterystyka badanej populacji.

Zarówno grupa badawcza jak i kontrolna składały się z 101 pacjentów, z czego 65 osób były płci żeńskiej (64,4%), a 36 płci męskiej (35,6%). Średnia wieku pacjentów należących do grupy badawczej, tj. z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry wynosiła 56,48 +/- 14,03, mediana 59 (45-68). W chwili rekrutacji do badania najstarszy pacjent miał 83 lat, natomiast najmłodszy 32. Średnia wieku w momencie rozpoznania czerniaka niezależnie od płci wynosiła 52,29 +/- 14,57, mediana 53 (41-65), natomiast po podziale na płeć: u kobiet 48,95 +/- 14,56, mediana 46 (39-59); a u mężczyzn 58,4 +/- 12,64, mediana 61 (48-68). Spośród naszej grupy badawczej najwcześniej u kobiet rozpoznano czerniaka złośliwego w wieku 16 lat, a najpóźniej w wieku 80 lat, natomiast u mężczyzn było to odpowiednio 30 i 78 lat.

Grupa kontrolna została odpowiednio dobrana do grupy badawczej pod względem płci i wieku, zatem nie wykazano istotnych różnic w medianie wieku pomiędzy grupami [59 (45-68) vs 58 (44-68);  $p=0,8$ ; wykres 1], a także w rozkładzie płci (kobiety 64,4% vs 64,4%; mężczyźni 35,6% vs 35,6%;  $p=1$ ).

Spośród pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry 72,28% zamieszkiwało miasto, natomiast 27,72% pacjentów wskazało wieś jako swoje miejsce zamieszkania. Wyniki te nie różniły się istotnie w porównaniu do pacjentów u których nie rozpoznano czerniaka złośliwego skóry (miasto: 72,28% vs 85,15%; wieś: 27,72% vs 14,85%;  $p=0,26$ ).

Badane grupy różniły się istotnie pod względem poziomu wykształcenia. W przeprowadzonej analizie odsetek osób które posiadały wykształcenie wyższe (licencjackie/magisterskie) był istotnie niższy wśród osób z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry w porównaniu do osób zdrowych (53,47% vs 68,32%;  $p=0,03$ ). Status socjoekonomiczny nie był czynnikiem różnicującym obie grupy. 79,21% pacjentów z czerniakiem złośliwym skóry określiło swój status jako niski i przeciętny, natomiast 20,79% jako ponadprzeciętny. W grupie pacjentów bez czerniaka było to odpowiednio 80,20% oraz 19,80% ( $p=0,86$ ). Otrzymane wyniki zostały zbiorczo zaprezentowane w tabeli 1.

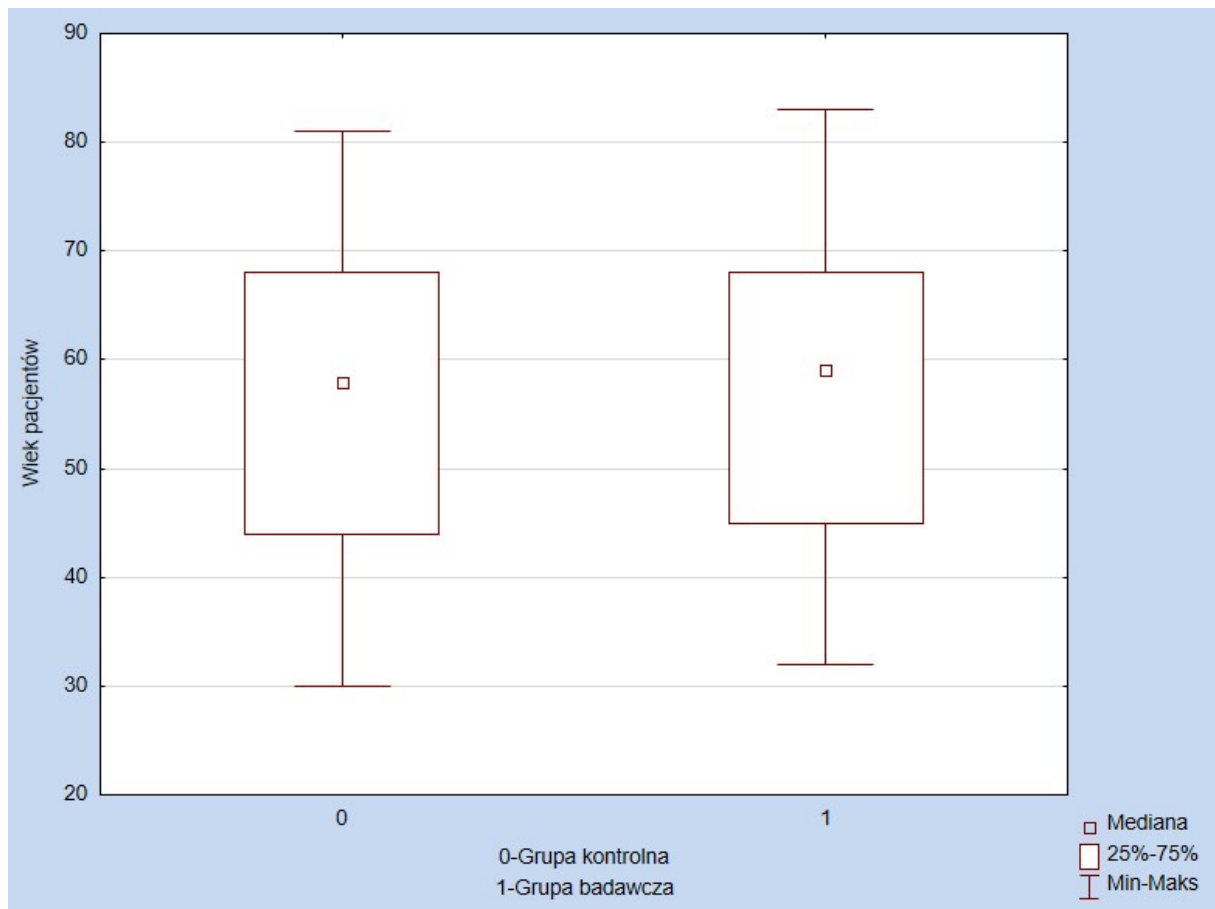


Tabela 1: Wybrane dane demograficzne – porównanie badanych grup.

	Grupa badawcza	Grupa kontrolna	Wartość p
Odsetek i liczba pacjentów płci żeńskiej	64,4% N=65	64,4% N=65	p*=1
Odsetek i liczba pacjentów płci męskiej	35,6% N=36	35,6% N=36	p*=1
Odsetek i liczba pacjentów zamieszkujących miasto	72,28% N=73	85,15% N=86	p*=0,26
Odsetek i liczba pacjentów zamieszkujących wieś	27,72% N=28	14,85% N=15	p*=0,26
Odsetek i liczba pacjentów posiadających wyższe wykształcenie	53,47% N=54	68,32% N=69	<b>p*=0,03</b>
Odsetek i liczba pacjentów posiadających niski i przeciętny status socjoekonomiczny	79,21% N=80	80,20% N=81	p*=0,86
Odsetek i liczba pacjentów posiadających ponadprzeciętny status socjoekonomiczny	20,79% N=21	19,80% N=20	p*=0,86

\*test Chi2 (istotność dokładna dwustronna)

Wykres 1 : Wykres ramka-wąsy porównujący wiek badanych grup.



#### 4.2 Styl życia – charakterystyka badanej populacji.

Wśród pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry 54,46% opisało swoją aktywność sportową jako brak, bądź raz w tygodniu, natomiast 45,54% uprawiało sport dwa bądź więcej razy w tygodniu. Wyniki te były zbliżone w grupie kontrolnej (odpowiednio 45,54% i 54,46%;  $p=0,21$ ). W przeprowadzonym badaniu nie wykazano również istotnej różnicy między odsetkiem osób uprawiających jakiegokolwiek sport w grupie pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry i bez tego typu nowotworu (58,42% vs 68,32%;  $p=0,14$ ). Ponadto nie wykazano istotnych różnic pomiędzy medianami czasu spędzonego na siedzeniu na dobę wyrażonego w minutach pomiędzy grupami [250 (180-420) vs 240 (120-420);  $p=0,12$ ].

W przeprowadzonej analizie nie zaobserwowano istotnej różnicy w medianie długości snu wyrażonego w godzinach pomiędzy pacjentami z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym, a pacjentami u których nie rozpoznano tego nowotworu [7 (6-8) vs 7 (6-7);  $p=0,87$ ].

W badaniu nie ujawniono różnic w nawykach żywieniowych pomiędzy grupą badawczą a kontrolną. Częstość spożywania owoców cytrusowych, warzyw, mięsa, ryb jak i picia kawy w grupie pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry nie różniła się istotnie od częstości ich spożywania w grupie osób zdrowych [owoce cytrusowe (powyżej 2xdziennie) 18,89% vs 20,00%,  $p=0,85$ ; warzywa (powyżej 2xdziennie) 19,80% vs 28,71%,  $p=0,14$ ; mięso (powyżej 3xtydzień) 72,28% vs 82,18%,  $p=0,09$ ; ryby (powyżej 2xtydzień) 21,78% vs 13,86%,  $p=0,14$ ; kawa (powyżej 2 filiżanek na dobę) 13,86% vs 22%,  $p=0,13$ ]. Ponadto w badaniu nie wykazano istotnych różnic między odsetkiem osób palących papierosy obecnie bądź w przeszłości (39,60% vs 37,62%,  $p=0,77$ ) oraz częstością spożywania alkoholu (częściej niż sporadycznie) pomiędzy grupami (23,76% vs 24,75%,  $p=0,87$ ).

Natomiast wykazano istotną różnicę pomiędzy odsetkiem osób korzystających z solarium (obecnie lub w przeszłości) w grupie badawczej i kontrolnej. Odsetek osób które korzystały z solarium był istotnie wyższy w grupie pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry, w porównaniu do osób zdrowych (35,64% vs 14,85%,  $p<0,001$ ). Co więcej, stwierdzono istotną różnicę pomiędzy odsetkiem wystąpienia poparzeń słonecznych pomiędzy grupami. Pacjenci z czerniakiem znacznie częściej deklarowali wystąpienie poparzenia słonecznego w porównaniu do pacjentów bez rozpoznanego czerniaka złośliwego skóry (64,36% vs 11,88%,  $p<0,001$ ).

Badane grupy natomiast nie różniły się istotnie pomiędzy sobą w odsetku narażenia na czynniki szkodliwe w miejscu pracy, takie jak: przewlekły stres (58,42% vs 58,42%,  $p=1$ ); niską temperaturę (3,96% vs 2,97%,  $p=0,70$ ); wysoką temperaturę (5,94% vs 5,94%,  $p=1$ ); metale ciężkie/zanieczyszczenie powietrza/dioksyny/dym papierosowy (5,94% vs 8,91%,  $p=0,42$ ); promieniowanie jonizujące (1,98% vs 5,94%,  $p=0,15$ ); pestycydy/inne chemikalia (5,94% vs 11,88%,  $p=0,14$ ) a także częste narażenie na promieniowanie słoneczne (4,95% vs 5,94%,  $p=0,76$ ).

Badanie nie wykazało obecności istotnych różnic pomiędzy grupami w częstości występowania innych chorób przewlekłych, jak np. choroby układu krążenia (39,60% vs 37,62%,  $p=0,77$ ). Natomiast wykazano, że pacjenci z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry istotnie częściej oceniali swój stan zdrowia jako zły bądź średni w porównaniu z grupą kontrolną (7,92% vs 0%,  $p=0,004$ ).

Otrzymane wyniki zostały zaprezentowane zostały w tabeli 2.

Tabela 2: Styl życia – porównanie badanych grup.

	Grupa badawcza	Grupa kontrolna	Wartość p
Odsetek i liczba pacjentów uprawiających sport >2xtygodniu	45,54% N=46	54,46% N=55	p*=0,21
Odsetek i liczba pacjentów uprawiających jakikolwiek sport	58,42% N=59	68,32% N=69	p*=0,14
Odsetek i liczba pacjentów spożywających owoce cytrusowe >2xtygodniu	18,89% N=19	20,00% N=20	p*=0,85
Odsetek i liczba pacjentów spożywających warzywa >2xtygodniu	19,80% N=20	28,71% N=29	p*=0,14
Odsetek i liczba pacjentów spożywających mięso >3xtygodniu	72,28% N=73	82,18% N=83	p*=0,09
Odsetek i liczba pacjentów spożywających ryby >2xtygodniu	21,78% N=22	13,86% N=14	p*=0,09
Odsetek i liczba pacjentów spożywających kawę >2 filiżanki na dobę	13,86% N=14	22,00% N=22	p*=0,13
Odsetek i liczba pacjentów palących papierosy (obecnie bądź w przeszłości)	39,60% N=40	37,62% N=38	p*=0,77
Odsetek i liczba pacjentów spożywających alkohol częściej niż sporadycznie	23,76% N=24	24,75% N=25	p*=0,87
Odsetek i liczba pacjentów korzystających z solarium (obecnie bądź w przeszłości)	35,64% N=36	14,85% N=15	<b>p*&lt;0,001</b>
Odsetek i liczba pacjentów którzy przynajmniej raz w życiu doświadczyli oparzenia słonecznego	64,36% N=65	11,88% N=12	<b>p*&lt;0,001</b>
Odsetek i liczba pacjentów narażonych na przewlekły stres w miejscu pracy	58,42% N=59	58,42% N=59	p*=1

Odsetek i liczba pacjentów narażonych na niską temperaturę w miejscu pracy	3,96% N=4	2,97% N=3	p*=0,70
Odsetek i liczba pacjentów narażonych na wysoką temperaturę w miejscu pracy	5,94% N=6	5,94% N=6	p*=1
Odsetek i liczba pacjentów narażonych na metale ciężkie/zanieczyszczenie powietrza/dioksyny/dym papierosowy w miejscu pracy	5,94% N=6	8,91% N=9	p*=0,42
Odsetek i liczba pacjentów narażonych na promieniowanie jonizujące w miejscu pracy	1,98% N=2	5,94% N=6	p*=0,15
Odsetek i liczba pacjentów narażonych na pestycydy/inne chemikalia w miejscu pracy	5,94% N=6	11,88% N=12	p*=0,14
Odsetek i liczba pacjentów narażonych na częste promieniowanie słoneczne w miejscu pracy	4,95% N=5	5,94% N=6	p*=0,76
Odsetek i liczba pacjentów z chorobami krążenia	39,60% N=40	37,62% N=38	p*=0,77
Odsetek i liczba pacjentów oceniających swój stan zdrowia jako zły bądź średni	7,92% N=8	0 % N=0	<b>p*=0,004</b>
Mediana czasu spędzonego na siedzeniu wyrażony w minutach (Q1-Q4)	250 (180-420)	240 (120-420)	p**=0,12
Mediana długości snu wyrażona w godzinach (Q1-Q4)	7 (6-8)	7 (6-7)	p**=0,87

\*test Chi2 (istotność dokładna dwustronna)

\*\* test Manna-Whitneya

#### 4.3 Cechy progresywne wyglądu – charakterystyka badanej populacji.

Wśród pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem skóry najczęściej występującym typem skóry wg skali Fitzpatricka był fototyp II (77,23 %), następnie fototyp III (12,87%) i fototyp I (9,9%). Częstość występowania fototypu II oraz III nie różniła się istotnie pomiędzy pacjentami z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry i u pacjentów u których nie zdiagnozowano tego typu nowotworu [fototyp II: 77,23% vs 62,38%,  $p=0,067$ ; fototyp III: 12,87% vs 10,89%,  $p=0,35$ ]. Natomiast w grupie badawczej fototyp I występował istotnie częściej niż w grupie kontrolnej (9,90% vs 0,99%,  $p=0,005$ ).

W badaniu nie wykazano istotnej różnicy w medianie roku życia w którym pacjenci zaobserwowali pierwsze oznaki siwienia pomiędzy grupą badawczą a kontrolną [40 (35-48) vs 40 (35-50);  $p=0,86$ ]. Natomiast pacjenci z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry istotnie częściej charakteryzowali się nasilonym oraz ciężkim stopniem zaawansowania fotostarzenia skóry twarzy wg skali Glogau w porównaniu do osób zdrowych (51,49% vs 25,74%,  $p<0,001$ ). Ponadto pacjenci z rozpoznaniem czerniakiem istotnie częściej charakteryzowali się występowaniem głębokich zmarszczek na czole (59,41% vs 21,00%,  $p<0,001$ ), głębokich bruzd nosowo-wargowych (51,49% vs 25,00%,  $p<0,001$ ) oraz znacznym opadaniem powiek (74,26% vs 25,00%,  $p<0,001$ ) w porównaniu do osób zdrowych. Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic pomiędzy grupami w odsetku występowania głębokich zmarszczek nad ustami (4,95% vs 4,00%,  $p=0,29$ ) oraz głębokich „kurzych łapek” (27,72% vs 14,00%,  $p=0,06$ ).

Co więcej w przeprowadzonym badaniu zaobserwowano, że w grupie pacjentów z czerniakiem w porównaniu do grupy kontrolnej istotnie częściej na skórze twarzy występowały liczne (>10) plamy soczewicowate (47,5% vs 10,9 %,  $p<0,001$ ) oraz teleangiektazje (88,12 % vs 39,6%,  $p<0,001$ ).

W niniejszej analizie nie wykazano istotnie statystycznej różnicy pomiędzy grupami w medianie wysokości ciała (167 (163-174) vs 167 (161-174);  $p=0,8$ ), natomiast pacjenci z czerniakiem charakteryzowali się istotnie wyższą medianą masy ciała (73 (66-87) vs 71 (63-80);  $p=0,038$ ) w porównaniu do pacjentów zdrowych (tabela 3).

Tabela 3: Cechy progresywne wyglądu – porównanie badanych grup.

	Grupa badawcza	Grupa kontrolna	Wartość p
Odsetek i liczba pacjentów z fototypem I	9,90% N=10	0,99% N=1	<b>p*=0,005</b>
Odsetek i liczba pacjentów z fototypem II	77,23% N=78	62,38% N=63	p*=0,067
Odsetek i liczba pacjentów z fototypem III	12,87% N=13	10,89% N=11	p*=0,35
Odsetek i liczba pacjentów charakteryzujących się nasilonym oraz ciężkim stopniem fotostarzenia wg skali Glogau	51,49% N=52	25,74% N=26	<b>p*&lt;0,001</b>
Odsetek i liczba pacjentów charakteryzujących się występowaniem głębokich zmarszczek na czole	59,41% N=60	21,00% N=21	<b>p*&lt;0,001</b>
Odsetek i liczba pacjentów charakteryzujących się występowaniem głębokich bruzd nosowo-wargowych	51,49% N=52	25,00% N=25	<b>p*&lt;0,001</b>
Odsetek i liczba pacjentów charakteryzujących się znacznym opadaniem powiek	74,26% N=75	25,00% N=25	<b>p*&lt;0,001</b>
Odsetek i liczba pacjentów charakteryzujących się występowaniem głębokich zmarszczek nad ustami	4,95% N=5	4,00% N=4	p*=0,29
Odsetek i liczba pacjentów charakteryzujących się występowaniem głębokich „kurzych łapek”	27,72% N=28	14,00% N=14	p*=0,06

Odsetek i liczba pacjentów charakteryzujących się występowaniem licznych (>10) plam soczewicowatych	47,5% N=48	10,90% N=11	<b>p*&lt;0,001</b>
Odsetek i liczba pacjentów charakteryzujących się występowaniem licznych teleangiektazji	88,12% N=89	39,60% N=40	<b>p*&lt;0,001</b>
Mediana roku życia w którym pacjenci zauważyli pierwsze oznaki siwienia (Q1-Q4)	40 (35-48)	40 (35-50)	p**=0,86
Mediana wysokości ciała pacjentów wyrażona w cm (Q1-Q4)	167 (163-174)	167 (161-174)	p**=0,80
Mediana wagi ciała pacjentów wyrażona w kg (Q1-Q4)	73 (66-87)	71 (63-80)	<b>p**=0,038</b>

\*test Chi2 (istotność dokładna dwustronna)

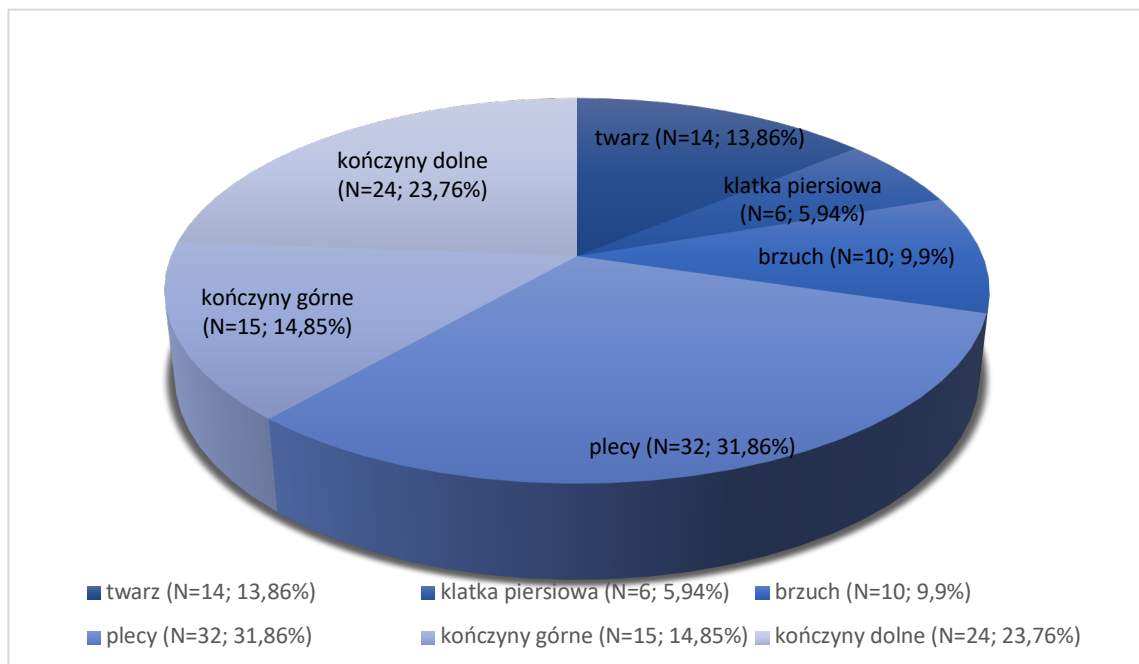
\*\* test Manna-Whitneya

4.4 Ogólna charakterystyka grupy badawczej uwzględniająca szczegóły dotyczące zdiagnozowanego czerniaka złośliwego skóry.

Wśród pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry u 14 pacjentów pierwotną lokalizacją była twarz (13,86%), u 6 klatka piersiowa (5,94%), u 10 brzuch (9,9%), u 32 plecy (31,68%), u 15 kończyny górne (14,85%), natomiast u 24 pacjentów pierwotną lokalizacją były kończyny dolne (23,76%) (wykres 2).



Wykres 2.



Lokalizacja zdiagnozowanych czerniaków skóry u pacjentów wraz z określoną liczbą pacjentów (N) oraz rozkładem procentowym.

U kobiet czerniak był najczęściej diagnozowany na kończynach dolnych (33,33%), natomiast u mężczyzn na plecach (37,14%). Najczęściej rozpoznany podtypem histomorfologicznym był czerniak szerzący się powierzchownie (67 pacjentów, 66,34%); następnie wywodzący się z plamy soczewicowatej (15 pacjentów, 14,85%), in situ (8 pacjentów, 7,92%), guzkowy (3 pacjentów, 2,97%) i akralny (2 pacjentów, 1,98%). U 5 pacjentów (4,95%) w badaniu histopatologicznym nie został określony podtyp czerniaka. U 10 pacjentów (9,9%) były obecne przerzuty do węzłów chłonnych, natomiast u 5 (4,95%) były one dodatkowo obecne w narządach wewnętrznych. U 3 pacjentów (2,97%) występował dodatni wywiad rodzinny (jako definicję dodatniego wywiadu rodzinnego przyjęto występowanie czerniaka u dwóch lub więcej krewnych pierwszego stopnia).

W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono istotnych różnic w medianie wieku rozpoznania czerniaka złośliwego skóry pomiędzy pacjentami u których wykryto czerniaka na twarzy i w innej lokalizacji [63 (45-65) vs 51 (41-63);  $p=0,18$ ]. Nie stwierdzono również istotnych różnic w medianie wieku pomiędzy pacjentami u których czerniaka wykryto odpowiednio na plecach, brzuchu, klatce piersiowej, kończynach górnych, kończynach dolnych i w innej lokalizacji [plecy: 57 (41,5-63) vs 52 (41-65),  $p=0,96$ ; brzuch: 44,5 (30-78) vs 56 (41-65),  $p=0,4$ ; klatka piersiowa: 68 (41-68) vs 52 (41-64),  $p=0,24$ ; kończyny górne: 56,5 (41-65) vs 51 (40-59),  $p=0,35$ ; kończyny dolne: 49 (37-61) vs 57 (41-65),  $p=0,3$ ].

Ponadto nie stwierdzono istotnych różnic w medianie wieku rozpoznania czerniaka złośliwego skóry pomiędzy pacjentami u których stwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych w porównaniu do pacjentów bez tych przerzutów [47 (39-57) vs 54 (41-65);  $p=0,36$ ]. Podobne nieistotne wyniki uzyskano pomiędzy pacjentami u których stwierdzono przerzuty do narządów wewnętrznych i u których nie zostały one wykryte [45 (39-48) vs 55 (41-65);  $p=0,31$ ].

W przeprowadzonych analizach nie wykazano korelacji pomiędzy zaawansowaniem czerniaka określonego głębokością naciekania skóry w milimetrach (klasyfikacja według Breslow) a wiekiem pacjentów ( $p=0,26$   $R=-0,11$ ). Brak istotnej korelacji zaobserwowano również pomiędzy głębokością naciekania skóry wg skali Breslow a wiekiem pacjentów w którym zdiagnozowano czerniaka złośliwego skóry ( $p=0,12$ ,  $R=-0,16$ ).

W badaniu nie zaobserwowano istotnej różnicy w medianach wartości skali Breslow pomiędzy pacjentami płci żeńskiej i męskiej [0,6 (0,4-1) vs 0,7 (0,37-0,88);  $p=0,92$ ]. Mediany głębokości naciekania skóry przez czerniaka wg skali Breslow również nie różniły się istotnie pomiędzy pacjentami z wyższym wykształceniem i bez wyższego wykształcenia [0,65 (0,4-0,95) vs 0,7 (0,35-1);  $p=0,8$ ]. Pacjenci z przerzutami do węzłów chłonnych charakteryzowali się natomiast wyższą medianą grubości zmiany (wg skali Breslowa), w porównaniu do pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych (1 (0,8-1,2) vs 0,6 (0,35-0,9);  $p=0,006$ ). Podobne wyniki zaobserwowano wśród pacjentów z przerzutami do narządów wewnętrznych oraz bez przerzutów (1 (1-1) vs 0,6 (0,39-0,93);  $p=0,04$ ).

W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowano istotnej różnicy w medianach głębokości naciekania skóry przez czerniaka wg klasyfikacji Breslow pomiędzy pacjentami u których czerniaka zdiagnozowano na twarzy i na pozostałych częściach ciała [0,5 (0-1,2) vs 0,7 (0,4-1);  $p=0,37$ ]. Nie stwierdzono również istotnej różnicy w medianach grubości czerniaka zlokalizowanego odpowiednio na plecach [0,53 (0,35-0,8) vs 0,7 (0,4-1);  $p=0,31$ ], klatce piersiowej [0,55 (0,3-0,8) vs 0,7 (0,4-1);  $p=0,62$ ], brzuchu [0,5 (0,3-0,85) vs 0,7 (0,4-1);  $p=0,4$ ], kończynach górnych [0,7 (0,5-1,2) vs 0,7 (0,35-1);  $p=0,35$ ], kończynach dolnych [0,7 (0,4-1,1) vs 0,6 (0,35-0,9);  $p=0,14$ ] i w innej lokalizacji.

Ponadto w przeprowadzonych analizach nie wykazano różnic w medianach grubości czerniaka (wg skali Breslow) pomiędzy pacjentami u których zdiagnozowano czerniaka szerzącego się powierzchownie a pozostałymi typami histomorfologicznymi (0,6 (0,4-1) vs 0,7 (0,3-1);  $p=0,85$ ). Nie przeprowadzono analiz porównujących mediany głębokości naciekania czerniaka wg Breslowa pomiędzy poszczególnymi typami histomorfologicznymi czerniaka z uwagi na dysproporcje w liczebności grup, gdyż otrzymane wówczas wyniki byłyby niemiernodajne. W tabeli 4 podano liczbę przypadków, średnie, odchylenie standardowe, mediany oraz skrajne

kwartyle (Q1-Q4) grubości naciekania skóry wg Breslowa poszczególnych typów histologicznych czerniaka.

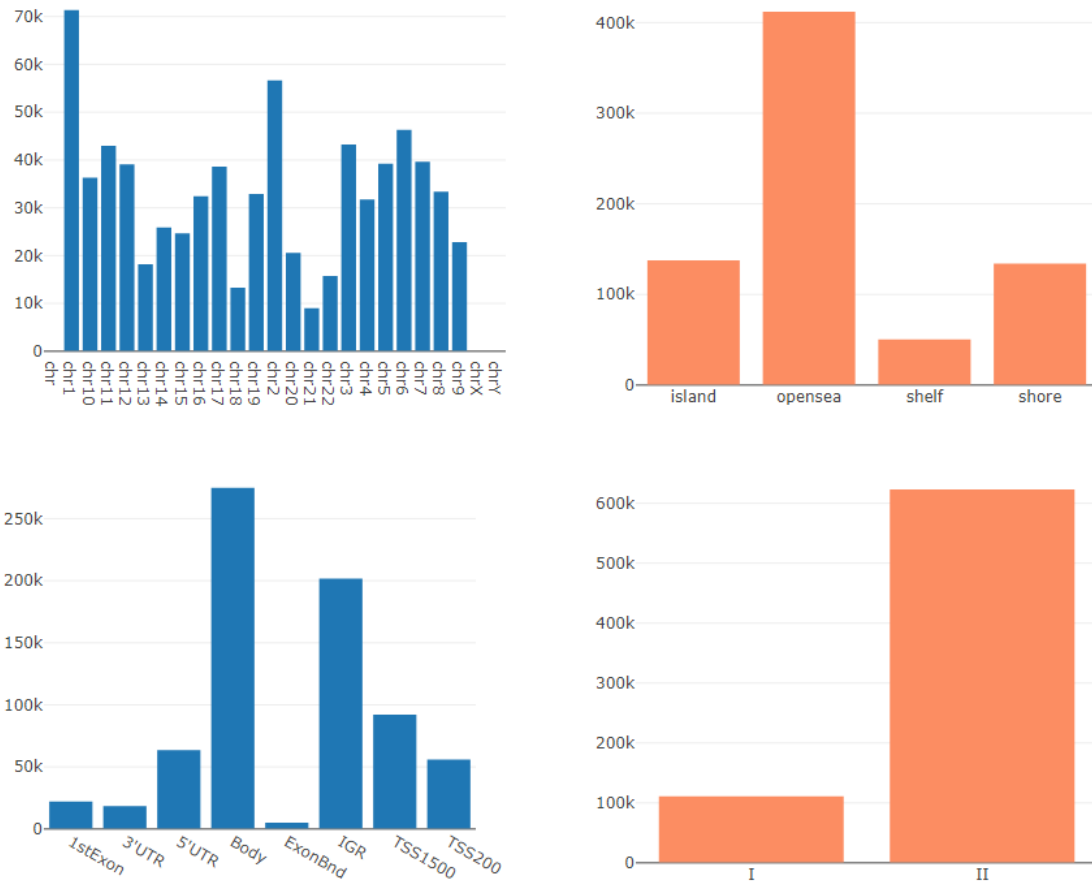
Tabela 4. Statystyka opisowa grubości naciekania skóry wg skali Breslowa poszczególnych typów histologicznych czerniaka.

Typ histomorfologiczny czerniaka	Liczba przypadków	Średnia głębokości naciekania w mm (+/- SD)	Mediana głębokości naciekania w mm (Q1-Q4)
Czerniak szerzący się powierzchownie	67	0,85 +/-1,02	0,6 (0,4-1)
Czerniak guzkowy	3	2,57 +/-1,72	2,0 (1,2-4,5)
Czerniak akralny	2	1,35 +/-0,49	1,35 (1-1,7)
Czerniak wywodzący się z plamy soczewicowatej	15	0,42 +/-0,4	0,3 (0-0,8)
Czerniak in situ	8	-	-
Czerniak o nieznanym podtypie histologicznym	5	0,76 +/-0,37	0,75 (0,5-0,9)

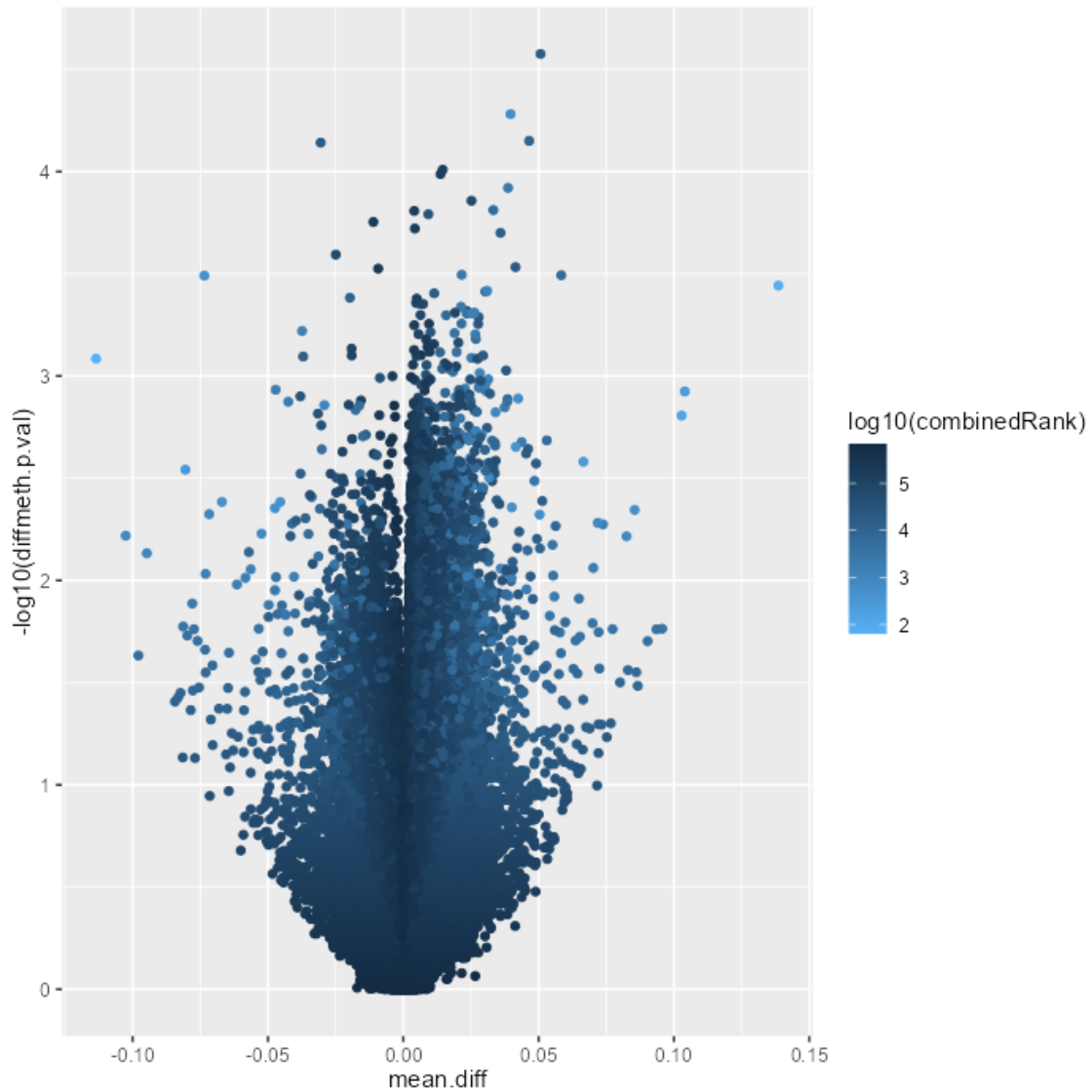
#### 4.5 Ocena wpływu czynników zewnętrznych na metylację DNA (analiza EWAS)

Przeprowadzona analiza nie wykazała różnic istotnych statystycznie w poziomie metylacji pomiędzy analizowanymi grupami, przy zastosowaniu korekty na testy wielokrotne ( $P < 9 \cdot 10^{-8}$ ) (wykres 3 i 4). Korekta na testy wielokrotne została zastosowana celem uniknięcia wykrycia fałszywie dodatnich pozycji. Zastosowanie progu istotności ( $P < 1.0 \times 10^{-5}$ ) obrazującego trend asocjacji pozwoliło na identyfikację 70 zasocjowanych pozycji.

Wykres 3. Przegląd CpG użytych do analizy: liczba CpG na chromosom, typy CpG, pozycja w genomie i dwa typy sond stosowanych do badania CpG.



Wykres 4. Wykres punktowy typu wulkan (Volcano plot) przedstawiający zróżnicowany poziom metylacji próbek. Różnice w średnich metylacji pomiędzy grupą badawczą a kontrolną zostały przedstawione na osi x; logarytmicznie przekształcone wartości nieskorygowanego p zostały przedstawione na osi y.



## 4.6 Ocena wieku biologicznego badanej populacji

### 4.6.1 Porównanie wieku biologicznego pomiędzy grupą badawczą i kontrolną

Wiek epigenetyczny dla analizowanej populacji wyznaczono za pomocą zegara Horvath 2013, Skin&BloodClock, zegara Hannum, PhenoAge, GrimAge, Telomere Length, parametru tempa starzenia się PoAm i epigenetycznego wskaźnika ryzyka śmiertelności MRS Zhang (5,81,83–85). Dla każdego z zegarów oszacowano parametr przyspieszenia epigenetycznego zgodnie z opisaną w MM metodologią.

Średnia wartość wieku epigenetycznego uzyskanego za pomocą każdego kalkulatora została pokazana w tabeli 5.

Tabela 5. Średnia wartość wieku epigenetycznego uzyskanego dla każdego kalkulatora

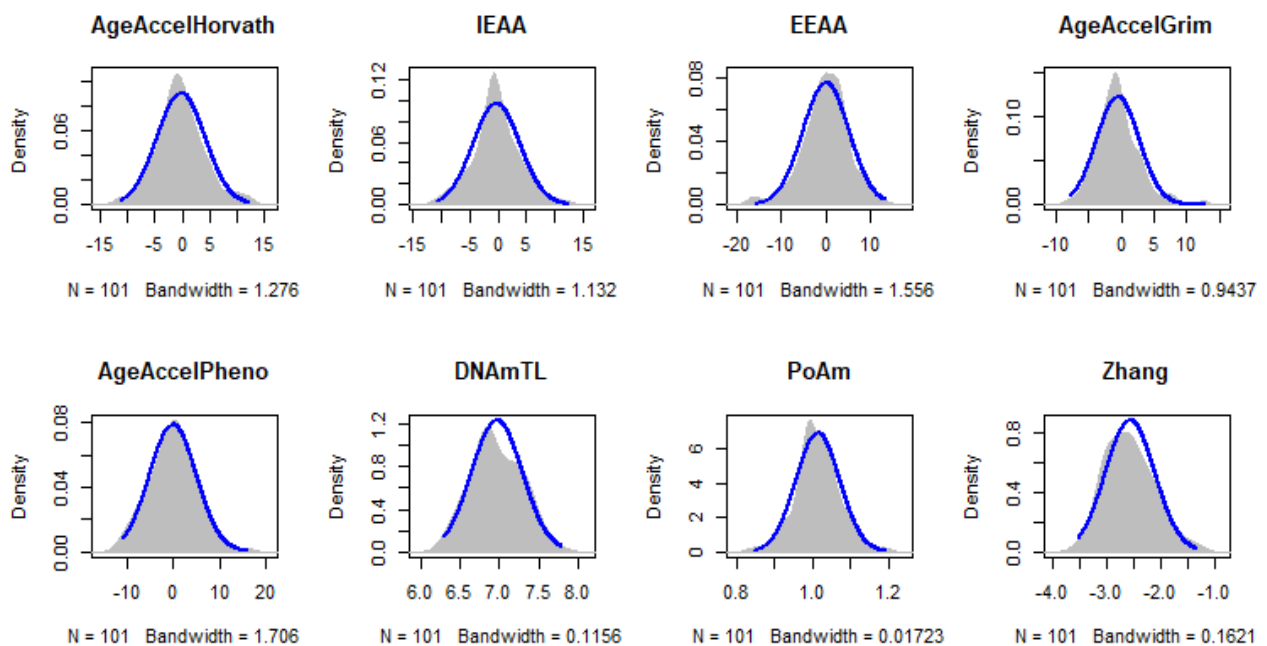
<b>Grupa</b>	<b>HorvathAge</b>	<b>HannumAge</b>	<b>PhenoAge</b>	<b>GrimAge</b>	<b>DNAmTL</b>	<b>PoAm</b>	<b>Zhang</b>
Badawcza	54.33	46.78	46.11	58.59	6.97	1.01	3.93
Kontrolna	54.43	46.59	45.83	59.26	6.94	1.03	4.42

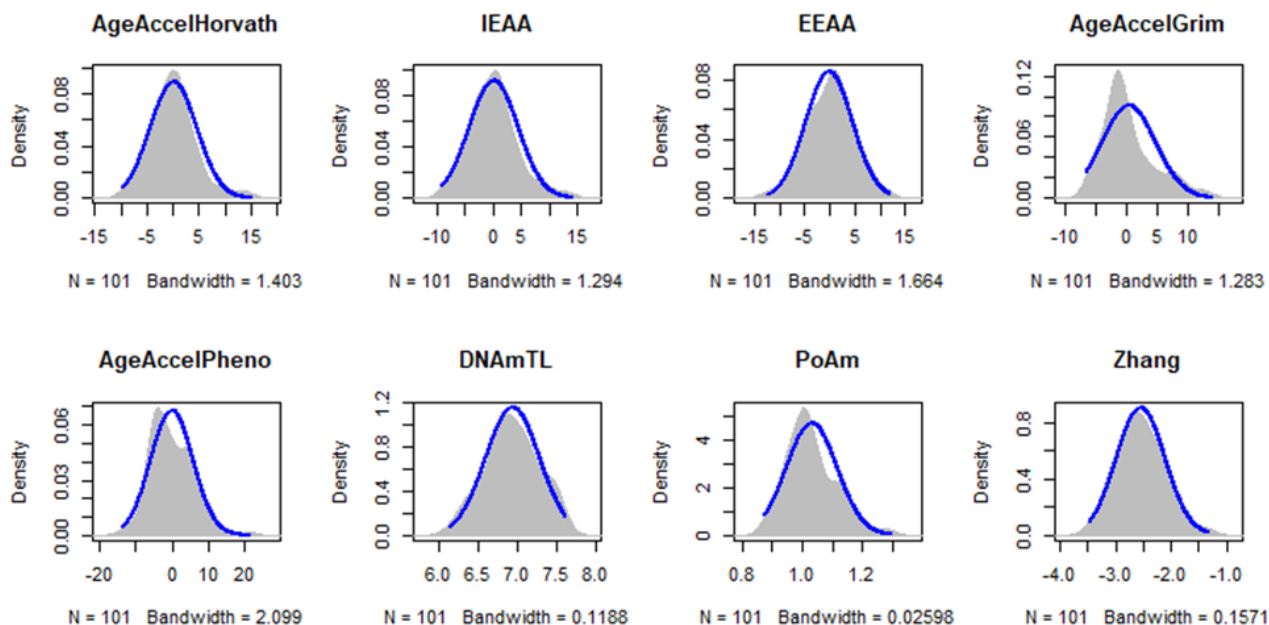
W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowano istotnych różnic w średnich wieku epigenetycznego i w zakresie parametrów przyspieszenia wieku pomiędzy grupami (tabela 6, wykres 5 i 6).

Tabela 6. Porównanie parametrów określających tempo epigenetycznego starzenia się oznaczonego za pomocą różnych kalkulatorów pomiędzy grupą badawczą i kontrolną.

Model	t	p*
HorvathEAA	0.49	0.62
IEAA	0.68	0.49
EEAA	0.21	0.83
PhenoAgeAccel	0.07	0.94
DNAmTL	0.58	0.56
GrimAgeAccel	1.60	0.11
PoAm	1.74	0.08
Zhang	0.27	0.78

\* - test t-studenta





Wykres 6. Wykres gęstości dla wartości EAA dla grupy kontrolnej przedstawiający ich rozkład normalny będący podstawą do zastosowania testu t.

#### 4.6.2 Analiza wieku wyselekcjonowanych podgrup spośród grupy badawczej

##### 4.6.2.1 Analiza wieku biologicznego oraz EAA po uwzględnieniu stopnia zaawansowania czerniaka.

Biorąc pod uwagę stopień zaawansowania guza, całość badanej populacji podzielono na 4 grupy: kontrolną, z czerniakiem in situ, z czerniakiem inwazyjnym oraz z czerniakiem przerzutowym. Analiza podgrup w tym zakresie wykazała istotną różnicę w średniej wartości parametru tempa starzenia się PoAm pomiędzy czerniakiem inwazyjnym vs grupą kontrolną (1,01 +/- 0,06 vs 1,03 +/- 0,08; t = 2,05; p = 0,04)

Analizę wieku epigenetycznego oraz EAA przeprowadzono także tylko dla wyselekcjonowanych podgrup pacjentów z rozpoznaniem czerniaka złośliwego skóry, tj. po podziale na 3 podgrupy uwzględniając stopień zaawansowania guza (czerniak in situ, czerniak inwazyjny, czerniak z obecnymi przerzutami). W przeprowadzonym badaniu nie



zaobserwowano istotnych różnic w średnich wieku epigenetycznego uzyskanych za pomocą każdego rodzaju zegara pomiędzy podgrupami (tabela 7).

Tabela 7. Porównanie wieku biologicznego oznaczonego za pomocą różnych kalkulatorów pomiędzy podgrupami uwzględniając zaawansowanie MM.

Grupa	In Situ vs czerniak przerzutowy			In Situ vs czerniak inwazyjny			Czerniak przerzutowy vs inwazyjny		
	Średnia (SD)	t	p*	Średnia (SD)	t	p*	Średnia (SD)	t	p*
IEAA	0.48(3.12)	0.47	0.64	0.48(3.12)	0.59	0.57	-0.62(6.47)	0.19	0.85
	-0.62(6.47)			-0.22(3.90)			-0.22(3.90)		
EEAA	-0.86(6.96)	0.29	0.77	-0.86(6.96)	0.41	0.69	0.11(7.10)	0.02	0.98
	0.11(7.10)			0.16(4.85)			0.16(4.85)		
HorvathEAA	0.33(3.61)	0.47	0.64	0.33(3.61)	0.33	0.75	-0.80(6.46)	0.32	0.75
	-0.80(6.46)			-0.12(4.22)			-0.12(4.22)		
PhenoAgeaccel	2.95(3.79)	0.92	0.37	2.95(3.79)	2.27	0.05	0.65(6.70)	0.45	0.66
	0.65(6.70)			-0.33(4.92)			-0.33(4.92)		
GrimAgeAgeaccel	1.23(3.41)	1.18	0.26	1.23(3.41)	1.44	0.18	-0.48(2.52)	0.12	0.91
	-0.48(2.52)			-0.59(3.30)			-0.59(3.30)		
PoAm	1.04(0.04)	0.60	0.56	1.04(0.04)	1.79	0.10	1.03(0.05)	0.91	0.38
	1.03(0.05)			1.01(0.06)			1.01(0.06)		
Zhang	-2.56(0.58)	0.43	0.67	-2.56(0.58)	0.07	0.95	-2.67(0.40)	0.87	0.40
	-2.67(0.40)			-2.55(0.45)			-2.55(0.45)		
DNAmTL	-0.03(0.11)	0.62	0.54	-0.03(0.11)	1.47	0.17	-0.08(0.22)	1.55	0.15
	-0.08(0.22)			0.03(0.17)			0.03(0.17)		

\* test t-studenta

#### 4.6.2.2 Analiza wieku biologicznego oraz EAA po uwzględnieniu typów histomorfologicznych czerniaka.

Ponadto próbki zostały przeanalizowane po uwzględnieniu typów histomorfologicznych MM, tj:

1. czerniaka szerzącego się powierzchownie
2. czerniaka guzkowego

3. czerniaka akralnego
4. czerniaka wywodzącego się z plamy soczewicowatej
5. czerniaka in situ

W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano istotne różnice w średnich parametrów przyspieszenia wieku epigenetycznego oznaczonego za pomocą GrimAgeAccel pomiędzy czerniakiem guzkowym i akralnym (0,24 +/- 1,57 vs -4,35 +/- 0,17 ; t = 5,03; p = 0,034); czerniakiem akralnym i czerniakiem wywodzącym się z plamy soczewicowatej (-4,35 +/- 0,17 vs -1,41 +/- 2,85; t = -3,95; p = 0,001); czerniakiem akralnym i czerniakiem in situ (-4,35 +/- 0,17 vs 1,23 +/- 4,31; t = -4,60; p = 0,002). Ponadto zaobserwowano istotną różnicę w średnich wieku epigenetycznego oznaczonego za pomocą DNAmTL pomiędzy czerniakiem szerzącym się powierzchownie a czerniakiem wywodzącym się z plamy soczewicowatej (-0,04 +/- 0,16 vs 0,06 +/- 0,17; t = 4,5686; p<0,001), a także w średnich EEAA pomiędzy czerniakiem guzkowym i wywodzącym się z plamy soczewicowatej (5,64 +/- 2,50 vs -1,11 +/- 6,03; t = 3,1794, wartość p = 0,013).

#### *4.6.2.3 Analiza wieku biologicznego oraz EAA po uwzględnieniu lokalizacji czerniaka.*

W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano istotne różnice w średnich wartościach przyspieszenia wieku epigenetycznego oznaczonego za pomocą GrimAgeAccel pomiędzy czerniakiem zlokalizowanym na plecach i klatce piersiowej (-0,12 +/- 3,38 vs -2,54 +/- 1,84; t= 2,49; p = 0,027); czerniakiem zlokalizowanym na klatce piersiowej i brzuchu (-2,54 +/- 1,84 vs 0,49 +/- 3,65; t = -2,28; p= 0,037), a także pomiędzy czerniakiem zlokalizowanym na klatce piersiowej i kończynach górnych (-2,54 +/- 1,84 vs 0,75 +/- 2,73; t= -3,10; p = 0,008). Natomiast po podziale na 2 podgrupy uwzględniając lokalizację czerniaka na twarzy i pozostałe lokalizacje w przeprowadzonym badaniu zaobserwowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy średnimi wartościami parametru DNAmTL (0,09 +/- 0,13 vs -0,01 +/- 0,18; p=0,03). Wiek epigenetyczny i parametry przyspieszenia wieku epigenetycznego oznaczone za pomocą innych zegarów biologicznych nie różniły się istotnie pomiędzy tymi dwoma podgrupami (tabela 8).

Tabela 8. Porównanie wieku biologicznego oznaczonego za pomocą różnych kalkulatorów pomiędzy podgrupami uwzględniając lokalizację MM.

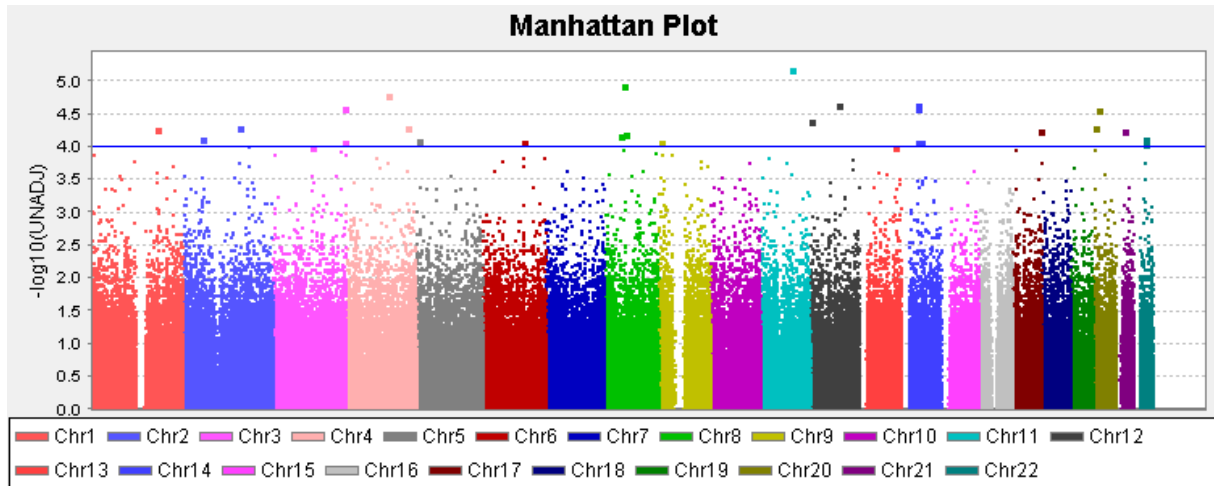
Lokalizacja czerniaka	Twarz vs. Inna lokalizacja		
Model	Średnia (SD)	t	p*
IEAA	-0.27(3.34)	0.18	0.86
	-0.08(4.34)		
EEAA	0.08 (5.22)	0.21	0.83
	0.40(4.86)		
HorvathEAA	-0.12(4.37)	0.19	0.85
	0.13(4.50)		
PhenoAgeaccel	-0.60(5.44)	0.67	0.51
	0.46(5.30)		
GrimAgeAgeaccel	-1.01(2.55)	1.36	0.18
	0.11(3.59)		
PoAm	1.01(0.05)	0.64	0.53
	1.02(0.06)		
Zhang	-2.44(0.37)	0.87	0.39
	-2.55(0.48)		
DNAmTL	0.09(0.13)	2.25	<b>0.03</b>
	-0.01(0.18)		

\* - test t-studenta

#### 4.7 Ogólnogenomowa analiza zmienności SNP badanej populacji (analiza GWAS)

Na podstawie zastosowanej analizy jakości danych SNP, wykluczono z dalszych analiz 2 przypadki. Jedna próbka (płci żeńskiej) z grupy kontrolnej została odfiltrowana ze względu na złą jakość macierzy GSA. Inna próbka męska (pochodząca z grupy kontrolnej) została odfiltrowana na podstawie progu pokrewieństwa 0,2. Filtrowanie ze względu na test HW, częstość alleli umożliwiło wyselekcjonowanie ostatecznej liczby 491244 pozycji polimorficznych SNP analizowanych w grupie 200 osób, w tym 101 pacjentów z grupy badawczej i 99 z grupy kontrolnej.

Przy zastosowaniu korekty na testy wielokrotne typu FDR (ang. False discovery rate)  $P < 5 \times 10^{-8}$ , nie zidentyfikowano żadnego istotnego SNP związanego z czerniakiem złośliwym skóry. Odnotowano asocjacje dla 23426 pozycji SNP przy progu istotności  $p < 5 \times 10^{-4}$ . Wykres Manhattan Plot powiązanych loci został przedstawiony na wykresie 7.



Wykres 7. Manhattan Plot przedstawiający uzyskane wyniki badania asocjacyjnego całego genomu. Warianty zmapowane na poszczególnym chromosomie zostały oznaczone oddzielnym kolorem i pokazane na osi x. Przekształcone logarymicznie wartości nieskorygowanych p, przedstawiające poziom istotności wyników badania porównawczego pomiędzy grupą badawczą i kontrolną zostały przedstawione na osi y. Niebieska linia obrazuje poziom istotności  $p < 5 \times 10^{-4}$

#### 4.8 Analiza zestawu literaturowych SNP

Analiza danych literaturowych wykazała, że liczba znanych pozycji SNP zasocjowanych z czerniakiem w populacji europejskiej wynosi 68 (95). Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy analizy wykazały, że wśród znanych markerów SNP wszystkie wykazują istotność w naszych danych (tj. pacjentów pochodzących z populacji polskiej) na poziomie  $p < 0.05$ .

## 5. Dyskusja

Częstość występowania nowotworów skóry na całym świecie rośnie z roku na rok w zatrważająco szybszym tempie w porównaniu z jakimkolwiek innym rodzajem nowotworu. Spośród wszystkich nowotworów skóry, czerniak złośliwy stanowi główną przyczynę zgonów (20). Sto lat temu czerniak skóry występował stosunkowo rzadko; w 1935 r. przez całe życie człowieka ryzyko rozwoju czerniaka wynosiło 1:500. Dla porównania, obecnie w populacji zachodniej szacuje się, że 1 osoba na 50 w przeciągu swojego życia zachoruje na czerniaka (103). Ponadto równie niepokojącym jest fakt, że w ciągu ostatnich lat wskaźniki śmiertelności także posiadają tendencję wzrostową (3).

Przyczyny skrajnego wzrostu zachorowań na czerniaka są tylko częściowo wyjaśnione. Jedną z przyczyn jest z pewnością zwiększona świadomość choroby i wczesne wykrycie; jednak nie tłumaczy to całości gwałtownego wzrostu przypadków czerniaka złośliwego skóry. Dokładniejsze poznanie czynników ryzyka zwiększających jego występowanie oraz ich prewencja są kluczowe w walce o zmniejszenie śmiertelności. Rozwój czerniaka jest złożonym procesem, wynikającym z interakcji pomiędzy genetyczną podatnością oraz narażeniem na czynniki zewnętrzne (103). Ryzyko indywidualne zachorowania na czerniaka jest zatem wieloczynnikowe, zależne od występowania wrodzonych mutacji genowych, obecności polimorfizmów genowych, a także ekspozycji na czynniki zewnętrzne, mogących powodować zmiany epigenetyczne i w ten sposób modyfikować ryzyko zachorowania na czerniaka złośliwego (2). W ostatnich latach opisano szereg genów związanych z czerniakiem. Dzięki sekwencjonowaniu nowej generacji i analizie dużych zbiorów danych, poziom wiedzy na temat patogenezы czerniaka jest dynamiczny i wciąż ulega rozwojowi. Badania prowadzone na poziomie epigenomu częściowo wykazały swoją rolę w rozwoju czerniaka skóry, chociaż pełne zrozumienie onkogenezy jest nadal niejasne. Potrzebne są zatem dalsze badania epidemiologiczne, kliniczne i genetyczne, aby w pełni zrozumieć sposób dziedziczenia, rolę czynników środowiskowych w penetracji genów oraz znaczenie tych genów w rokowaniu pacjenta.

W niniejszej dysertacji doktorskiej podjęto próbę wytłumaczenia patogenezы czerniaka złośliwego skóry kilkietapowo, a zarazem kompleksowo obejmując ocenę wpływu czynników środowiskowych, epigenetycznych i genetycznych na rozwój czerniaka. Najpierw przeprowadzono podstawową analizę wpływu czynników zewnętrznych na rozwój czerniaka złośliwego poprzez porównanie dwóch grup: populacji u której rozpoznano czerniaka i populacji zdrowej. Następnie oceniono korelację między danymi metylacyjnymi i czynnikami

środowiskowymi a wystąpieniem czerniaka złośliwego skóry u pacjentów. Kolejnym etapem było określenie wieku epigenetycznego pacjentów z rozpoznaniem czerniaka skóry oraz ocena ich epigenetycznego tempa starzenia się. Poprzez ocenę wieku epigenetycznego zweryfikowano hipotezę czy nowotwory – w tym przypadku czerniak złośliwy skóry, a także czynniki środowiskowe (na które pacjenci z czerniakiem złośliwym byli i są ekspozycyjni) są skorelowane z wiekiem epigenetycznym. Określono również czy starzenie się skóry koreluje ze starzeniem się epigenetycznym. Ostatnim etapem była analiza genetyki pacjentów z czerniakiem złośliwym skóry, tj. analiza ogólnogenomowych danych SNP celem identyfikacji nowych, dotychczas nieznanymi wariantów SNP zwiększających podatność na zachorowanie na czerniaka złośliwego. Ponadto oceniono predyspozycję genetyczną pacjentów z rozpoznaniem czerniaka złośliwego skóry biorących udział w badaniu pochodzących z polskiej populacji do rozwoju czerniaka poprzez weryfikację obecności dotychczas odkrytych zasocjowanych wcześniej z czerniakiem SNP w populacji europejskiej.

### 5.1 Dane demograficzne badanej populacji – omówienie

Badana grupa badawcza składała się z 101 pacjentów, a odsetek występowania czerniaka złośliwego skóry u płci żeńskiej był większy niż u płci męskiej (64,4% vs 35,6%). Dane dostępne w piśmiennictwie dotyczące, czy czerniak jest częstszy u kobiet czy mężczyzn niejednokrotnie dostarczają sprzeczne wyniki. W badaniu Martin-Gorgojo i in. (2017) również zaobserwowano, iż u kobiet czerniak występował częściej niż u mężczyzn, tj. 53,7% vs 46,3% (104). Natomiast w analizie O'Neill C. (2019) wykazano, że mężczyźni są około 1,5 raza bardziej narażeni na zachorowanie na czerniaka niż kobiety (105). Inne badania wskazują, że różną częstość występowania u obu płci należy analizować w zależności od wieku: tj. częstość występowania czerniaka w populacji europejskiej jest większa u kobiet niż mężczyzn do osiągnięcia 40 roku życia, natomiast w wieku 75 lat, zachorowalność jest prawie trzykrotnie wyższa u mężczyzn w porównaniu z kobietami (103). Wg ostatnich dostępnych danych z 2010r. w Polsce czerniak stanowi u mężczyzn około 1,7% zachorowań, natomiast u kobiet 1,9% zachorowań, co wynosi rocznie około 1200 przypadków u mężczyzn i 1350 u kobiet (3). Znacznie wyższy odsetek występowania czerniaka złośliwego skóry u kobiet obserwowany w niniejszym badaniu, może wynikać z faktu, iż pacjenci do grupy badawczej byli rekrutowani w

Gabinecie Wideodermatoskopii Poradni Dermatologicznej, w której chętniej pod stałą kontrolą znajdują się osoby płci żeńskiej, niż męskiej.

Model wiekowy zapadalności na czerniaka w niniejszym badaniu był podobny jak obserwowano w innych analizach. Średnia wieku w momencie rozpoznania czerniaka niezależnie od płci wynosiła 52,29 +/- 14,57, mediana 53 (41-65), natomiast u kobiet czerniaka rozpoznawano zwykle wcześniej niż u mężczyzn [średnia 48,95 +/- 14,56 vs 58,4 +/- 12,64; mediana 46 (39-59) vs 61 (48-68)]. Przeprowadzone dotychczas badania epidemiologiczne sugerują, że mediana wieku w chwili rozpoznania czerniaka złośliwego dla obu płci wynosi 57 lat. Analizując dane dotyczące zapadalności w zależności od płci, u płci żeńskiej zachorowalność wzrasta liniowo od 25. do 50. roku życia, a następnie maleje, podczas gdy u płci męskiej obserwuje się gwałtowny wzrost częstości występowania po 55 roku życia (4). Wzrost występowania czerniaka w młodszej grupie kobiet może być spowodowany częstszym korzystaniem z solarium, w porównaniu do grupy mężczyzn. Liczne prace również sugerują udział estrogenów w patogenezie czerniaka złośliwego skóry. Większość przeprowadzonych badań dotyczących wzrostu ryzyka czerniaka w ciąży (w którym obserwuje się wyższy poziom estrogenów), nie potwierdziły jednak zwiększonego ryzyka czerniaka, grubszego naciekania skóry wg skali Breslow, zwiększonego ryzyka przerzutów czy gorszego rokowania u kobiet w ciąży (106).

Spośród pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry 72,28% zamieszkiwało miasto, natomiast 27,72% pacjentów wskazało wieś jako swoje miejsce zamieszkania. Wyniki te nie różniły się istotnie w porównaniu do pacjentów u których nie rozpoznano czerniaka złośliwego skóry (odpowiednio 85,15% oraz 14,85%), co sugeruje że miejsce zamieszkania nie należy do czynników ryzyka występowania czerniaka złośliwego skóry.

Co ciekawe, w przeprowadzonym badaniu wykazano, że odsetek osób które posiadały wykształcenie wyższe (licencjackie/magisterskie) był istotnie niższy wśród osób z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry w porównaniu do osób zdrowych (53,47% vs 68,32%), natomiast status socjoekonomiczny nie był czynnikiem różnicującym obie grupy. Podobne wyniki uzyskano w badaniu przeprowadzonym w Stanach Zjednoczonych, gdzie osoby z wyższym wykształceniem (ale nie z wyższymi dochodami) również były mniej narażone na zachorowanie na czerniaka złośliwego skóry (107). Obserwacje te mogą odzwierciedlać zależność, że osoby z niższym poziomem wykształcenia są mniej świadome ryzyka zachorowania na czerniaka, a także mniej wyedukowane odnośnie czynników ryzyka nowotworów skóry, jak i metod ich zapobiegania.

## 5.2 Ekspozycja na czynniki środowiskowe badanej populacji – omówienie

W niniejszej dysertacji częściej jakikolwiek sport uprawiali pacjenci bez czerniaka złośliwego skóry w porównaniu do pacjentów z rozpoznany czerniakiem, natomiast wyniki te nie były istotne pod względem statystycznym (68,32 vs 58,42%). Nie wykazano także istotnych różnic pomiędzy grupami w odsetku częstości uprawianego sportu: 45,54% pacjentów z czerniakiem uprawiało sport dwa bądź więcej razy w tygodniu, natomiast wśród pacjentów bez czerniaka odsetek ten wynosił 54,46%. W badaniu nie zostały również zaobserwowane różnice w medianie czasu spędzonego na siedzeniu na dobę wyrażonego w minutach pomiędzy grupami [250 (180-420) vs 240 (120-420)]. W przeprowadzonym w 2018 roku przeglądzie systematycznym z metaanalizą, którego celem było przeanalizowanie związku pomiędzy aktywnością sportową a występowaniem czerniaka złośliwego skóry uzyskano sprzeczne wyniki (108). Badania kohortowe wykazały statystycznie istotny dodatni związek między dużą versus niską aktywnością fizyczną a ryzykiem czerniaka (RR = 1,27, 95% CI = 1,16-1,40). W przeciwieństwie do tego, badania kliniczno-kontrolne ujawniły statystycznie nieistotne ale mniejsze ryzyko zachorowania na czerniaka złośliwego skóry u pacjentów wykazujących się aktywnością fizyczną (RR = 0,85, 95% CI = 0,63-1,14.). Wyniki te można interpretować na dwa sposoby. Z jednej strony wzrost ryzyka zachorowania na czerniaka u pacjentów wykazujących dużą aktywność fizyczną można tłumaczyć faktem, że sportowcy uprawiający sporty na świeżym powietrzu otrzymują duże dawki promieniowania UV w związku z harmonogramami treningów i zawodów przy dużym nasłonecznieniu, a w sportach alpejskich z powodu wzrostu promieniowania UV związanego z wysokością nad poziomem morza i dodatkowo możliwością odbicia promieni UV od powierzchni pokrytych śniegiem i lodem. Ekstremalna ekspozycja na promieniowanie UV podczas uprawiania sportów na świeżym powietrzu, takich jak narciarstwo, alpinizm, jazda na rowerze lub triathlon, została udokumentowana w serii badań dozymetrycznych. Pocenie się spowodowane wysiłkiem fizycznym może przyczyniać się do uszkodzeń skóry związanych z promieniowaniem UV, ponieważ zwiększa indywidualną wrażliwość skóry na światło, zwiększając ryzyko oparzeń słonecznych. Duże badania epidemiologiczne wykazały, że zajęcia rekreacyjne, takie jak przebywanie na słońcu na plaży lub podczas uprawiania sportów wodnych, wiązały się ze zwiększonym ryzykiem raka podstawnokomórkowego, podczas gdy u narciarzy stwierdzono zwiększone ryzyko rozwoju raka płaskonabłonkowego. Ponadto stwierdzono, że czynniki ryzyka czerniaka skóry, takie jak liczba znamion melanocytowych i plam soczewicowatych, występują częściej u osób uprawiających sporty wytrzymałościowe na świeżym powietrzu



(109). Z drugiej strony pacjenci częściej uprawiający sport, mogą wykazywać się zdrowszym stylem życia i częstszymi zachowaniami prozdrowotnymi jak np. stosowaniem kremów ochronnych z filtrem bądź częstszym zgłaszaniem się do dermatologa na badanie profilaktyczne znamion melanocytowych, co może zmniejszać ryzyko wystąpienia czerniaka złośliwego skóry.

Ponadto w niniejszej pracy nie zaobserwowano istotnej różnicy w medianach czasu spania wyrażonego w godzinach pomiędzy grupami. Podobne wyniki zostały opublikowane w badaniu kohortowym przeprowadzonym przez Cohen J i in. (2015) na grupie 880 pacjentów z czerniakiem złośliwym skóry (110).

W przeprowadzonym badaniu nie ujawniono także różnic w nawykach żywieniowych pomiędzy grupą badawczą a kontrolną. Częstość spożywania owoców cytrusowych, warzyw, mięsa, ryb jak i picia kawy w grupie pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry nie różniła się istotnie od częstości ich spożywania w grupie osób zdrowych. Dostępne badania dotyczące roli czynników dietetycznych (np. przeciwutleniaczy, retinoidów, witaminy C i witaminy E) nie wykazały stałego wpływu diety na częstość występowania czerniaka (111,112). Opublikowane dotychczas badania obserwacyjne nie wyjaśniły także jednoznacznie roli wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFAs) w rozwoju czerniaka. Niedawno, w celu zbadania związku przyczynowego między poziomami PUFAs a ryzykiem czerniaka, Liyanage i in. (2018) przeprowadzili analizę randomizacji Mendla z wykorzystaniem 12 874 przypadków i 23 203 kontroli z największej metaanalizy badania asocjacyjnego obejmującego cały genom czerniaka. Ich wyniki wykazały, że wpływ zwiększonych poziomów PUFA na ryzyko czerniaka jest albo zerowy, albo bardzo mały (113).

Związek między spożyciem kawy i herbaty a czerniakiem jest kontrowersyjny. Warto zauważyć, że w wielu metaanalizach dużych badań obserwacyjnych stwierdzono ochronną rolę dla kawy z kofeiną, ale nie dla kawy bezkofeinowej (114–116). Proponowane mechanizmy działania kofeiny i innych związków bioaktywnych obecnych w zwykłej kawie w zapobieganiu czerniakowi opierają się na badaniach *in vitro* i na zwierzętach, ale pozostają nieudowodnione na ludziach (117,118). Metaanaliza z 2016 r., obejmująca dwa badania kliniczno-kontrolne i pięć badań kohortowych, w których uczestniczyło prawie 850 000 uczestników, wykazała niewielką odwrotną zależność między spożyciem kawy z kofeiną a występowaniem czerniaka, z łącznym ryzykiem względnym (RR) 0,81 (95% CI 0,68-0,97) (114). Badanie wykazało liniową zależność między ryzykiem czerniaka a poziomem spożycia kawy; ryzyko zostało zmniejszone o 4,5 procent dla jednej filiżanki kawy z kofeiną dziennie w porównaniu z brakiem spożycia. W analizie stratyfikowanej ochronne działanie kawy zawierającej kofeinę było

istotne u kobiet (RR 0,76, 95% CI 0,61-0,95), ale nie u mężczyzn (RR 1,11, 95% CI 0,91-1,36). Nie stwierdzono wpływu kawy bezkofeinowej. Późniejsza analiza danych z dużej kohorty z 10 krajów europejskich, w tym prawie 500 000 osób w wieku od 25 do 70 lat uczestniczących w badaniu European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), potwierdziła odwrotną zależność między spożywaniem kawy z kofeiną a czerniakiem (119). W tej analizie spożywanie kawy lub herbaty z kofeiną wiązało się ze zmniejszeniem ryzyka czerniaka wśród mężczyzn, ale nie wśród kobiet (współczynnik ryzyka HR 0,31, 95% CI 0,14-0,69 i HR 0,96, 95% CI 0,62-1,47), po uwzględnieniu wykształcenia, palenia papierosów, spożycia alkoholu, diety, wskaźnika masy ciała, i stosowania hormonów egzogennych. Nie zaobserwowano związku z kawą lub herbatą bezkofeinową. Jednak znaczenie tych wyników pozostaje niepewne, ponieważ dane dotyczące znanych czynników ryzyka czerniaka, w tym fototypu skóry, liczby znamion, wywiadu rodzinnego czerniaka i ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe, nie zostały uwzględnione.

Natomiast analiza danych od ponad 100 000 osób biorących udział w badaniu Nurse's Health Study wykazała niewielki wzrost ryzyka czerniaka złośliwego skóry związanego z wysokim spożyciem owoców cytrusowych lub soku w dziecię (HR 1,36, 95% CI 1,14-1,63), po skorygowaniu o rozpoznane czynniki ryzyka dla czerniaka, takie jak wywiad rodzinny, liczbę znamion i liczbę oparzeń słonecznych w ciągu życia (120). Potencjalnym wyjaśnieniem związku między czerniakiem a spożyciem owoców cytrusowych jest to, że owoce cytrusowe są źródłem psoralenów, związków chemicznych obecnych w roślinach znanych jako fotouczulacze zwiększających wrażliwość na promieniowanie UV (121).

Ponadto w niniejszym badaniu nie wykazano istotnych różnic między odsetkiem osób palących papierosy oraz częstością spożywania alkoholu pomiędzy grupami. W dostępnych dotychczas badaniach również nie stwierdzono, aby palenie było niezależnym czynnikiem ryzyka czerniaka. Jedno z badań sugerowało nawet odwrotną zależność między paleniem a czerniakiem u mężczyzn. Natomiast metaanaliza 16 badań kliniczno-kontrolnych i kohortowych obejmujących ponad 6000 pacjentów wykazała niewielki wzrost ryzyka czerniaka związanego z piciem alkoholu w stopniu umiarkowanym do wysokiego w porównaniu z piciem lekkim lub okazjonalnym (RR 1,20, 95% CI 1,06-1,37). Ryzyko było o 55 % wyższe u osób pijących 50 g alkoholu dziennie (122,123).

Istotna różnica została natomiast zaobserwowana pomiędzy odsetkiem osób korzystających z solarium (obecnie lub w przeszłości) w grupie badawczej i kontrolnej. Odsetek osób które korzystały z solarium był istotnie wyższy w grupie pacjentów z rozpoznaniem czerniaka złośliwego skóry, w porównaniu do osób zdrowych. Na podstawie dowodów z wielu badań

sugerujących, że łóżka opalające zwiększają ryzyko czerniaka, w 2009 r. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem Światowej Organizacji Zdrowia (IARC) sklasyfikowała światło ultrafioletowe emitowane z łóżek opalających jako czynnik rakotwórczy u ludzi (124). Kolejne badania obserwacyjne i metaanalizy potwierdziły związek między opalaniem w solarium a występowaniem czerniaka. Metaanaliza 36 badań przeprowadzona w 2021 r. obejmująca 14 583 przypadki czerniaka wykazała istotny związek między opalaniem się w solarium a ryzykiem czerniaka (RR 1,27, 95% CI 1,16-1,39) (125). Ponadto ryzyko było wyższe dla pierwszej ekspozycji w młodym wieku ( $\leq 20$  lat) i częstszych ekspozycji (częstość roczna  $\geq 10$  razy) (odpowiednio RR 1,47, 95% CI 1,16-1,85 i RR 1,52, 95% CI 1,22-1,89). Co więcej populacyjne badanie kliniczno-kontrolne obejmujące 681 pacjentów z czerniakiem i 654 osób w grupie kontrolnej w wieku poniżej 50 lat wykazało, że kobiety, które kiedykolwiek opalały się w solarium, miały od dwóch do sześciu razy większe ryzyko wystąpienia czerniaka w porównaniu z kobietami, które nigdy nie korzystały z solarium (126). Warto zauważyć, że wśród kobiet w wieku od 30 do 39 lat i od 40 do 49 lat stosowanie łóżek opalających było silnie związane z ryzykiem czerniaka po uwzględnieniu innych znanych i związanych ze stylem życia czynników ryzyka czerniaka (OR 3,5, 95% CI 1,2-9,7 i OR 2,3 95% CI 1,4-3,6). We wszystkich grupach wiekowych ryzyko stale wzrastało w przypadku kobiet, które rozpoczęły opalanie w solarium przed ukończeniem 25. roku życia oraz tych, które zgłosiły  $>10$  sesji opalania w ciągu życia. Nie można wykluczyć możliwości, że związek między korzystaniem z solarium a czerniakiem jest przeszacowany z powodu obecności czynników zakłócających. Korzystanie z solarium może być wskaźnikiem populacji bardziej ekspozowanej na promieniowanie słoneczne. Badania wykazały, że osoby korzystające z łóżek opalających częściej opalają się i stosują rzadziej ochronę przeciwsłoneczną niż osoby, które nie korzystają z solarium (127). Co więcej, w niniejszym badaniu stwierdzono również istotną różnicę pomiędzy odsetkiem wystąpienia epizodów poparzeń słonecznych pomiędzy grupami. Pacjenci z czerniakiem znacznie częściej deklarowali wystąpienie poparzenia słonecznego w porównaniu do pacjentów bez rozpoznanego czerniaka złośliwego skóry. Wydaje się, że wzorzec i czas ekspozycji na słońce są niezwykle ważne w rozwoju nowotworów skóry. Czerniaki są zwykle związane z intensywnym, okresowym narażeniem na słońce i oparzeniami słonecznymi, i często występują na obszarach wystawionych na działanie słońca sporadycznie (np. plecy u mężczyzn, kończyny dolne u kobiet). Ten związek z okresową ekspozycją na słońce nie dotyczy jednak wszystkich obszarów ciała, gdyż czerniaki zlokalizowane głowy i szyi są zwykle częstsze u pacjentów z dużą ekspozycją zawodową na słońce, która ma charakter przewlekły (128). Szczególnie ważna wydaje się być ekspozycja we wczesnym okresie życia. Szacuje się, że osoby, które miały pięć

lub więcej ciężkich oparzeń słonecznych w dzieciństwie lub okresie dojrzewania, mają dwukrotnie większe ryzyko zachorowania na czerniaka (129). Co więcej, częstość występowania czerniaka jest wyższa wśród osób migrujących z północnych do bardziej równikowych szerokości geograficznych, a efekt ten obserwuje się głównie wśród osób, które w momencie migracji były dziećmi (130). Nie jest jasne, dlaczego okresowa ekstremalna ekspozycja na słońce wydaje się zwiększać ryzyko czerniaka, podczas gdy przewlekła ekspozycja jest bardziej związana z nieczerniakowymi rakami skóry. Po poważnym uszkodzeniu DNA wywołanym promieniowaniem UV keratynocyty (z których powstają raki płaskonabłonkowe i podstawnokomórkowe) przechodzą apoptozę, czyli zaprogramowaną śmierć komórki. Natomiast melanocyty są odporne na ten poziom promieniowania, a ich przeżycie skutkuje propagacją zmutowanych genów, zwłaszcza jeśli uszkodzony DNA nie jest w pełni naprawiony (24). Może to być ewolucyjnie dobrana korzyść dla organizmu, gdyż melanocyty przeżywają oparzenia słoneczne i mogą chronić regenerujące się keratynocyty. Jednak na poziomie komórkowym, pod wpływem promieniowania ultrafioletowego dochodzi do niekontrolowanej proliferacji melanocytów wynikających z kumulacji w nich mutacji, mogących zarówno pobudzać podziały komórkowe jak i hamować mechanizmy obronne komórki, co może prowadzić do rozwoju czerniaka złośliwego skóry.

W niniejszej pracy, badane grupy nie różniły się istotnie pomiędzy sobą w odsetku narażenia na czynniki szkodliwe w miejscu pracy, takie jak: przewlekły stres, niską temperaturę, wysoką temperaturę, metale ciężkie/zanieczyszczenie powietrza/dioksyny/dym papierosowy, promieniowanie jonizujące, pestycydy/inne chemikalia, a także częste narażenie na promieniowanie słoneczne. Narażenie zawodowe na chemikalia było badane w wielu badaniach dotyczących polichlorowanych bifenyli (PCB), produktów ropopochodnych, promieniowania jonizującego i selenu (131). Chociaż wstępne analizy wykazały wzorce zwiększonej zachorowalności, nie znaleziono żadnych statystycznie istotnych czynników ryzyka zawodowego po skorygowaniu o znane czynniki ryzyka, takich jak liczbę znamion czy ekspozycję na słońce.

Ponadto w badaniu nie wykazano obecności istotnych różnic pomiędzy grupami w częstości występowania innych chorób przewlekłych, jak np. choroby układu krążenia, co może pośrednio sugerować, że przyjmowane leki np. B blokery czy ACEI nie mają znaczenia w onkogenezie czerniaka. Nie przeprowadzono analizy dotyczącej częstszego występowania innych nowotworów w grupie z rozpoznaniem czerniakiem, jak np. nowotworu prostaty (z którym w ostatnim czasie wykazano w kilku badaniach związek z czerniakiem), gdyż do grupy

kontrolnej byli włączani pacjenci bez czynnej bądź obecnej w przeszłości choroby nowotworowej (132).

### 5.3 Cechy progresywne wyglądu badanej populacji - omówienie

Wśród pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem skóry najczęściej występującym typem skóry wg skali Fitzpatricka był fototyp II, następnie fototyp III i fototyp I. Częstość występowania fototypu II oraz III nie różniła się istotnie pomiędzy pacjentami z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry i u pacjentów u których nie zdiagnozowano tego typu nowotworu. Natomiast fototyp I istotnie częściej występował wśród pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem skóry, w porównaniu do pacjentów bez rozpoznanego czerniaka. Jasna pigmentacja skóry, rude lub blond włosy, niebieskie lub zielone oczy, skłonność do piegów i słaba zdolność do opalania, które odzwierciedlają wrażliwość skóry na światło słoneczne, są dobrze znanymi czynnikami ryzyka czerniaka. Osoby z ciemną i jasną skórą na ogół mają taką samą względną liczbę melanocytów, jednak u osób o jasnej karnacji melanocyty na ogół nie wytwarzają melaniny. Należy podkreślić, że wszyscy pacjenci z grupy badawczej byli polskiej narodowości, gdzie większość mieszkańców należy do rasy kaukaskiej, która odpowiada za 70% przypadków czerniaka. Względne ryzyko rozwoju czerniaka u osób z niebieskimi oczami wynosi od 1,6 do 3,00 w porównaniu do osób posiadających ciemne oczy, natomiast u osób z zielonymi oczami w porównaniu z ciemnymi oczami ryzyko względne wynosi od 1,06 do 2,45 (105). Jeśli chodzi o kolor włosów ryzyko względne wynosi od 1,6 do 9,7 dla blond włosów oraz od 2,3 do 5,59 dla włosów rudych w porównaniu z ciemnymi włosami, natomiast słaba zdolność do opalania zwiększa ryzyko wystąpienia czerniaka od 1,4 do 4,5 raza (20).

W badaniu nie wykazano istotnej różnicy w medianie roku życia w którym pacjenci zaobserwowali pierwsze oznaki siwienia pomiędzy grupą badawczą a kontrolną. Natomiast pacjenci z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry istotnie częściej charakteryzowali się nasilonym oraz ciężkim stopniem zaawansowania fotostarzenia skóry twarzy wg skali Glogau w porównaniu do osób zdrowych. Ponadto pacjenci z rozpoznaniem czerniakiem istotnie częściej charakteryzowali się występowaniem głębokich zmarszczek na czole, głębokich bruzd nosowo-wargowych oraz znacznym opadaniem powiek w porównaniu do osób zdrowych. Oznacza to, że grupa pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem złośliwym skóry charakteryzowała się bardziej nasilonym starzeniem się skóry w porównaniu do osób zdrowych. Co więcej w przeprowadzonym badaniu zaobserwowano, że w grupie pacjentów z

czerniakiem w porównaniu do grupy kontrolnej istotnie częściej na skórze twarzy występowały liczne (>10) plamy soczewicowate oraz teleangiektazje, które powodowane są przewlekłą ekspozycją na światło UV. Może mieć to związek, z wcześniej opisanymi wynikami, tj. częstszym korzystaniem z solariów oraz większym odsetkiem wystąpienia poparzeń słonecznych w grupie badawczej. Co ciekawe, pomiędzy badanymi grupami nie wykazano istotnych różnic w przewlekłym narażeniu na promieniowanie słoneczne w pracy, natomiast w kwestionariuszu nie uwzględniono pytania o ogólne przewlekłe narażenie na promieniowanie słoneczne niezależnie od pracy, co zapewne należy do słabych punktów badania. Można jedynie przypuszczać, że częstsze korzystanie z solarium oraz częściej występujące oparzenia słoneczne obserwowane w grupie badawczej mogą być wskaźnikiem populacji bardziej ekspozowanej na promieniowanie słoneczne.

Ponadto nie wykazano istotnie statystycznej różnicy pomiędzy grupami w medianie wysokości ciała, natomiast pacjenci z czerniakiem charakteryzowali się istotnie wyższą medianą masy ciała w porównaniu do pacjentów zdrowych. Pomimo faktu, że otyłość została powiązana ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia jak i zwiększoną śmiertelnością w kilku typach nowotworów, takich jak np. rak jelita grubego, rak piersi czy rak gruczołu krokowego, jej możliwa rola w etiologii czerniaka złośliwego pozostaje niejasna (3). Uzyskane wyniki w niniejszym badaniu są w części spójne z pracą De Giorgi V i in. (2017) (133). W cytowanym badaniu autorzy stwierdzili istotną ( $p < 0,001$ ) korelację BMI z wiekiem oraz występowaniem czerniaka: nadwaga istotnie zwiększała ryzyko czerniaka złośliwego u osób w wieku poniżej 50 lat (OR (iloraz szans, ang. Odds Ratio) = 1,85 95% CI 1,14-2,94), podczas gdy związek nie był istotny dla osób powyżej 50 roku życia (OR = 1,15 95% CI 0,77-1,71). Natomiast w przeprowadzonej metaanalizie przez Sergentanis T i in. (2013), przeanalizowano oddzielnie ryzyko czerniaka złośliwego wśród mężczyzn i kobiet w odniesieniu do wskaźnika masy ciała (BMI). Wśród mężczyzn OR wyniósł 1,31 (95% CI 1,18-1,45) dla nadwagi i 1,31 (95% CI 1,19-1,44) dla otyłości. Wśród kobiet nie udokumentowano żadnego istotnego związku; iloraz szans dla osób z nadwagą i otyłością wynosił odpowiednio 0,98 (95% CI: 0,92-1,05) i 0,99 (95% CI: 0,83-1,18)(134).

#### 5.4 Dane szczegółowe dotyczące rozpoznanego czerniaka złośliwego w grupie badawczej – omówienie

Wśród pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry u 14 pacjentów pierwotną lokalizacją była twarz (13,86%), u 6 klatka piersiowa (5,94%), u 10 brzuch (9,9%), u 32 plecy (31,68%), u 15 kończyny górne (14,85%), natomiast u 24 pacjentów pierwotną lokalizacją były kończyny dolne (23,76%). U kobiet czerniak był najczęściej diagnozowany na kończynach dolnych (33,33%), natomiast u mężczyzn na plecach (37,14%). Najczęściej rozpoznany podtypem histomorfologicznym był czerniak szerzący się powierzchownie (67 pacjentów, 66,34%); następnie wywodzący się z plamy soczewicowatej (15 pacjentów, 14,85%), in situ (8 pacjentów, 7,92%), guzkowy (3 pacjentów, 2,97%) i akralny (2 pacjentów, 1,98%). U 5 pacjentów (4,95%) w badaniu histopatologicznym nie został określony podtyp czerniaka. Uzyskane wyniki dotyczące częstości lokalizacji oraz częstości typu histomorfologicznego czerniaka są spójne z ogólnie dostępnymi danymi w literaturze, co potwierdza dobrą reprezentatywność grupy badawczej (135). U 10 pacjentów (9,9%) były obecne przerzuty do węzłów chłonnych, natomiast u 5 (4,95%) były one dodatkowo obecne w narządach wewnętrznych. U 3 pacjentów (2,97%) występował dodatni wywiad rodzinny. Jako definicję dodatniego wywiadu rodzinnego przyjęto występowanie czerniaka u dwóch lub więcej krewnych pierwszego stopnia. Dodatni wywiad rodzinny jest jednym z bardziej znaczących czynników ryzyka wystąpienia czerniaka. W zależności od przyjętej definicji, piśmiennictwo podaje, że około 5-10% przypadków czerniaków występuje w rodzinach z wrodzoną predyspozycją (20).

W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono istotnych różnic w medianie wieku rozpoznania czerniaka złośliwego skóry pomiędzy pacjentami u których wykryto czerniaka na twarzy i w innej lokalizacji. Wynik ten był jednak blisko osiągnięcia progu istotności ( $p=0,1$ ), co mogłoby potwierdzać fakt, że czerniaki zlokalizowane w obrębie głowy i szyi są zwykle częstsze u pacjentów z dużą przewlekłą ekspozycją na słońce i występują w starszym wieku niż te związane z krótką ale intensywną ekspozycją (128).

Ponadto nie stwierdzono istotnych różnic w medianie wieku rozpoznania czerniaka złośliwego skóry pomiędzy pacjentami u których stwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych w porównaniu do pacjentów bez tych przerzutów. Podobne nieistotne wyniki uzyskano pomiędzy pacjentami u których stwierdzono przerzuty do narządów wewnętrznych i u których nie zostały one wykryte. Pacjenci z przerzutami do węzłów chłonnych charakteryzowali się natomiast

istotnie wyższą medianą grubości zmiany (w skali wg Breslowa), w porównaniu do pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych. Podobne wyniki zaobserwowano wśród pacjentów z przerzutami do narządów wewnętrznych oraz bez przerzutów, co potwierdza, że skala grubości nacieku guza wg Breslowa jest istotnym i uznanym czynnikiem prognostycznym w czerniaku złośliwym skóry (136). W przeprowadzonych analizach nie wykazano korelacji pomiędzy zaawansowaniem czerniaka określonego głębokością naciekania skóry w milimetrach wg Breslowa a wiekiem pacjentów. Brak istotnej korelacji zaobserwowano również pomiędzy głębokością naciekania skóry wg skali Breslow a wiekiem pacjentów w którym zdiagnozowano czerniaka złośliwego skóry. Wyniki te nie są spójne z wcześniej opublikowanymi pracami, gdzie cieńsze czerniaki zwykle obserwowano wśród młodszej grupy pacjentów (137). Wiek wydaje się być ważnym czynnikiem prognostycznym w czerniaku. Wraz z wiekiem pogarsza się przeżywalność w stadiach I, II, III i IV. Od czasu wprowadzenia biopsji węzła wartowniczego (SLN) w czerniaku przez Mortona D. na początku lat 90. wczesna identyfikacja przerzutów do węzłów regionalnych została uznana za najważniejszy czynnik prognostyczny dla pacjentów z czerniakiem (138). Pierwotnie SLN nie była oferowana pacjentom w wieku powyżej 75 lat, ponieważ uznano, że zachorowalność w tych grupach wiekowych jest zbyt duża, zwłaszcza w świetle braku korzyści terapeutycznych. Wraz ze wzrostem oczekiwanej długości życia i doświadczeniem wykazującym zdolność biopsji SLN do stratyfikowania pacjentów w różnych kategoriach ryzyka (co pozwala na włączenie do badań nad leczeniem uzupełniającym), wiele ośrodków oferuje obecnie biopsję SLN u pacjentów w podeszłym wieku. Status SLN został opisany jako cecha prognostyczna, ale jego rola w przewidywaniu przeżycia zmienia się istotnie w zależności od wieku pacjenta. Wiele badań donosiło wcześniej o paradoksie zmniejszonej dodatniości SLN wraz z wiekiem, podczas gdy istnieje zwiększona śmiertelność u osób w podeszłym wieku przy tej samej grubości Breslowa (139,140). Do dziś nie podano jasnego wyjaśnienia biologicznego tej obserwacji. Chociaż wiadomo, że wiek jest ważnym czynnikiem prognostycznym w czerniaku, nie został on włączony do obecnego systemu oceny zaawansowania czerniaka, który został ostatnio zrewidowany przez American Joint Committee on Cancer (AJCC). Powodem, dla którego SLN może być bardziej pozytywny u młodszych pacjentów, może być fakt, że melanocyty są mniej starzejące się i częściej przemieszczają się do węzła wartowniczego. Pomimo faktu, że melanocyty są obecne w węzle wartowniczym, jest bardziej prawdopodobne, że młodszy układ odpornościowy będzie bardziej skuteczny w utrzymaniu melanocytów w węzle wartowniczym i obroni organizm przed dalszymi przerzutami. Odwrotnie, u starszych pacjentów melanocyty mogą z mniejszym prawdopodobieństwem dotrzeć do węzła wartowniczego, ale gdy to zrobią, mogą nie być



skutecznie kontrolowane przez lokalny układ odpornościowy (141). W przeprowadzonym w 2021 r. przeglądzie systematycznym z metaanalizą wykazano, że do czynników ryzyka wystąpienia NSNM (ang. nonsentinel node metastases), czyli przerzutów także do innych węzłów chłonnych niż tylko węzeł wartowniczy należą: wiek > 50 lat, stadium 3 lub 4 T w klasyfikacji TNM, stadium zaawansowania IV/V według Clarka, obecność owrzodzenia, naciekanie naczyń limfatycznych, typ guzkowy czerniaka oraz lokalizacja guza pierwotnego na kończynach i tułowiu (142).

Powszechnie wiadomo, że śmiertelność z powodu czerniaka wzrasta wraz z wiekiem (143). Chociaż można to przypisać grubszy i owrzodzony czerniakom u starszych pacjentów, zauważono, że wiek jest niezależnym niekorzystnym wskaźnikiem prognostycznym przeżycia całkowitego (OS) (144,145). Głębokość naciekania guza wg skali Breslowa zwiększa się wraz z wiekiem, a także z częstością owrzodzeń, prawdopodobnie z powodu późnej diagnozy u starszych pacjentów. U pacjentów z czerniakiem w stadium IV wiek wpływa na przeżycie, ponieważ ma znaczenie na odpowiedź na leczenie (35). Ponadto, jest całkiem prawdopodobne, że z wiekiem mniej sprawny układ odpornościowy prowadzi do bardziej agresywnych nowotworów.

W niniejszym badaniu nie zaobserwowano istotnej różnicy w medianach wartości skali Breslow pomiędzy pacjentami płci żeńskiej i męskiej. Natomiast w przeprowadzonych dotychczas kilku badaniach, wykazano, że mężczyźni ze zdiagnozowanym czerniakiem skóry charakteryzują się gorszym rokowaniem niż kobiety, z wyższym odsetkiem nawrotów choroby, progresji choroby i śmiertelności (23). Możliwym uzasadnieniem tych wyników jest fakt, że pacjenci płci męskiej rzadko przeprowadzają u siebie samoobserwację zmian skórnych, rzadko wykonują badanie dermatoskopowe znamion u dermatologów i ostatecznie do lekarzy zgłaszają się w bardziej zaawansowanych stadiach choroby niż kobiety, jednak niniejsze badanie nie potwierdziło tej hipotezy.

Co więcej mediany głębokości naciekania skóry przez czerniaka wg skali Breslow nie różniły się istotnie pomiędzy pacjentami z wyższym wykształceniem i bez niego. Wyniki te mogą sugerować, że wykształcenie nie ma znaczenia prognostycznego w czerniaku złośliwym skóry. Być może pacjenci z wyższym wykształceniem są bardziej świadomi ryzyka wystąpienia nowotworu skóry, ale z uwagi na brak czasu częstotliwość samoobserwacji znamion oraz wizyt u dermatologa celem badania dermatoskopowego jest porównywalna jak u pacjentów bez wyższego wykształcenia.

W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowano istotnej różnicy w medianach głębokości naciekania skóry przez czerniaka wg klasyfikacji Breslow pomiędzy pacjentami u których

czerniaka zdiagnozowano na twarzy i na pozostałych częściach ciała. Nie stwierdzono również istotnej różnicy w medianach grubości czerniaka zlokalizowanego odpowiednio na plecach, klatce piersiowej, brzuchu, kończynach górnych, kończynach dolnych i w innej lokalizacji. Otrzymane wyniki mogą sugerować, że pacjenci rzadko przeprowadzali u siebie samobadanie znamion, a czerniaki złośliwe skóry były zwykle rozpoznawane podczas rutynowej wizyty u dermatologa. U pacjentów regularnie przeprowadzających samobadanie znamion, zwykle czerniaki rozwijające w łatwo zauważalnych lokalizacjach takich jak np. twarz czy kończyny dolne cechują się niższymi wartościami w skali Breslow (137).

Ponadto w przeprowadzonych analizach nie wykazano różnic w medianach grubości czerniaka pomiędzy pacjentami u których zdiagnozowano czerniaka szerzącego się powierzchownie a pozostałymi typami histomorfologicznymi. Nie przeprowadzono analiz porównujących mediany głębokości naciekania czerniaka wg Breslowa pomiędzy poszczególnymi typami histomorfologicznymi czerniaka z uwagi na dysproporcje w liczebności pozostałych grup, gdyż otrzymane wówczas wyniki byłyby niemiernodajne.

## 5.5 Ocena wpływu czynników zewnętrznych na metylację DNA – omówienie

W niniejszej pracy podjęto próbę identyfikacji czynników zewnętrznych wywołujących zmiany w metylacji DNA w badanej populacji. Możliwość badania zmian we wzorze metylacji DNA może pozwolić na opracowanie ulepszonych i spersonalizowanych narzędzi służących do wykrycia czynników ryzyka czerniaka jak i jego wczesnej diagnostyki. W dobie „medycyny spersonalizowanej” wiele uwagi poświęca się różnym metodom, które zapewniają powtarzalny i bezpieczniejszy wgląd w rozwój, ewolucję i heterogeniczność nowotworów. Należy podkreślić, że przewagą analizy globalnej metylacji nad innymi metodami, jest możliwość jej oznaczania za pomocą mało inwazyjnych metod jak rutynowe pobranie krwi. W przeprowadzonej analizie pomiędzy grupami nie zaobserwowano pozycji różniących się istotnie w średnich poziomach metylacji. Brak wyników istotnych statystycznie na poziomie EWAS, z jednej strony może wynikać z niewielkiej liczby analizowanych próbek w przeprowadzonym badaniu. Z drugiej strony pomiędzy badanymi grupami nie wykazano licznych różnic w stylu życia, a być może czynniki zewnętrzne różnicujące obie grupy jak korzystanie z solarium, czy oparzenia słoneczne nie wpływają na metylację DNA.

Badania naukowe dowodzą o istotnym związku między zmianami w metylacji DNA, a występowaniem różnego rodzaju schorzeń. Prawdopodobnie zmiana wzoru metylacji, wywołana czynnikiem zewnętrznym, może przyczyniać się do wystąpienia różnego rodzaju chorób, takiej jak np. choroby wieńcowej serca (6,7). Globalna hipometylacja DNA komórek krwi obwodowej jest związana również ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworów, w tym nowotworów głowy i szyi, żołądka, wątroby, pęcherza moczowego, okrężnicy i odbytnicy, piersi (7,146–151). W literaturze istnieje bardzo mała liczba podobnych badań przeprowadzonych u pacjentów z czerniakiem złośliwym skóry (152–154). Zmiany w metylacji DNA w komórkach krwi obwodowej niekoniecznie muszą odzwierciedlać zmiany epigenetyczne obecne w samym guzie. Globalna hipometylacja DNA leukocytów wydaje się być istotna w inicjacji i progresji czerniaka. Odzwierciedla ona ogólną niestabilność genomu pacjenta poprzez demetylację transpozonów i powtórzeń pericentromerycznych, jak również aktywację specyficznych onkogenów, co może predysponować do rozwoju nowotworu (146,155).

Rola globalnej metylacji DNA jest szczególnie interesująca w przypadku czerniaka, ponieważ zależy ona od stylu życia i czynników środowiskowych, które mogą modyfikować ryzyko rozwoju tego nowotworu (156). Dieta i spożywanie różnych składników odżywczych jest istotnym czynnikiem środowiskowym, który wpływa na metylację DNA poprzez bezpośrednie hamowanie enzymów katalizujących metylację DNA lub zmianę dostępności substratów wymaganych do tych reakcji enzymatycznych, takich jak dostępność i wykorzystanie grup metylowych (157). Istnieją dowody na to, że również ekspozycja na dym tytoniowy czy stres psychospołeczny są związane ze zmianami w metylacji DNA w określonych miejscach w całym genomie (158,159). Globalna hipometylacja DNA wzrasta wraz z ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe (160). Już w 2003r. Mittal i in. (2003) zasugerowali, że ekspozycja na UV może wywołać globalną hipometylację w skórze myszy (161). Nair-Shalliker i in. (2014) stwierdzili, że ekspozycja na promieniowanie UV może zmniejszać metylację DNA w ludzkich limfocytach (160). Jak dotąd tylko w trzech badaniach zbadano związek między globalną metylacją DNA a ryzykiem czerniaka złośliwego skóry (152–154). W dwóch z nich zaobserwowano istotny związek hipometylacji z ryzykiem czerniaka (153,154), natomiast w trzecim podobnie jak w niniejszym badaniu nie zaobserwowano podobnej zależności (152). Ta niespójność uzasadnia konieczność przeprowadzenia kolejnych badań na większej grupie pacjentów celem dalszego wyjaśnienia tej kwestii.

W literaturze istnieją doniesienia na temat nieprawidłowo zmetylowanych genów odgrywających rolę w kontroli cyklu komórkowego, apoptozie i inwazji komórek, jak również

w progresji czerniaka. Ograniczona hipermetylacja na wyspach CpG i globalna hipometylacja to epigenetyczne cechy charakterystyczne komórek czerniaka (162). Inicjacja i progresja czerniaka są związane z utratą genów supresorowych guza i aktywacją onkogenów (155). Wiele genów supresorowych jest nieprawidłowo regulowanych poprzez inaktywację spowodowaną specyficzną metylacją w regionie promotora. Wydaje się, że geny te biorą udział w różnych szlakach sygnałowych, które często ulegają modyfikacjom podczas rozwoju i ewolucji czerniaka. Szlaki te obejmują MAPK, PI3K, RB1 i szlaki białkowe p53. Mogą one działać synergistycznie lub niezależnie, kontrolując wzrost i apoptozę, a ich przedłużona i niekontrolowana aktywacja jest związana z proliferacją, inwazją i przerzutami (155,163). Zaobserwowano, że stopniowy wzrost hipermetylacji DNA wzrasta równolegle z agresywnością nowotworu i jest znany jako fenotyp metylatora wyspy CpG (CIMP). Sugerowano, że geny zaangażowane w ten narastający wzorzec hipermetylacji tworzą CIMP czerniaka (164). W naszym badaniu nie zaobserwowano istotnych różnic w metylacji pomiędzy grupą badawczą a kontrolną, gdyż pod kątem epigenetycznym nie były analizowane komórki guza, a DNA leukocytów w krwi pacjentów.

Dyskutując o metylacji DNA, należy wspomnieć o możliwościach jakie może nieść ze sobą tzw. biopsja płynna, która odnosi się do badania płynów ustrojowych (tj. krwi, moczu i śliny). W ostatniej dekadzie pojawiła się ona jako nowy biomarker o znaczącym zastosowaniu w badaniach, ze względu na jej zdolność do dostarczania porównywalnych (lub bardziej szczegółowych) informacji niż konwencjonalna biopsja tkanki, ale uzyskiwanych za pomocą mniej inwazyjnych metod (165). Podobnie jak wszystkie krążące komórki nowotworowe, także komórki czerniaka są uwalniane do krwioobiegu przez guz pierwotny i/lub przerzuty. Analiza krążących we krwi komórek guza (ang. Circulating tumor cells, CTCs), analiza metylacji wolnych od komórek krążących kwasów nukleinowych (cell-free circulating nucleic acids, cfDNA i cfRNA) oraz pęcherzyków pozakomórkowych (extracellular vesicles, EVs) dostępnych za pomocą mało-inwazyjnej procedury jak pobieranie krwi może otworzyć nowe możliwości diagnostyki nowotworu, poprawiając ocenę ryzyka, monitorowanie skuteczności terapeutycznej w czasie rzeczywistym, wczesne wykrywanie nawrotu i monitorowanie ewolucji guza. Biopsja płynna może stanowić doskonałe uzupełnienie analizy globalnej metylacji DNA obwodowych komórek krwi pacjentów i badania metylacji komórek samego guza wymagających bardziej inwazyjnych procedur. Ponieważ czerniak skóry charakteryzuje się skrajną heterogenicznością i licznymi mutacjami, wczesne wykrycie zmian związanych z nowotworem, takich jak rearanżacje chromosomalne, zmienność liczby kopii lub mutacje w onkogenach i genach supresorowych nowotworów, jest kluczowe przy wyborze i dobraniu

terapii celowanej jak i monitorowaniu leczenia. Kwestia „płynnej biopsji” wydaje się być zatem bardzo interesującym kierunkiem dalszych badań naukowych nad czerniakiem.

## 5.6 Ocena wieku biologicznego badanej populacji - omówienie

Starzenie się reprezentuje nagromadzenie zmian w ludzkim organizmie w czasie, obejmujące zmiany zarówno zewnętrzne jak i wewnętrzne (166). Starzenie się jest jednym z najważniejszych znanych czynników ryzyka większości chorób człowieka i jednym z najistotniejszych czynników ryzyka nowotworu. Jak w przypadku wszystkich rodzajów nowotworów, również częstość występowania czerniaka wzrasta wraz z wiekiem. Wydaje się jednak, że związek między starzeniem się a czerniakiem jest złożony.

W warunkach klinicznych oczywiste jest, że pacjenci z czerniakiem często wydają się młodsi bądź starsi niż ich wiek metrykalny i prawdopodobnie określenie rozbieżności między wiekiem chronologicznym a wiekiem biologicznym może pomóc łatwiej określić ryzyko wystąpienia czerniaka, a także wyjaśnić różnice w odpowiedziach na leczenie. Fizyczne zmiany w skórze należą do najbardziej widocznych oznak starzenia. Jak już wcześniej wspomniano w badanej populacji wykazano, że grupa pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem złośliwym skóry charakteryzowała się bardziej nasilonym starzeniem i fotostarzeniem się skóry, w porównaniu do pacjentów zdrowych.

Liczba znamion jest kolejnym wiarygodnym fenotypowym markerem starzenia, a także jednym z głównych czynników ryzyka czerniaka. Znamiona zwykle ulegają involucji po czwartej dekadzie życia w populacjach rasy kaukaskiej i są rzadkie u osób starszych. Ten proces jest prawdopodobnie częściowo uwarunkowany genetycznie. Tempo, w jakim znamiona zanikają wraz z wiekiem, jest bardzo zróżnicowane, a niektórzy pacjenci nadal mają dużą liczbę znamion w późnym średnim wieku. Osoby, które utrzymują wysoką liczbę znamion po 50. roku życia, są bardziej narażone na czerniaka, ponieważ ich zmiany nie starzeją się. Sugeruje to, że opóźnione starzenie się w układzie melanocytowym może być dobrym predyktorem ryzyka czerniaka. Istnieje pytanie, czy opóźnione starzenie w układzie melanocytowym koreluje z opóźnionym wiekiem biologicznym.

Szybkość biologicznego starzenia się ludzi jest bardzo zróżnicowana i można to częściowo oszacować, oceniając kurczenie się telomerów wraz z wiekiem. Powtarzające się cykle

komórkowe ostatecznie prowadzą do krytycznego skrócenia długości telomerów, co sygnalizuje starzenie się komórki, aby wywołać apoptozę (167). Dłuższe telomery powiązano z większą liczbą znamion i ryzykiem czerniaka, a geny wpływające na długość telomerów (m.in. takich jak TERT i POT) powiązano z ryzykiem czerniaka w badaniach asocjacyjnych całego genomu (GWAS) (53,57). Sugeruje to, że opóźnione starzenie w układzie melanocytowym koreluje z wiekiem biologicznym, a osoby z dużą liczbą znamion mogą charakteryzować się opóźnionym starzeniem się i zwiększoną długością życia (168,169). Już w 2011 roku badania kliniczno-kontrolne potwierdziły te wyniki w przypadku czerniaka złośliwego skóry (170,171).

Co ciekawe, podczas gdy liczba znamion jest silnym czynnikiem ryzyka czerniaka, wysoka liczba znamion z kolei wiąże się z poprawą przeżycia, być może związaną z opóźnionym starzeniem się biologicznym pacjentów. Przypadki czerniaka z dużą liczbą znamion wykazały zmniejszenie o 57% śmiertelności dla czerniaka (HR = 0,43, 95% CI 0,21–0,89) (172). Ponadto kilka polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) wpływa na długość telomerów, a wiele z tych SNP jest powiązanych z ryzykiem czerniaka, co potwierdza rolę starzenia się w czerniaku (173).

W ostatnim czasie zidentyfikowano wiele innych obiecujących biomarkerów wieku biologicznego, w tym estymatory wieku biologicznego oparte na metylacji DNA, transkryptomice, proteomice, metabolomice i złożonych panelach biomarkerów (82). W wielu badaniach wykazano, że predyktory wieku biologicznego oparte na metylacji DNA (DNAm) w zakresie określonych loci, zwane zegarami epigenetycznymi najlepiej sprawdzają się jako kalkulatory wieku biologicznego (5,81). Dotychczas nie opublikowano żadnej pracy, której celem była ocena wieku biologicznego opartego na metylacji DNA u pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem złośliwym skóry. Kwestia ta wydaje się być niezwykle interesująca, gdyż z jednej strony jak opisano powyżej sugeruje się, że opóźnione starzenie w układzie melanocytowym koreluje z wiekiem biologicznym, a osoby z dużą liczbą znamion mogą charakteryzować się opóźnionym starzeniem się i zwiększoną długością życia związaną z m.in. dłuższą długością telomerów. Z drugiej strony pacjenci z czerniakiem mogą wykazywać się przyspieszonym starzeniem się wynikającym z ekspozycji na czynniki środowiskowe, zwiększających ryzyko rozwoju czerniaka złośliwego.

W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowano istotnych różnic w średnich wieku epigenetycznego oszacowanego za pomocą wszystkich rodzajów zegarów biologicznych i w zakresie parametrów przyspieszenia wieku pomiędzy grupą badawczą i kontrolną. Wyniki niniejszego badania sugerują zatem, że proces starzenia się skóry nie koreluje z wiekiem

epigenetycznym. Obserwacja ta może również pośrednio sugerować, że wykształcenie, korzystanie z solarium oraz epizody oparzeń słonecznych, czyli cechy różnicujące grupę badawczą i kontrolną nie wpływają na wiek epigenetyczny.

Analizę wieku epigenetycznego przeprowadzono również pomiędzy wyselekcjonowanymi podgrupami spośród pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym.

Grupę pacjentów z czerniakiem podzielono na dwie grupy, tj. na grupę pacjentów przewlekłe ekspozowanej na słońce, do której należeli pacjenci z czerniakiem zlokalizowanym na twarzy (lokalizacji najczęściej wystawianej na promieniowanie UV) i pacjentów z intensywną, okresową ekspozycją na słońce, u których czerniak był zlokalizowany na pozostałych częściach ciała. W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano, że pacjenci z czerniakiem zlokalizowanym na skórze twarzy charakteryzowali się istotnie wyższą średnią wartości parametru DNAmTL (tj. długością telomerów oszacowanej na podstawie metylacji DNA) w porównaniu do pacjentów u których czerniak został zdiagnozowany w innych lokalizacjach. Wiek epigenetyczny oznaczony za pomocą innych zegarów biologicznych nie różnił się istotnie pomiędzy tymi dwoma podgrupami. Należy podkreślić, że czerniak zlokalizowany na twarzy zazwyczaj jest diagnozowany >55 r.ż., histologicznie zazwyczaj opisywany jest jako czerniak wywodzący się z plamy soczewicowatej, a dodatkowo u tych pacjentów obserwuje się z reguły większą liczbę znamion wynikającą z przewlekłej ekspozycji na słońce napędzającej proliferację melanocytów w skórze. Uzyskane wyniki w niniejszym badaniu są zatem spójne z wcześniej opublikowanymi pracami, w których dłuższe telomery powiązano z czerniakiem i większą liczbą znamion (53,57). W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano ponadto, iż pacjenci ze zdiagnozowanym czerniakiem wywodzącym się z plamy soczewicowatej charakteryzowali się istotnie wyższą średnią DNAmTL w porównaniu z czerniakiem szerzającym się powierzchownie. Wg najnowszej klasyfikacji WHO czerniaki skóry podzielono na dwie grupy. Pierwsza z nich spowodowana jest nasilonym uszkodzeniem skóry, które wynika ze skumulowanej dużej dawki promieniowania słonecznego i należy do niej czerniak wywodzący się z plamy soczewicowatej. Do drugiej grupy należą czerniaki spowodowane małym uszkodzeniem skóry, która wynikała z małej lub okresowej ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe, a klasycznym przykładem takiego czerniaka jest czerniak szerzący się powierzchownie. Oba powyżej wspomniane wyniki sugerują pośrednio, że przewlekła ekspozycja na światło słoneczne wpływa na wydłużanie telomerów. W dotychczas przeprowadzonych badaniach, skracanie się telomerów powiązano z chorobami zależnymi od wieku. Zaobserwowane wyniki mogą zatem oznaczać, że promieniowanie UV nie jest istotnym

czynnikiem ryzyka innych chorób czy nowotworów, których częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem, a wręcz przeciwnie może mieć działanie profilaktyczne (100).

Dostępne w literaturze dotychczas przeprowadzone badania również wskazywały ochronną rolę przewlekłej ekspozycji na słońce przed zachorowaniem na choroby sercowo-naczyniowe czy nowotwory. Rolę tę wiązano z syntezą witaminy D pod wpływem ekspozycji na UV działającej protekcyjnie na onkogenezę, jak i również mobilizacją tlenu azotu przez promieniowanie UVA z zapasów azotanów w skórze, i wynikającym z tego obniżeniem ciśnienia krwi (174,175).

Po podziale populacji badanej uwzględniającego zaawansowanie guza, w niniejszej analizie zaobserwowano niższe wartości parametru tempa starzenia się PoAm w grupie z czerniakiem inwazyjnym w porównaniu z grupą kontrolną. PoAm szacuje, jak szybko następuje starzenie się w latach poprzedzających czas pomiaru. Zamiast zegara, który rejestruje, ile czasu minęło, PoAm działa jako prędkościomierz rejestrujący, jak szybko dany osobnik się starzeje. Pomiary szybkości starzenia są potrzebne jako zastępcze punkty końcowe celem zapobiegania chorobom poprzez spowolnienie starzenia biologicznego. Uzyskane wyniki w niniejszym badaniu, mogą stanowić kolejne potwierdzenie hipotezy o spowolnionym starzeniu się pacjentów z czerniakiem. Wyniki te ponadto sugerują, że pacjenci z czerniakiem złośliwym skóry mają mniejsze ryzyko zachorowania na choroby związane z wiekiem, jak choroby układu krążenia czy nowotwór jelita grubego. U tych pacjentów długowieczność może zatem być kompromisem dla zwiększonego ryzyka czerniaka, ponieważ wielu pacjentów z czerniakiem przeżywa swoją chorobę. Ponadto obserwacje te są spójne z wcześniej uzyskanymi wynikami w niniejszej dysertacji, wskazującymi że czynniki środowiskowe na które pacjenci z czerniakiem byli i są ekspozycy nie wpływają na przyspieszone tempo starzenia.

Po podziale grupy badawczej uwzględniającej typ histomorfologiczny czerniaka, pomimo małej liczebności podgrup i w związku z tym możliwości powstania niemiarodajnych wyników postanowiono je przedstawić i omówić w niniejszej dysertacji, ponieważ wydają się one być intrygujące. W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano, iż pacjenci z czerniakiem akralnym charakteryzowali się istotnie wyższym spowolnieniem tempa starzenia określonego za pomocą parametru GrimAgeAccel w porównaniu do pacjentów z czerniakiem wywodzącym się z plamy soczewicowatej, czerniakiem guzkowym, a także czerniakiem in situ. Należy wspomnieć, że rozwój czerniaka akralnego pozostaje bez związku z narażeniem na promieniowanie UV(18). Jest to najczęstszy typ czerniaka wśród osób o ciemnej karnacji (powyżej 4 stopnia wg skali Fitzpatricka), w której wysoki poziom melaniny jest istotnym czynnikiem ochronnym przed promieniowaniem słonecznym, co potwierdza fakt, iż pacjenci



Ci nigdy nie doznają oparzeń słonecznych. Wyniki te mogą sugerować, że ekspozycja na światło słoneczne może przyspieszać wiek biologiczny pacjentów, co jest sprzeczne z wynikami uzyskanymi w przypadku analizy DNAmTL w niniejszym badaniu.

Ponadto po podziale populacji grupy badawczej na podgrupy uwzględniające lokalizację guza, w przeprowadzonym badaniu zaobserwowano, iż pacjenci ze zdiagnozowanym czerniakiem złośliwym skóry na klatce piersiowej charakteryzowali się istotnie wyższym spowolnieniem tempa starzenia określonego za pomocą parametru GrimAgeAccel w porównaniu do pacjentów u których czerniaka rozpoznano odpowiednio na plecach, brzuchu oraz kończynach górnych. Klatka piersiowa, spośród innych wymienionych lokalizacji wydaje się być najmniej ekspozowana na promieniowanie UV. Wyniki te, podobnie jak w przypadku analizy wieku biologicznego czerniaka akralnego i innych typów histomorfologicznych mogą sugerować, że ekspozycja na światło słoneczne może przyspieszać wiek biologiczny pacjentów. Niespójność obserwacji dotyczącej GrimAgeAccel i czerniaka akralnego z wynikami uzyskanymi w przypadku analizy DNAmTL w niniejszym badaniu, można tłumaczyć niemiernym wynikiem związanym z niską liczebnością podgrupy pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem akralnym. DNAmTL jak i GrimAgeAccel dobrze korelują z wiekiem biologicznym, co skutkuje, iż oba parametry są dobrymi predyktorami długości życia a także występowania chorób związanych z wiekiem. Zaobserwowany wynik u pacjentów z czerniakiem zlokalizowanym na klatce piersiowej może jednak potwierdzać wiarygodność obserwacji, iż światło słoneczne przyspiesza wiek biologiczny pacjentów, co jest spójne z wcześniej opublikowanymi pracami (160,161). Obserwacja ta, może wiązać ze sobą poważne implikacje kliniczne, twierdzące że promieniowanie ultrafioletowe może być jednak istotnym czynnikiem zwiększającym występowanie chorób związanych z wiekiem, jak np. choroby układu krążenia czy nowotwór prostaty. Częstsze występowanie nowotworu prostaty w populacji z czerniakiem może dodatkowo potwierdzać tę zależność (132). Być może na wartość parametru DNAmTL u pacjentów wpływają także inne czynniki, np. genetyczne, które mogą zaburzać ostateczny wynik. Zapewne niezbędne jest przeprowadzenie kolejnych badań na większej grupie pacjentów, weryfikujących i wyjaśniających niejednoznaczność uzyskanych wyników.

Co więcej, u pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem guzkowym stwierdzono istotnie wyższy parametr średniej EEAA w porównaniu do pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem wywodzącym się z plamy soczewicowatej. Obserwacja ta, może odzwierciedlać różnice w rokowaniu tych pacjentów. Powszechnie wiadomo, że czerniak guzkowy charakteryzuje się najgorszym rokowaniem spośród wszystkich czerniaków, z uwagi na szybki wzrost, brak fazy

wzrostu radialnego, i szybkie przerzuty. Z drugiej strony czerniak wywodzący się z plamy soczewicowatej, charakteryzuje się powolnym wzrostem, początkowo o typie radialnym, i rzadko daje przerzuty. Wyższy parametr EEAA, który jest miarą starzenia się układu odpornościowego, może przyczyniać się do zwiększonego ryzyka przerzutów narządów wewnętrznych w przypadku czerniaka guzkowego, gdyż u pacjentów ze starszym biologicznie systemem immunologicznym komórki nowotworowe po dotarciu do węzła wartownika mogą nie być skutecznie kontrolowane przez lokalny układ odpornościowy, przez co organizm nie jest chroniony przed dalszymi przerzutami (141).

### 5.7 Ogólnogenomowa analiza zmienności SNP badanej populacji – omówienie

W niniejszym badaniu nie zidentyfikowano żadnego nowego istotnego SNP związanego z czerniakiem złośliwym skóry. Uzyskane nieistotne wyniki mogą być spowodowane zbyt małą liczebnością badanej populacji. Częstość występowania konkretnego SNP jest niewielka, zatem prawidłowe badanie GWAS jest badaniem epidemiologicznym, które powinno być przeprowadzane na tysiącach osób. Należy podkreślić, że uzyskanie wiarygodnych wyników badania asocjacyjnego wymaga także odpowiedniej skomplikowanej analizy statystycznej. Celem zapewnienia miarodajnych wyników stosuje się niskie progi istotności statystycznej (zazwyczaj  $p < 1 \cdot 10^{-8}$ ). Po obniżeniu progu istotności (do  $p < 5 \cdot 10^{-4}$ ) w przeprowadzonej analizie odnotowano asocjacje już dla aż 23426 pozycji SNP.

Co więcej, analiza danych literaturowych wykazała, że liczba znanych pozycji SNP zasocjowanych z czerniakiem w populacji europejskiej wynosi 68 (95). Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy analizy wykazały, że badana populacja polskich pacjentów z czerniakiem złośliwym skóry charakteryzowała się istotną ( $p < 0.05$ ) predyspozycją genetyczną do jego rozwoju w zakresie wszystkich dotychczas odkrytych markerów SNP charakterystycznych dla czerniaka w populacji europejskiej.

Praktyczne zastosowanie SNP jest szczególnie przydatne w jednostkach chorobowych dziedziczonych wielogenowo, jak np. w czerniaku, i niewątpliwie może dostarczyć dużą ilość kluczowych informacji w procesie diagnostyczno-terapeutycznym tego nowotworu skóry. Analiza SNP u pacjentów umożliwia przede wszystkim określenie predyspozycji genetycznej do wystąpienia czerniaka. Badania przeprowadzone na licznej populacji z czerniakiem wykazały, że analiza SNP u pacjentów może pozwolić na prognozowanie dalszego rozwoju

choroby, pomoc w doborze optymalnej terapii, jak i również monitorowanie odpowiedzi na terapię i badanie metabolizmu leków.

#### 5.8 Mocne i słabe strony badania.

Niewątpliwie mocną stroną przeprowadzonego badania, było bardzo skrupulatne zbieranie danych. Dane demograficzne oraz odnośnie stylu życia pacjentów były zbierane za pomocą kwestionariusza wywiadu, co zapewniło kompletność zebranych danych. Co więcej, za rekrutację całości badanej populacji była odpowiedzialna jedna osoba. Miało to szczególne znaczenie w części kwestionariusza, gdzie zbierający dane musiał samodzielnie ocenić, np. starzenie się skóry czy też wzrost pacjentów, gdyż ujednoliciło to możliwy błąd systematyczny. Kolejną mocną stroną badania była bardzo dokładnie dobrana dla grupy badawczej pod względem płci oraz wieku grupa kontrolna. Co więcej wszyscy pacjenci do grupy badawczej byli rekrutowani jako kolejno zgłaszający się do Poradni Dermatologicznej pacjenci z rozpoznaniem obecnie bądź w przeszłości czerniakiem złośliwym skóry, co zapewniło losowość przypadków i dobrą reprezentatywność grupy badawczej.

Do słabych stron przeprowadzonego badania należy wymienić ograniczoną, m.in. ze względów finansowych liczbę uczestników badania. Kolejnym słabym punktem badania jest fakt, że często u rekrutowanych pacjentów do grupy badawczej czerniaka złośliwego skóry rozpoznano kilka lat wcześniej, i od tej pory mogli oni zmienić swój styl życia, co mogło mieć wpływ na metylację DNA i zaburzenie wyników. Ponadto biorąc pod uwagę, że rekrutację oraz kwestionariusz wywiadu uzupełniał lekarz pracujący w poradni dermatologicznej i w pewnych przypadkach znany przez rekrutowanych pacjentów, z uwagi na brak anonimowości część pacjentów mogła np. zataić pewne fakty związane ze swoim stylem życia. Do słabych stron można również zaliczyć, iż część pacjentów z grupy kontrolnej była pod kontrolą Poradni Dermatologicznej, co mogło zaburzyć reprezentatywność grupy. Ponadto, jak już wcześniej wspomniano w kwestionariuszu nie uwzględniono pytania o ogólne przewlekłe narażenie na promieniowanie słoneczne niezależnie od pracy; mogłoby to wyodrębnić dwie grupy w populacji z czerniakiem złośliwym skóry: jedną chronicznie narażoną na promieniowanie ultrafioletowe, oraz drugą charakteryzującą się sporadyczną, ale intensywną ekspozycją na światło słoneczne i pozwolić na przeprowadzenie dodatkowych analiz.

## 5.9. Podsumowanie

Patogeneza czerniaka jest skomplikowana oraz wieloczynnikowa. Dzięki sekwencjonowaniu nowej generacji i analizie dużych zbiorów danych, poziom wiedzy na temat onkogenezy czerniaka jest dynamiczny i wciąż ulega rozwojowi. W ostatnich latach opisano szereg genów związanych z czerniakiem. Potrzebne jednak są dalsze badania epidemiologiczne, kliniczne, epigenetyczne i genetyczne, aby w pełni zrozumieć sposób dziedziczenia, rolę czynników środowiskowych w penetracji genów oraz znaczenie tych genów w rokowaniu pacjenta. Dotychczas zaobserwowane i omówione w niniejszej pracy wyniki z dziedziny epigenetyki i genetyki wydają się mieć bardzo praktyczne i interdyscyplinarne implikacje kliniczne wpływające na poprawę rokowania pacjentów z czerniakiem złośliwym skóry.

Z kolei niezwykle dynamiczny rozwój biologii molekularnej pozwala wierzyć, że cena oznaczeń testów genetycznych i epigenetycznych będzie stopniowo spadać, a standaryzacja protokołów analizy sprawi, że badania te będą mogły być wykonywane przez każdego analityka medycznego, i staną się one rutyną w codziennej praktyce lekarskiej.

## 6. Najważniejsze wyniki i wnioski.

W niniejszej dysertacji doktorskiej podjęto próbę wytłumaczenia patogenezy czerniaka złośliwego skóry, kompleksowo obejmując ocenę wpływu czynników środowiskowych, epigenetycznych i genetycznych na rozwój czerniaka. Ponadto, według mojej najlepszej wiedzy, jest to pierwsze w historii badanie, w którym został oceniony wiek epigenetyczny pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem skóry. Jednocześnie stanowi jedno z nielicznych badań, w którym przeprowadzono szeroką analizę czynników zewnętrznych wywołujących zmiany w metylacji DNA u pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym skóry.

Podsumowując uzyskane wyniki wskazują, że:

1. Ryzyko rozwoju czerniaka złośliwego zwiększało korzystanie z solarium, a także przynajmniej jeden epizod oparzenia słonecznego w życiu, co jest spójne z ogólnodostępną wiedzą medyczną. Brak wyższego wykształcenia również było czynnikiem ryzyka wystąpienia czerniaka złośliwego skóry, co można tłumaczyć, że osoby z niższym poziomem wykształcenia są mniej świadome ryzyka zachorowania na czerniaka, a także mniej wyedukowane odnośnie czynników ryzyka nowotworów skóry, jak i metod ich zapobiegania.
2. Nie istnieje bezpośrednia korelacja między danymi metylacyjnymi, czynnikami środowiskowymi a wystąpieniem czerniaka złośliwego skóry. Sugeruje to, że czynniki zewnętrzne różnicujące obie grupy i wpływające na rozwój czerniaka złośliwego skóry takie jak korzystanie z solarium oraz oparzenia słoneczne nie wpływają na metylację DNA. Wydaje się zatem, że analiza globalnej metylacji DNA nie jest dobrym narzędziem służącym do wykrycia czynników ryzyka czerniaka jak i jego wczesnej diagnostyki.
3. Badana populacja polskich pacjentów z czerniakiem złośliwym skóry charakteryzowała się istotną predyspozycją genetyczną do jego rozwoju w zakresie wszystkich dotychczas odkrytych 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 rozpoznaniem czerniakiem inwazyjnym charakteryzowali się wolniejszym tempem epigenetycznego starzenia niż pacjenci bez rozpoznanego czerniaka złośliwego skóry.

Wydaje się, że czerniak złośliwy skóry nie towarzyszy przyspieszonemu starzeniu się organizmu, w przeciwieństwie do pacjentów z rozpoznanymi innymi typami nowotworów, u których jak wykazano w innych badaniach obserwowano przyspieszony wiek biologiczny. Jednym z najważniejszych czynników ryzyka czerniaka jest duża liczba znamion, szczególnie po 50. roku życia, która wynika z opóźnionego starzenia się w układzie melanocytowym. Uzyskane w niniejszym badaniu wyniki sugerują, że opóźnione starzenie w układzie melanocytowym u pacjentów z rozpoznanym czerniakiem złośliwym skóry koreluje z obserwowanym u nich opóźnionym starzeniem się organizmu. Wolniejsze tempo biologicznego starzenia się może sprawiać, że pacjenci z czerniakiem złośliwym skóry mają mniejsze ryzyko zachorowania na choroby związane z wiekiem, takie jak np. choroby układu krążenia czy nowotwór jelita grubego ale wymaga to szerszych badań.

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 mniej nasłonecznionych. Podobną zależność wykazano pomiędzy czerniakiem wywodzącym się z plamy soczewicowatej a szerzącym się powierzchownie. Wydaje się, że przewlekła ekspozycja na światło UV spowalnia proces starzenia się epigenetycznego, zatem nie jest czynnikiem ryzyka chorób związanych z wiekiem, a wręcz może mieć działanie ochronne co można powiązać z syntezą witaminy D podczas ekspozycji na światło UV.

6. Pacjenci z rozpoznanym czerniakiem złośliwym charakteryzowali się bardziej nasilonym starzeniem i fotostarzeniem skóry twarzy wg skali Glogau w porównaniu do grupy kontrolnej, co sugeruje istotny wpływ promieniowania słonecznego na starzenie się skóry. Mając na uwadze całokształt uzyskanych wyników, można wnioskować, że starzenie się skóry nie koreluje z wiekiem epigenetycznym, zatem wygląd zewnętrzny nie jest dobrym predyktorem występowania chorób związanych z wiekiem.

## **7. Streszczenie pracy**

### **Wstęp.**

Nowotwory skóry są jednymi z najczęściej spotykanych nowotworów, a spośród nich najbardziej agresywnym typem jest czerniak złośliwy. Ze względu na szybkie tempo wzrostu, dynamiczny rozwój i częste przerzuty czerniak złośliwy jest najtrudniejszy w leczeniu i w związku z tym charakteryzuje się najgorszym rokowaniem oraz największą śmiertelnością. Wg najnowszych danych epidemiologicznych liczba zachorowań na czerniaka gwałtownie rośnie w zatrważająco szybszym tempie w porównaniu z jakimkolwiek innym rodzajem nowotworu. Przyczyny skrajnego wzrostu zachorowań są tylko częściowo wyjaśnione. Czerniak skóry jest nowotworem o wysokim odsetku wyleczeń, gdy zaawansowanie choroby ograniczone jest miejscowo do skóry. Wykrywanie na wczesnym etapie zaawansowania, dokładniejsze poznanie czynników ryzyka zwiększających jego występowanie oraz ich prewencja stanowią zatem priorytet w walce o zmniejszenie śmiertelności. Obecnie koncepcja onkogenezy czerniaka jest uważana za proces wieloczynnikowy obejmujący czynniki genetyczne, epigenetyczne i środowiskowe. Identyfikacja czynników genetycznych, epigenetycznych i środowiskowych wpływających na powstawanie czerniaka może prowadzić do poprawy prewencji jak i jego diagnostyki, a także wczesnego rozpoznawania pacjentów ze zwiększonym ryzykiem progresji i uzyskania lepszych wyników onkologicznych.

### **Cel badania.**

Celem niniejszej dysertacji doktorskiej była kompleksowa analiza patogenezy czerniaka złośliwego skóry obejmująca identyfikację czynników środowiskowych, epigenetycznych i genetycznych mających wpływ na jego rozwój. Ponadto po raz pierwszy w historii scharakteryzowano wiek epigenetyczny za pomocą różnych zegarów biologicznych opartych na metylacji DNA oraz określono współczynnik tempa starzenia się pacjentów z rozpoznany czerniakiem złośliwym skóry w porównaniu do populacji zdrowej.

### **Material i metody.**

Badanie zostało przeprowadzone w grupie 202 pacjentów (grupa badawcza – 101 osób, grupa kontrolna – 101 osób). Do grupy badawczej zostali włączeni pacjenci z nowo lub w przeszłości rozpoznany czerniakiem złośliwym skóry. Wszyscy uczestnicy badania byli ankietowani za pomocą obszernego kwestionariusza wywiadu. Od wszystkich uczestników została pobrana

krw żylna oraz dwukrotnie wykonano wymaz ze śluzówek policzka. Następnie przeprowadzono ogólnogenomową analizę metylacji DNA oraz ogólnogenomową analizę zmienności SNP (ang. Single Nucleotide Polymorphism) dla próbek pobranych od wszystkich uczestników badania z zastosowaniem technologii mikromacierzy Illuminy (Infinium® Global Screening Array i Infinium® MethylationEPIC 850K, Illumina). Na podstawie zebranych szczegółowych danych kwestionariuszowych została przeprowadzona analiza korelacji pomiędzy czynnikami środowiskowymi, danymi metylacyjnymi, danymi SNP a wystąpieniem czerniaka złośliwego skóry, a także został określony wiek epigenetyczny pacjentów za pomocą różnego rodzaju zegarów biologicznych opartych na metylacji DNA.

### **Wyniki.**

Ryzyko rozwoju czerniaka złośliwego istotnie zwiększało brak wyższego wykształcenia, korzystanie z solarium, a także przynajmniej jeden epizod oparzenia słonecznego w życiu. Pacjenci z rozpoznanym czerniakiem złośliwym charakteryzowali się bardziej nasilonym starzeniem i fotostarzeniem skóry twarzy w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak starzenie się skóry nie korelowało z wiekiem epigenetycznym. Pacjenci z czerniakiem inwazyjnym charakteryzowali się istotnie niższymi wartościami parametru tempa starzenia się PoAm niż pacjenci bez rozpozanego czerniaka złośliwego skóry. Ponadto pacjenci z czerniakiem zlokalizowanym na skórze twarzy charakteryzowali się istotnie wyższą średnią wartości parametru DNAmTL (tj. długością telomerów oszacowanej na podstawie metylacji DNA) w porównaniu do pacjentów u których czerniak został zdiagnozowany w lokalizacjach mniej nasłonecznionych. Podobną zależność wykazano pomiędzy czerniakiem wywodzącym się z plamy soczewicowatej a szerzącym się powierzchownie. W niniejszym badaniu nie wykazano bezpośredniej korelacji między danymi metylacyjnymi, czynnikami środowiskowymi a wystąpieniem czerniaka złośliwego skóry. Nie zidentyfikowano nowych, dotychczas nieznanymi wariantów SNP zwiększających podatność na zachorowanie na czerniaka złośliwego. Natomiast badana populacja polskich pacjentów z czerniakiem złośliwym skóry charakteryzowała się istotną predyspozycją genetyczną do jego rozwoju w zakresie wszystkich dotychczas odkrytych markerów SNP charakterystycznych dla czerniaka w populacji europejskiej.

### **Wnioski.**

Czerniak złośliwy skóry nie towarzyszy przyspieszonemu starzeniu się organizmu. Zaobserwowane w niniejszym badaniu wolniejsze tempo biologicznego starzenia się u



pacjentów z czerniakiem złośliwym skóry może sprawiać, że mają oni mniejsze ryzyko zachorowania na choroby związane z wiekiem, takie jak np. choroby układu krążenia czy nowotwór jelita grubego ale wymaga to szerszych badań. Natomiast starzenie się skóry nie koreluje z wiekiem epigenetycznym, zatem wygląd zewnętrzny nie jest dobrym predyktorem występowania chorób związanych z wiekiem. Zaobserwowane w niniejszej pracy pionierskie wyniki wydają się mieć bardzo praktyczne i interdyscyplinarne implikacje kliniczne.

**Słowa kluczowe.**

czerniak złośliwy, czynniki ryzyka, tempo starzenia, epigenetyka, SNP

## **8. Streszczenie pracy w języku angielskim (Summary)**

### **Introduction.**

Skin cancers are the most common cancers, and of these, the most aggressive type is malignant melanoma. Due to its rapid growth rate, dynamic development and frequent metastases, it is the most difficult to treat and therefore has the worst prognosis and the highest mortality rate. According to the latest epidemiological data, the incidence of melanoma is rapidly increasing at an alarming rate compared to any other type of cancer. The reasons for the extreme increase are only partially understood. Skin melanoma is a cancer with a high cure rate when the disease is limited to the skin. Detection of melanoma at an early stage, better understanding of the risk factors that increase its occurrence and their prevention are a priority to reduce mortality. Currently, the concept of melanoma oncogenesis is considered to be a multifactorial process involving genetic, epigenetic and environmental factors. Identification of genetic, epigenetic and environmental factors affecting the formation of melanoma may lead to improved prevention and diagnosis of melanoma, as well as early diagnosis of patients with an increased risk of progression and better oncological results.

### **Aim of the study.**

The aim of this doctoral dissertation was a comprehensive analysis of the pathogenesis of malignant melanoma of the skin, including the identification of environmental, epigenetic and genetic factors affecting the development of melanoma. In addition, for the first time in history, epigenetic age was characterized using different biological clocks based on DNA methylation, as well as age acceleration of patients diagnosed with malignant melanoma compared to the healthy population was determined.

### **Material and methods.**

The study was conducted in a group of 202 patients (research group - 101 people, control group - 101 people). Patients with newly or previously diagnosed malignant melanoma of the skin were included in the research group. All study participants were interviewed using an extensive interview questionnaire. Venous blood was collected from all participants and a buccal mucosa swab was performed twice. Genome DNA methylation and SNP (Single Nucleotide Polymorphism) analyses of all study subjects were performed using Illumina's microarray technology (Infinium® Global Screening Array and Infinium® MethylationEPIC 850K,

Illumina). Based on the collected detailed questionnaire data, an analysis of correlations between environmental factors, methylation data, SNP data and the occurrence of malignant melanoma was carried out, as well as the epigenetic age of patients was determined using various types of biological clocks based on DNA methylation.

### **Results.**

The risk of developing malignant melanoma was significantly increased by the lack of higher education, the use of a solarium, and at least one episode of sunburn in a lifetime. Patients diagnosed with malignant melanoma were characterized by more intense photoaging of the facial skin compared to the control group, however, skin aging did not correlate with epigenetic age. Patients diagnosed with invasive malignant melanoma were characterized by lower pace of aging described by PoAm parameter than patients without diagnosed malignant melanoma of the skin. Moreover, patients with melanoma located on the face were characterized by a significantly higher average value of the DNAmTL parameter (i.e. telomere length estimated on the basis of DNA methylation) compared to patients with melanoma diagnosed in other less sun-exposed locations. A similar relationship was demonstrated between lentigo melanoma and superficial spreading melanoma. In this study, no direct correlation was found between methylation data, environmental factors and the occurrence of malignant melanoma of the skin. No new, previously unknown SNP variants increasing the susceptibility to malignant melanoma were identified. On the other hand, the studied population of Polish patients with malignant melanoma was characterized by a significant genetic predisposition to its development in terms of all previously discovered SNP markers characteristic of melanoma in the European population.

### **Conclusions.**

Cutaneous malignant melanoma is not accompanied by accelerated aging of the body. The slower pace of biological aging observed in patients with cutaneous malignant melanoma may suggest that they have a lower risk of developing age-related diseases, such as cardiovascular diseases or colorectal cancer, but this requires further studies. On the other hand, skin aging does not correlate with epigenetic age, so external appearance is not a good predictor of age-related diseases. The pioneering results observed in this study seem to have very practical and interdisciplinary clinical implications.

**Key words:** malignant melanoma, risk factors, age acceleration, epigenetics, SNP

## 9. Piśmiennictwo

1. Biblioteka chirurga onkologa. Tom 12 | Via Medica [Internet]. [cited 2021 Nov 8]. Available from: <https://www.viamedica.pl/biblioteka-chirurga-onkologa-tom-12>
2. Davey MG, Miller N, McInerney NM. A Review of Epidemiology and Cancer Biology of Malignant Melanoma. *Cureus*. 2021 May 18;
3. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy. . Dostępne na stronie <http://onkologia.org.pl/raporty/> dostęp z dnia 15/listopad/2021.
4. RL S, KD M, A J. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2019 Jan [cited 2021 Nov 8];69(1):7–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30620402/>
5. S H. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* [Internet]. 2013 Oct 21 [cited 2021 Nov 2];14(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24138928/>
6. S H, M G, ME L, BC T, H K, H A, et al. An epigenetic clock analysis of race/ethnicity, sex, and coronary heart disease. *Genome Biol* [Internet]. 2016 Aug 11 [cited 2021 Nov 4];17(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27511193/>
7. M C, EM W, TL N, GS D, J S, PA D, et al. DNA methylation-based biological age, genome-wide average DNA methylation, and conventional breast cancer risk factors. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Nov 4];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31636290/>
8. Potrony M, Puig-Butille JA, Ribera-Sola M, Iyer V, Robles-Espinoza CD, Aguilera P, et al. POT1 germline mutations but not TERT promoter mutations are implicated in melanoma susceptibility in a large cohort of Spanish melanoma families. *Br J Dermatol* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2021 Nov 12];181(1):105–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30451293/>
9. Toussi A, Mans N, Welborn J, Kiuru M. Germline mutations predisposing to melanoma. *J Cutan Pathol* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Nov 12];47(7):606–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32249949/>
10. Malińska K, Deptuła J, Rogoża-Janiszewska E, Górski B, Scott R, Rudnicka H, et al. Constitutional variants in POT1, TERF2IP, and ACD genes in patients with melanoma in the Polish population. *Eur J Cancer Prev* [Internet]. 2020 [cited 2021 Nov 12];29(6):511–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32976206/>

11. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* [Internet]. 2002 [cited 2021 Nov 12];12(4):390–401. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12095893/>
12. Candido S, Rapisarda V, Marconi A, Malaponte G, Bevelacqua V, Gangemi P, et al. Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. *Oncol Rep* [Internet]. 2014 Mar [cited 2021 Nov 15];31(3):1079–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24424406/>
13. Reddy BY, Miller DM, Tsao H. Somatic driver mutations in melanoma. *Cancer* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Nov 15];123(S11):2104–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28543693/>
14. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* [Internet]. 2011 [cited 2021 Nov 17];2(3):135–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21411864/>
15. Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: An integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2014;9:239–71.
16. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2021 Nov 15];33(1):19–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12447372/>
17. Leonardi GC, Accardi G, Monastero R, Nicoletti F, Libra M. Ageing: from inflammation to cancer. *Immun Ageing* [Internet]. 2018 Jan 19 [cited 2021 Nov 15];15(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29387133/>
18. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016 May 25;16(6):345–58.
19. Farmer ER, Gonin R, Hanna MP. Discordance in the histopathologic diagnosis of melanoma and melanocytic nevi between expert pathologists. *Hum Pathol*. 1996;27(6):528–31.
20. Dzwierzynski WW. Managing malignant melanoma. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(3).
21. Rigel DS. Epidemiology of melanoma. *Semin Cutan Med Surg* [Internet]. 2010 Dec [cited 2021 Nov 14];29(4):204–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21277533/>
22. Feigelson HS, Powers JD, Kumar M, Carroll NM, Pathy A, Ritzwoller DP. Melanoma incidence, recurrence, and mortality in an integrated healthcare system: A retrospective

- cohort study. *Cancer Med* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2021 Nov 14];8(9):4508–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31215776/>
23. Geller J, Swetter SM, Leyson J, Miller DR, Brooks K, Geller AC. Crafting a melanoma educational campaign to reach middle-aged and older men. *J Cutan Med Surg* [Internet]. 2006 Nov [cited 2021 Nov 14];10(6):259–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17241595/>
  24. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* [Internet]. 1999 Apr 29 [cited 2021 Nov 13];340(17):1341–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10219070/>
  25. Eide MJ, Weinstock MA. Association of UV index, latitude, and melanoma incidence in nonwhite populations - US Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program, 1992 to 2001. *Arch Dermatol*. 2005 Apr;141(4):477–81.
  26. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* [Internet]. 2005 Jan [cited 2021 Nov 13];41(1):45–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15617990/>
  27. Oliveria SA, Saraiya M, Geller AC, Heneghan MK, Jorgensen C. Sun exposure and risk of melanoma. *Arch Dis Child*. 2006 Feb;91(2):131–8.
  28. Archier E, Devaux S, Castela E, Gallini A, Aubin F, le Maître M, et al. Carcinogenic risks of Psoralen UV-A therapy and Narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: A systematic literature review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2012 May;26(SUPPL. 3):22–31.
  29. Green A, Autier P, Boniol M, Boyle P, Doré JF, Gandini S, et al. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer* [Internet]. 2007 Mar 1 [cited 2021 Nov 13];120(5):1116–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17131335/>
  30. Kowal-Vern A, Criswell BK. Burn scar neoplasms: a literature review and statistical analysis. *Burns* [Internet]. 2005 Jun [cited 2021 Nov 13];31(4):403–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15896501/>
  31. Yang K, Fung TT, Nan H. An Epidemiological Review of Diet and Cutaneous Malignant Melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2021 Nov 12];27(10):1115–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30018150/>

32. Ali Z, Yousaf N, Larkin J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl* [Internet]. 2013 Sep [cited 2021 Nov 13];11(2):81–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26217116/>
33. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* [Internet]. 1988 Jun 1 [cited 2021 Nov 13];124(6):869–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3377516/>
34. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H, Corona R. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol* [Internet]. 2003 Dec [cited 2021 Nov 13];139(12):1620–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14676081/>
35. Ribero S, Stucci LS, Marra E, Marconcini R, Spagnolo F, Orgiano L, et al. Effect of age on melanoma risk, prognosis and treatment response. Vol. 98, *Acta Dermatovenereologica*. 2018.
36. Kubica AW, Brewer JD. Melanoma in immunosuppressed patients. *Mayo Clin Proc*. 2012;87(10):991–1003.
37. Hawkes JE, Truong A, Meyer LJ. Genetic predisposition to melanoma. *Semin Oncol* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Nov 12];43(5):591–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27899192/>
38. Takebe H, Nishigori C, Tatsumi K. Melanoma and other skin cancers in xeroderma pigmentosum patients and mutation in their cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 1989;92(5 SUPPL.):236–8.
39. Melanoma | Fitzpatrick’s Dermatology, 9e | AccessMedicine | McGraw Hill Medical [Internet]. [cited 2021 Nov 17]. Available from: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2570&sectionid=210435350>
40. Elder DE, Bastian BC, Cree IA, Massi D, Scolyer RA. The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2020 [cited 2021 Nov 17];144(4):500–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32057276/>
41. Demierre MF, Chung C, Miller DR, Geller AC. Early detection of thick melanomas in the United States: beware of the nodular subtype. *Arch Dermatol* [Internet]. 2005 Jun [cited 2021 Nov 17];141(6):745–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15967921/>

42. Tosti A, Piraccini BM, de Farias DC. Dealing with Melanonychia. *Semin Cutan Med Surg*. 2009 Mar;28(1):49–54.
43. Barrett JH, Taylor JC, Bright C, Harland M, Dunning AM, Akslen LA, et al. Fine mapping of genetic susceptibility loci for melanoma reveals a mixture of single variant and multiple variant regions. *Int J Cancer* [Internet]. 2015 Mar 15 [cited 2021 Nov 15];136(6):1351–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25077817/>
44. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F, Bishop DT, et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet* [Internet]. 2007 [cited 2021 Nov 15];44(2):99–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16905682/>
45. Helgadottir H, Hoiom V, Tuominen R, Nielsen K, Jonsson G, Olsson H, et al. Germline CDKN2A mutation status and survival in familial melanoma cases. *J Natl Cancer Inst*. 2016 Nov 1;108(11).
46. Soura E, Eliades PJ, Shannon K, Stratigos AJ, Tsao H. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management Emerging melanoma cancer complexes and genetic counseling. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Mar 1;74(3):395–407.
47. Soura E, Eliades PJ, Shannon K, Stratigos AJ, Tsao H. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2021 Nov 15];74(3):411–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26892650/>
48. Puntervoll HE, Yang XR, Vetti HH, Bachmann IM, Avril MF, Benfodda M, et al. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. *J Med Genet* [Internet]. 2013 [cited 2021 Nov 15];50(4):264–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23384855/>
49. Bottillo I, la Starza R, Radio FC, Molica C, Pedace L, Pierini T, et al. A novel germline mutation in CDK4 codon 24 associated to familial melanoma. *Clin Genet*. 2018 Apr 1;93(4):934–5.
50. Masoomian B, Shields JA, Shields CL. Overview of BAP1 cancer predisposition syndrome and the relationship to uveal melanoma. *J Curr Ophthalmol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 Nov 16];30(2):102–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29988936/>



51. Carbone M, Harbour JW, Brugarolas J, Bononi A, Pagano I, Dey A, et al. Biological mechanisms and clinical significance of BAP1 mutations in human cancer. *Cancer Discov.* 2020;10(8):1103–20.
52. Haugh AM, Njauw CN, Bublely JA, Verzi AE, Zhang B, Kudalkar E, et al. Genotypic and Phenotypic Features of BAP1 Cancer Syndrome: A Report of 8 New Families and Review of Cases in the Literature. *JAMA Dermatol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2021 Nov 16];153(10):999–1006. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28793149/>
53. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *New England Journal of Medicine.* 2015 Nov 12;373(20):1926–36.
54. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science (1979).* 2013 Feb 22;339(6122):959–61.
55. Harland M, Petljak M, Robles-Espinoza CD, Ding Z, Gruis NA, van Doorn R, et al. Germline TERT promoter mutations are rare in familial melanoma. *Fam Cancer.* 2016 Jan 1;15(1):139–44.
56. Dratwa M, Wysoczańska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT—Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front Immunol.* 2020 Nov 19;11.
57. Müller C, Kronic M, Wendt J, von Haeseler A, Okamoto I. Germline Variants in the POT1-Gene in High-Risk Melanoma Patients in Austria. *G3 (Bethesda)* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2021 Nov 16];8(5):1475–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29523635/>
58. Aoude LG, Pritchard AL, Robles-Espinoza CD, Wadt K, Harland M, Choi J, et al. Nonsense mutations in the shelterin complex genes ACD and TERF2IP in familial melanoma. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2021 Nov 16];107(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25505254/>
59. Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2021 Nov 16];480(7375):99–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22080950/>
60. Berwick M, Macarthur J, Orlow I, Kanetsky P, Begg CB, Luo L, et al. MITF E318K's effect on melanoma risk independent of, but modified by, other risk factors. *Pigment*

- Cell Melanoma Res [Internet]. 2014 May 1 [cited 2021 Nov 16];27(3):485–8.  
Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24406078/>
61. Sturm RA, Fox C, McClenahan P, Jagirdar K, Ibarrola-Villava M, Banan P, et al. Phenotypic characterization of nevus and tumor patterns in MITF E318K mutation carrier melanoma patients. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Nov 16];134(1):141–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23774529/>
  62. Chen S, Han C, Miao X, Li X, Yin C, Zou J, et al. Targeting MC1R depalmitoylation to prevent melanomagenesis in redheads. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Nov 16];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30787281/>
  63. Pasquali E, García-Borrón JC, Fagnoli MC, Gandini S, Maisonneuve P, Bagnardi V, et al. MC1R variants increased the risk of sporadic cutaneous melanoma in darker-pigmented Caucasians: a pooled-analysis from the M-SKIP project. *Int J Cancer* [Internet]. 2015 Feb 15 [cited 2021 Nov 16];136(3):618–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24917043/>
  64. Kanetsky PA, Hay JL. Marshaling the Translational Potential of MC1R for Precision Risk Assessment of Melanoma. *Cancer Prev Res (Phila)* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Nov 16];11(3):121–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29246956/>
  65. Taylor NJ, Busam KJ, From L, Groben PA, Anton-Culver H, Cust AE, et al. Inherited variation at MC1R and histological characteristics of primary melanoma. *PLoS One* [Internet]. 2015 Mar 19 [cited 2021 Nov 16];10(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25790105/>
  66. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2009 Sep 13;31(1):27–36.
  67. Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* [Internet]. 2011 Mar [cited 2021 Nov 17];17(3):330–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21386836/>
  68. Sigalotti L, Covre A, Fratta E, Parisi G, Colizzi F, Rizzo A, et al. Epigenetics of human cutaneous melanoma: setting the stage for new therapeutic strategies. *J Transl Med* [Internet]. 2010 Jun 11 [cited 2021 Nov 17];8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20540720/>
  69. Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases. *undefined*. 2018 Mar 1;5(1):1–8.

70. Gambichler T, Sand M, Skrygan M. Loss of 5-hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation 2 protein expression in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2013 Jun;23(3):218–20.
71. Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of Melanoma. *Cell.* 2012 Sep 14;150(6):1135–46.
72. Güvenç C, Neckebroek F, Antoranz A, Garmyn M, van den Oord J, Bosisio FM. Bona Fide Tumor Suppressor Genes Hypermethylated in Melanoma: A Narrative Review. *Int J Mol Sci [Internet].* 2021 Oct 1 [cited 2021 Nov 17];22(19). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34639015/>
73. Sarkar D, Leung EY, Baguley BC, Finlay GJ, Askarian-Amiri ME. Epigenetic regulation in human melanoma: Past and future. *Epigenetics.* 2014;10(2):103–21.
74. Josselyn S, Frankland PW. Another twist in the histone memory code. *Cell Res [Internet].* 2015 Feb 5 [cited 2021 Nov 17];25(2):151–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25342557/>
75. Xu S, Hui Y, Shu J, Qian J, Li L. Characterization of the human mucin 5AC promoter and its regulation by the histone acetyltransferase P300. *Int J Mol Med [Internet].* 2019 Mar 1 [cited 2021 Nov 17];43(3):1263–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30628655/>
76. Saha K, Hornyak TJ, Eckert RL. Epigenetic cancer prevention mechanisms in skin cancer. *AAPS Journal.* 2013;15(4):1064–71.
77. Chory EJ, Calarco JP, Hathaway NA, Bell O, Neel DS, Crabtree GR. Nucleosome Turnover Regulates Histone Methylation Patterns over the Genome. *Mol Cell [Internet].* 2019 Jan 3 [cited 2021 Nov 17];73(1):61-72.e3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30472189/>
78. Orouji E, Utikal J. Tackling malignant melanoma epigenetically: histone lysine methylation. *Clin Epigenetics [Internet].* 2018 Nov 22 [cited 2021 Nov 17];10(1):145. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30466474/>
79. Ceol CJ, Houvras Y, Jane-Valbuena J, Bilodeau S, Orlando DA, Battisti V, et al. The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature [Internet].* 2011 Mar 24 [cited 2021 Nov 17];471(7339):513–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21430779/>

80. BK K, SL B, A B, J C, AM C, ES E, et al. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell* [Internet]. 2014 Nov 6 [cited 2021 Nov 2];159(4):709–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25417146/>
81. Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging*. 2018;10(4).
82. Mitnitski A, Collerton J, Martin-Ruiz C, Jagger C, von Zglinicki T, Rockwood K, et al. Age-related frailty and its association with biological markers of ageing. *BMC Med* [Internet]. 2015 Jul 13 [cited 2021 Nov 18];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26166298/>
83. G H, J G, L Z, L Z, G H, S S, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell* [Internet]. 2013 Jan 24 [cited 2021 Nov 4];49(2):359–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23177740/>
84. S H, K R. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 Nov 4];19(6):371–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29643443/>
85. Lu AT, Quach A, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Raj K, et al. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging*. 2019 Jan 1;11(2):303–27.
86. Levine ME, Lu AT, Chen BH, Hernandez DG, Singleton AB, Ferrucci L, et al. Menopause accelerates biological aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 16;113(33):9327–32.
87. Lee KWK, Pausova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Front Genet*. 2013;4(JUL).
88. Dmitrijeva M, Ossowski S, Serrano L, Schaefer MH. Tissue-specific DNA methylation loss during ageing and carcinogenesis is linked to chromosome structure, replication timing and cell division rates. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Aug 21 [cited 2021 Nov 18];46(14):7022–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29893918/>
89. Shibata D. Inferring human stem cell behaviour from epigenetic drift. *J Pathol* [Internet]. 2009 Jan [cited 2021 Nov 18];217(2):199–205. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19031430/>
90. Wan ES, Qiu W, Carey VJ, Morrow J, Bacherman H, Foreman MG, et al. Smoking-Associated Site-Specific Differential Methylation in Buccal Mucosa in the COPD Gene Study. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2021 Nov 18];53(2):246–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25517428/>

91. Raddatz G, Hagemann S, Aran D, Söhle J, Kulkarni PP, Kaderali L, et al. Aging is associated with highly defined epigenetic changes in the human epidermis. *Epigenetics Chromatin* [Internet]. 2013 [cited 2021 Nov 18];6(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24279375/>
92. Klutstein M, Moss J, Kaplan T, Cedar H. Contribution of epigenetic mechanisms to variation in cancer risk among tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Feb 28;114(9):2230–4.
93. Durso DF, Bacalini MG, Sala C, Pirazzini C, Marasco E, Bonafé M, et al. Acceleration of leukocytes' epigenetic age as an early tumor and sex-specific marker of breast and colorectal cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [cited 2021 Nov 18];8(14):23237–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28423572/>
94. Levine ME, Hosgood HD, Chen B, Absher D, Assimes T, Horvath S. DNA methylation age of blood predicts future onset of lung cancer in the women's health initiative. *Aging* [Internet]. 2015 [cited 2021 Nov 18];7(9):690–700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26411804/>
95. Landi MT, Bishop DT, MacGregor S, Machiela MJ, Stratigos AJ, Ghiorzo P, et al. Genome-wide association meta-analyses combining multiple risk phenotypes provide insights into the genetic architecture of cutaneous melanoma susceptibility. *Nat Genet*. 2020;52(5).
96. Browning BL, Tian X, Zhou Y, Browning SR. Fast two-stage phasing of large-scale sequence data. *Am J Hum Genet*. 2021;108(10).
97. Browning BL, Zhou Y, Browning SR. A One-Penny Imputed Genome from Next-Generation Reference Panels. *Am J Hum Genet*. 2018;103(3).
98. Fortin JP, Triche TJ, Hansen KD. Preprocessing, normalization and integration of the Illumina HumanMethylationEPIC array with minfi. *Bioinformatics*. 2017;33(4).
99. Smith JA, Rasky J, Ratliff SM, Liu J, Kardina SLR, Turner ST, et al. Intrinsic and extrinsic epigenetic age acceleration are associated with hypertensive target organ damage in older African Americans. *BMC Med Genomics*. 2019;12(1).
100. Lu AT, Seeboth A, Tsai PC, Sun D, Quach A, Reiner AP, et al. DNA methylation-based estimator of telomere length. *Aging*. 2019;11(16).
101. Belsky DW, Caspi A, Arseneault L, Baccarelli A, Corcoran D, Gao X, et al. Quantification of the pace of biological aging in humans through a blood test, the DunedinPoAm DNA methylation algorithm. *Elife*. 2020;9.

102. Zhang Y, Wilson R, Heiss J, Breitling LP, Saum KU, Schöttker B, et al. DNA methylation signatures in peripheral blood strongly predict all-cause mortality. *Nat Commun.* 2017;8.
103. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: Epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. Vol. 28, *In Vivo.* 2014.
104. Martin-Gorgojo A, Llinares M, Virós A, Requena C, Garcia-Casado Z, Traves V, et al. Cutaneous melanoma primary site is linked to nevus density. *Oncotarget.* 2017;8(58).
105. O'Neill CH, Scoggins CR. Melanoma. Vol. 120, *Journal of Surgical Oncology.* 2019.
106. K. V, D. B, A. B, S. L, M. D. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. *Environ Health.* 2012;11(SUPPL.1).
107. Hay J, Dibonaventura M, Baser R, Press N, Shoveller J, Bowen D. Personal attributions for melanoma risk in melanoma-affected patients and family members. *J Behav Med.* 2011;34(1).
108. Behrens G, Niedermaier T, Berneburg M, Schmid D, Leitzmann MF. Physical activity, cardiorespiratory fitness and risk of cutaneous malignant melanoma: Systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2018;13(10).
109. Moehrle M. Outdoor sports and skin cancer. *Clin Dermatol.* 2008;26(1).
110. Cohen JM, Li YT, Wu S, Han J, Qureshi AA, Cho E. Sleep duration and sleep-disordered breathing and the risk of melanoma among US women and men. Vol. 54, *International Journal of Dermatology.* 2015.
111. Asgari MM, Maruti SS, Kushi LH, White E. Antioxidant Supplementation and Risk of Incident Melanomas. *Arch Dermatol.* 2009;145(8).
112. Hercberg S, Ezzedine K, Guinot C, Preziosi P, Galan P, Bertrais S, et al. Antioxidant supplementation increases the risk of skin cancers in women but not in men. *Journal of Nutrition.* 2007;137(9).
113. Liyanage UE, Law MH, Ong JS, Cust AE, Mann GJ, Ward S v., et al. Polyunsaturated fatty acids and risk of melanoma: A Mendelian randomisation analysis. *Int J Cancer.* 2018;143(3).
114. Yew YW, Lai YC, Schwartz RA. Coffee Consumption and Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. Vol. 17, *American Journal of Clinical Dermatology.* 2016.
115. Wang J, Li X, Zhang D. Coffee consumption and the risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis. Vol. 55, *European Journal of Nutrition.* 2016.

116. Liu J, Shen B, Shi M, Cai J. Higher caffeinated coffee intake is associated with reduced malignant melanoma risk: A meta-analysis Study. *PLoS One*. 2016;11(1).
117. Ravi D, Muniyappa H, Das KC. Caffeine inhibits UV-mediated NF- $\kappa$ B activation in A2058 melanoma cells: An ATM-PKC $\delta$ -p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol Cell Biochem*. 2008;308(1–2).
118. Conney AH, Lu YP, Lou YR, Kawasumi M, Nghiem P. Mechanisms of caffeine-induced inhibition of UVB carcinogenesis. Vol. 3 JUN, *Frontiers in Oncology*. 2013.
119. Caini S, Masala G, Saieva C, Kvaskoff M, Savoye I, Sacerdote C, et al. Coffee, tea and melanoma risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2017;140(10).
120. Wu S, Han J, Feskanich D, Cho E, Stampfer MJ, Willett WC, et al. Citrus consumption and risk of cutaneous malignant melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(23).
121. Sayre RM, Dowdy JC. The increase in melanoma: Are dietary furocoumarins responsible? *Med Hypotheses*. 2008;70(4).
122. Sondermeijer L, Lamboo LGE, de Waal AC, Galesloot TE, Kiemeny LALM, van Rossum M, et al. Cigarette smoking and the risk of cutaneous melanoma: A case-control study. *Dermatology*. 2020;236(3).
123. Merimsky O, Inbar M. Cigarette smoking and skin cancer. Vol. 16, *Clinics in Dermatology*. 1998.
124. Wehner MR, Chren MM, Nameth D, Choudhry A, Gaskins M, Nead KT, et al. International Prevalence of Indoor Tanning. *JAMA Dermatol*. 2014;150(4).
125. An S, Kim K, Moon S, Ko KP, Kim I, Lee JE, et al. Indoor tanning and the risk of overall and early-onset melanoma and non-melanoma skin cancer: Systematic review and meta-analysis. Vol. 13, *Cancers*. 2021.
126. de Ann L, Vogel RI, Weinstock MA, Nelson HH, Ahmed RL, Berwick M. Association between indoor tanning and melanoma in younger men and women. *JAMA Dermatol*. 2016;152(3).
127. Schneider S, Krämer H. Who uses sunbeds? A systematic literature review of risk groups in developed countries. Vol. 24, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2010.
128. Whiteman DC, Stickley M, Watt P, Hughes MC, Davis MB, Green AC. Anatomic site, sun exposure, and risk of cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(19).

129. Wu S, Han J, Laden F, Qureshi AA. Long-term ultraviolet flux, other potential risk factors, and skin cancer risk: A cohort Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2014;23(6).
130. Holman CD arcy J, Armstrong BK. Cutaneous malignant melanoma and indicators of total accumulated exposure to the sun: An analysis separating histogenetic types. *J Natl Cancer Inst*. 1984;73(1).
131. Ward EM, Burnett CA, Ruder A, Davis-King K. Industries and cancer. Vol. 8, *Cancer Causes and Control*. 1997.
132. Li WQ, Qureshi AA, Ma J, Goldstein AM, Giovannucci EL, Stampfer MJ, et al. Personal history of prostate cancer and increased risk of incident melanoma in the United States. Vol. 31, *Journal of Clinical Oncology*. 2013.
133. de Giorgi V, Gori A, Savarese I, D'Errico A, Scarfi F, Papi F, et al. Role of BMI and hormone therapy in melanoma risk: a case–control study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;143(7).
134. Sergentanis TN, Antoniadis AG, Gogas HJ, Antonopoulos CN, Adami HO, Ekblom A, et al. Obesity and risk of malignant melanoma: A meta-analysis of cohort and case-control studies. *Eur J Cancer*. 2013;49(3).
135. Ahmed B, Qadir MI, Ghafoor S. Malignant melanoma: Skin cancer—diagnosis, prevention, and treatment. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2020;30(4):291–7.
136. Hartman RI, Lin JY. Cutaneous Melanoma-A Review in Detection, Staging, and Management. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Nov 12];33(1):25–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30497675/>
137. Palve JS, Korhonen NJ, Luukkaala TH, Kääriäinen MT. Differences in risk factors for melanoma in young and middle-aged higher-risk patients. *In Vivo (Brooklyn)*. 2020;34(2).
138. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, et al. Final Trial Report of Sentinel-Node Biopsy versus Nodal Observation in Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(7).
139. Cavanaugh-Hussey MW, Mu EW, Kang S, Balch CM, Wang T. Older Age is Associated with a Higher Incidence of Melanoma Death but a Lower Incidence of Sentinel Lymph Node Metastasis in the SEER Databases (2003–2011). *Ann Surg Oncol*. 2015;22(7).
140. Balch CM, Thompson JF, Gershenwald JE, Soong SJ, Ding S, McMasters KM, et al. Age as a predictor of sentinel node metastasis among patients with localized



- melanoma: An inverse correlation of melanoma mortality and incidence of sentinel node metastasis among young and old patients. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(4).
141. Ribero S, Moscarella E, Ferrara G, Piana S, Argenziano G, Longo C. Regression in cutaneous melanoma: a comprehensive review from diagnosis to prognosis. Vol. 30, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2016.
  142. Rajaei A, Sadr-Eshkevari P, McMasters KM, Egger ME. Predictors of Nonsentinel Lymph Node Metastasis in Cutaneous Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 260, *Journal of Surgical Research*. 2021.
  143. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Coit DG, Atkins MB, et al. Age as a prognostic factor in patients with localized melanoma and regional metastases. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(12).
  144. Sanlorenzo M, Ribero S, Osella-Abate S, Zugna D, Marengo F, Macripò G, et al. Prognostic differences across sexes in melanoma patients: What has changed from the past? *Melanoma Res*. 2014;24(6).
  145. Ribero S, Davies JR, Requena C, Carrera C, Glass D, Rull R, et al. High nevus counts confer a favorable prognosis in melanoma patients. *Int J Cancer*. 2015;137(7).
  146. Choi JY, James SR, Link PA, Mccann SE, Hong CC, Davis W, et al. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*. 2009;30(11).
  147. Lim U, Flood A, Choi SW, Albanes D, Cross AJ, Schatzkin A, et al. Genomic Methylation of Leukocyte DNA in Relation to Colorectal Adenoma Among Asymptomatic Women. *Gastroenterology*. 2008;134(1).
  148. Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C, Real FX, Kogevinas M, Silverman D, et al. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol*. 2008;9(4).
  149. Di JZ, Han XD, Gu WY, Wang Y, Zheng Q, Zhang P, et al. Association of hypomethylation of LINE-1 repetitive element in blood leukocyte DNA with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2011;12(10).
  150. Hou L, Wang H, Sartori S, Gawron A, Lissowska J, Bollati V, et al. Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high-risk Polish population. *Int J Cancer*. 2010;127(8).
  151. Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD, et al. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck

- squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2007;16(1).
152. Hyland PL, Burke LS, Pfeiffer RM, Mirabello L, Tucker MA, Goldstein AM, et al. LINE-1 methylation in peripheral blood and the risk of melanoma in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations. *Melanoma Res*. 2013;23(1).
  153. Cappetta M, Berdasco M, Hochmann J, Bonilla C, Sans M, Hidalgo PC, et al. Effect of genetic ancestry on leukocyte global DNA methylation in cancer patients. *BMC Cancer*. 2015;15(1).
  154. Shen J, Song R, Wan J, Huff C, Fang S, Lee JE, et al. Global methylation of blood leukocyte DNA and risk of melanoma. *Int J Cancer*. 2017;140(7).
  155. Dobre EG, Constantin C, Costache M, Neagu M. Interrogating epigenome toward personalized approach in cutaneous melanoma. Vol. 11, *Journal of Personalized Medicine*. 2021.
  156. Ruiz-Hernandez A, Kuo CC, Rentero-Garrido P, Tang WY, Redon J, Ordovas JM, et al. Environmental chemicals and DNA methylation in adults: A systematic review of the epidemiologic evidence. Vol. 7, *Clinical Epigenetics*. 2015.
  157. Mahmoud AM, Ali MM. Methyl donor micronutrients that modify DNA methylation and cancer outcome. Vol. 11, *Nutrients*. 2019.
  158. Kumsta R, Marzi SJ, Viana J, Dempster EL, Crawford B, Rutter M, et al. Severe psychosocial deprivation in early childhood is associated with increased DNA methylation across a region spanning the transcription start site of CYP2E1. *Transl Psychiatry*. 2016;6(6).
  159. Tsaprouni LG, Yang TP, Bell J, Dick KJ, Kanoni S, Nisbet J, et al. Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics*. 2014;9(10).
  160. Nair-Shalliker V, Dhillon V, Clements M, Armstrong BK, Fenech M. The association between personal sun exposure, serum vitamin D and global methylation in human lymphocytes in a population of healthy adults in South Australia. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2014;765.
  161. Mittal A, Piyathilake C, Hara Y, Katiyar SK. Exceptionally High Protection of Photocarcinogenesis by Topical Application of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate in Hydrophilic Cream in SKH-1 Hairless Mouse Model: Relationship to Inhibition of UVB-Induced Global DNA Hypomethylation. *Neoplasia*. 2003;5(6).

162. Micevic G, Theodosakis N, Bosenberg M. Aberrant DNA methylation in melanoma: biomarker and therapeutic opportunities. Vol. 9, *Clinical Epigenetics*. 2017.
163. Gutiérrez-Castañeda LD, Nova JA, Tovar-Parra JD. Frequency of mutations in BRAF, NRAS, and KIT in different populations and histological subtypes of melanoma: A systemic review. *Melanoma Res*. 2020;
164. Tanemura A, Terando AM, Sim MS, van Hoesel AQ, de Maat MFG, Morton DL, et al. CpG Island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(5).
165. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives. Vol. 16, *Trends in Molecular Medicine*. 2010.
166. Bowen RL, Atwood CS. Living and Dying for Sex. *Gerontology*. 2004;50(5).
167. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274).
168. Ribero S, Mangino M, Bataille V. Skin phenotypes can offer some insight about the association between telomere length and cancer susceptibility. *Med Hypotheses*. 2016;97.
169. Bodelon C, Pfeiffer RM, Bollati V, Debbache J, Calista D, Ghiorzo P, et al. On the Interplay of Telomeres, Nevi and the Risk of Melanoma. *PLoS One*. 2012;7(12).
170. Nan H, Du M, de Vivo I, Manson JAE, Liu S, McTiernan A, et al. Shorter telomeres associate with a reduced risk of melanoma development. *Cancer Res*. 2011;71(21).
171. Han J, Qureshi AA, Prescott J, Guo Q, Ye L, Hunter DJ, et al. A prospective study of telomere length and the risk of skin cancer. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(2).
172. Ribero S, Davies JR, Requena C, Carrera C, Glass D, Rull R, et al. High nevus counts confer a favorable prognosis in melanoma patients. *Int J Cancer*. 2015;137(7).
173. Peeper DS. Oncogene-induced senescence and melanoma: Where do we stand? Vol. 24, *Pigment Cell and Melanoma Research*. 2011.
174. Wright F, Weller RB. Risks and benefits of UV radiation in older people: More of a friend than a foe? Vol. 81, *Maturitas*. 2015.
175. Peters CE, Demers PA, Kalia S, Hystad P, Villeneuve PJ, Nicol AM, et al. Occupational exposure to solar ultraviolet radiation and the risk of prostate cancer. *Occup Environ Med*. 2016;73(11).

