

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program

Hygiena, preventivní lékařství

Psoriáza a její komorbidity. Vzájemný vztah nemoci a procesu stárnutí.

Psoriasis and its comorbidities. Mutual relationship of the disease and the process of aging.

MUDr. Pavel Borský

Školitel: prof. Ing. Zdeněk Fiala, CSc.

Školitel konzultant: prof. MUDr. Lenka Borská, Ph.D.

Hradec Králové, 2022

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde byla užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2022

Pavel Borský

Poděkování

Rád bych na tomto místě v první řadě poděkoval svému školiteli prof. Ing. Zdeňku Fialovi, CSc. za odborné vedení, pomoc, schopnost naslouchat, cenné informace a veškeré konzultace a paní přednostce prof. MUDr. Lence Borské, Ph.D. za vytvoření kvalitního vědeckého zázemí pro mou práci, četné konzultace a pochopení pro mé nadšení z nových vědeckých poznatků.

Speciální poděkování bych rád vyjádřil všem mým kolegům z Ústavu Preventivního lékařství, neboť bez kvalitní týmové práce by žádná ze studií nemohla proběhnout a žádný z našich výsledků by nemohl spatřit světlo akademického světa.

Dále můj velký dík patří všem kolegům z Kliniky nemocí pohlavních a kožních (MUDr. Květoslava Hamáková), Transfuzního oddělení (MUDr. Jitka Černožorská, MUDr. Vít Řeháček), Ústavu klinické alergologie a imunologie (prof. RNDr. Ctirad Andrýs, CSc., MUDr. Pavlína Králíčková, Ph.D., prof. RNDr. Jan Krejsek CSc., Mgr. Tereza Švadláková), Ústavu klinické biochemie a diagnostiky (Mgr. Ing. Ivana Baranová, Ph.D., prof. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D., PharmDr. Natálie Birknerová, Mgr. Marcela Chmelařová, Ph.D., Ing. Helena Kovaříková, Ph.D. prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc.), Ústavu lékařské biofyziky (prof. Ing. Jan Kremláček, Ph.D.), Ústavu patologické fyziologie (prof. MUDr. Miroslav Kuba, CSc., prof. MUDr. Zuzana Kubová, CSc., MUDr. Jana Langrová, Ph.D., MUDr. Andrea Málková, Ph.D., MUDr. Jana Szanyi, Ph.D.) za vynikající mezioborovou spolupráci.

Děkuji také všem pacientům zapojeným do studie.

Experimentální práce byly finančně podpořeny projektem specifického výzkumu SVV-260397/2017 a SVV-260543/2020, a projektem Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové PROGRES Q40/09, Q40-10 a Q40-11.

Obsah

Použité zkratky.....	7
Souhrn.....	11
Summary.....	15
A Teoretická část.....	19
1 Psoriáza (charakteristika, epidemiologie, patofyziologie a etiologie).....	19
2 Komorbidity psoriázy.....	22
3 Proces stárnutí.....	26
3.1 Změněná mezibuněčná komunikace.....	28
3.2 Epigenetické změny.....	30
3.3 Genomová nestabilita.....	31
3.4 Zkracování telomer.....	32
3.5 Ostatní znaky stárnutí.....	33
4 Ukazatele stárnutí a biologický věk.....	36
5 Stárnutí, psoriáza a zánět.....	40
6 Psoriáza a ukazatele stárnutí.....	43
B Cíle dizertační práce.....	45
C Experimentální část.....	46
1 Metody a soubor nemocných.....	46
1.1 Charakteristika souborů a náplň studií.....	46
1.2 Odběry krve a analýzy vybraných parametrů ze séra.....	47
1.3 Odběry krve a analýzy vybraných parametrů z plné krve.....	48
1.4 Statistické vyhodnocení.....	49
1.5 Determinace tíže onemocnění.....	49
1.6 Charakteristiky fyziologického stavu (BMI, MetS).....	49
2 Výsledky.....	50
2.1 Výsledky první studie (hladiny alarminů).....	50
2.2 Výsledky druhé studie	52
2.2.1 Hladiny endocanu, VEGF, IL-17 a CRP.....	52

2.2.2 Úroveň methylace DNA stanovená metodou <i>epigenetic clock</i>	53
2.3 Výsledky třetí studie.....	57
2.3.1 Úroveň globální methylace DNA.....	57
2.3.2 Hladiny oxidačního poškození.....	60
2.3.3 Délka telomer--.....	60
3 Diskuze.....	62
3.1 Alarminy.....	62
3.2 CRP.....	64
3.3 Endocan, VEGF ,IL-17 a <i>epigenetic clock</i>	65
3.4 Globální methylace.....	69
3.5 Oxidační poškození.....	70
3.6 Délka telomer.....	71
3.7 Prevence psoriatických.....	73
4 Závěry.....	77
4.1 Závěry prvního cíle.....	77
4.2 Závěry druhého cíle.....	78
4.3 Vyhodnocení hypotézy.....	78
4.4 Analýza nejistot.....	78
4.5 Další přínosy disertační práce.....	78
D Seznam citací použité literatury.....	82

Použité zkratky

% 5-mC = Procento 5-methylcytosine v DNA

APOE = Apolipoprotein E

ATP = Adenosintrifosfát

BMI = Index tělesné hmotnosti

Ca²⁺ = Vápníkový kation

CARD14 = Gen s názvem CARD14

CD = Crohnova choroba

CD4⁺ = Lymfocyt s povrchovým glykoproteinem CD4

CD8⁺ = Lymfocyt s povrchovým glykoproteinem CD8

CNIO = Španělský Národní institut pro výzkum onkologických onemocnění

CpG = cytosin-fosfát-guaninové

CRP = C-reaktivní protein

DAMPs = damage associated molecular patterns

DDR = DNA damage response

DNA = Deoxyribonukleová kyselina

DNAm = DNA methylace

DNMT3a = DNA methyltransferáza 3a

DNMT3b = DNA methyltransferáza 3b

EIA = Enzyme immunoassay

ELISA = Enzyme-linked immuno sorbent assay

EpiA = Epigenetický (biologický) věk

FOXP3 = Forkhead box P3

HDL = high density lipoprotein, lipoprotein o nízké hustotě

HLA-B27 = Human Leukocyte antigen B27

HLA-Cw6 = Alela s názvem HLA-Cw6

HMGB1 = high-mobility group box 1, amphoterin

HSP = heat shock protein

ChronA = Chronologický (kalendářní) věk

IBD = Nespecifické střevní zánětlivé onemocnění

IFN- α = Interferon alfa

IFN- γ = Interferon gama

IGF-1 = Inzulinu podobný růstový faktor 1

IIS = Inzulín a IGF-1 signální cesta

IL-1 = Interleukin 1

IL-12 = Interleukin 12

IL-17 = Interleukin 17

IL-23 = Interleukin 23

IL-33 = Interleukin 33

IL-6 = Interleukin 6

IL-6 = Interleukin 6

IL-8 = Interleukin 8

IRIF1 = Locus na chromozomu 6 s názvem IRIF1

kb = Tisíc nukleotidových bazí na chromosom

KVO = Kardiovaskulární onemocnění

MetS = Metabolický syndrom

MICA = Locus na chromozomu 6 s názvem MICA

MS = metabolický syndrom

NF- κ β = Nukleární faktor κ β

NN = Normální kožní tkáň

ns = Statisticky nesignifikantní výsledek

OSA = Obstrukční spánková apnoe

p14 = Protein p14

p16 = Protein p16

p53 = Protein p53

PASI = Psoriasis Area and Severity Index

PCR = Polymerázová řetězová reakce

PN = Nepostížená psoriatická kožní tkáň

PP = Postížená psoriatická kožní tkáň

PsA = Psoriatická artritida

PSOR1C1 = Locus na chromozomu 6 s názvem PSOR1C1

PSORS1C3 = Locus na chromozomu 6 s názvem PSORS1C3

RNA = Ribonukleová kyselina

ROS = Reaktivní formy kyslíku

S100A12 = S100 vápník vázající protein A12

S100A7 = S100 vápník vázající protein A7

S100A8 = S100 vápník vázající protein A8

S100A9 = S100 vápník vázající protein A9

SIRT1 = Sirtuin 1, gen kódující sirtuin 1

TAG = Triglyceridy

Th = Pomocný T lymfocyt

Th1 = Pomocný T lymfocyt typu 1

Th17 = Pomocný T lymfocyt typu 17

Th2 = Pomocný T lymfocyt typu 2

Th22 = Pomocný T lymfocyt typu 22

TNFSF4 = Locus na chromozomu 6 s názvem TNFSF4

TNF- α = Tumor necrosis factor α

Treg = Regulační T lymfocyt

UCLA = University of California L.A.

UV = Ultrafialové

VEGF = Vaskulární endotelový růstový faktor

WHO = Světová zdravotnická organizace

Souhrn

Psoriasis vulgaris (psoriáza) je autoimunitní onemocnění, které postihuje především kůži. Patogeneze psoriázy zahrnuje kombinaci genetických a epigenetických modifikací s nezanedbatelným vlivem faktorů prostředí. Nemoc je charakterizována papuloskvamózními lézemi s hyperproliferaací keratinocytů, angiogenezí a dysregulací normální imunitní odpovědi, která vede k chronickému zánětu. Za ústřední faktor patogeneze psoriázy je považována nadměrná aktivace částí adaptivního imunitního systému. Závažnější formy psoriázy bývají asociovány s dalšími onemocněními (komorbiditami). Jedná se o metabolická a kardiovaskulární onemocnění, psoriatickou artritida, Crohnovu chorobu a psychické/psychiatrické poruchy či uveitida. Mnohé z uvedených komorbidit vykazují významnou souvislost s věkem (biologickým procesem stárnutí člověka).

Stárnutí je proces postupného snižování schopností a funkčních kapacit organismu. Jedná se o univerzální děj se značným stupněm variability, který je charakteristický pro všechny vyšší živočichy. Mezi teoriemi popisujícími stárnutí dominuje v současné době teorie akumulace poškození, která integruje dosud známé mechanismy stárnutí. Teorie se opírá o skutečnost, že při patofyziologických procesech dochází v lidském těle k nežádoucím změnám, které lze chápat jako poškození. Vlivem průběžné akumulace těchto poškození dochází následně k deterioraci celého systému.

Řešená problematika. Z literárních údajů vyplývá, že osoby s psoriázou se dožívají nižšího věku a mají zvýšenou pravděpodobnost rozvoje asociovaných onemocnění (komorbidit). Možné souvislosti mezi dysfunkčním chronickým zánětem vyvolaným procesem stárnutí (*inflammaging*) a procesem autoimunitního onemocnění (psoriázy) však nebyly dosud blíže objasněny.

Cílem disertační práce bylo (1) posouzení vhodnosti (použitelnosti) vybraných ukazatelů procesu stárnutí pro modelový systém onemocnění psoriázou a jejími komorbiditami a (2) použití vhodných ukazatelů procesu stárnutí pro analýzu vztahů mezi psoriázou, stárnutím a vznikem komorbidit.

Pro naplnění cílů práce byly provedeny tři nezávislé studie. Ukazatele byly vybrány ze skupiny jednoduchých molekulárních ukazatelů stárnutí a ze skupiny složených ukazatelů stárnutí. Pro hodnocení změněné mezibuněčné komunikace byly vybrány parametry HMGB1, IL-33, S100A7, S100A12, endocan, VEGF, IL-17 a CRP. Pro hodnocení genomové nestability byla vybrána úroveň oxidačního poškození DNA/RNA a ke kvantifikaci epigenetických změn

úroveň globální methylace a metoda *epigenetic clock*. Měření průměrné délky telomer bylo využito k popisu zkracování telomer, dalšího ze základních znaků stárnutí. Odběry biologických vzorků (plné krve) byly prováděny v letech 2016 až 2020. Celkově byla odebrána krev od 132 osob s psoriázou (pacienti) a 167 náhodně vybraných zdravých osob srovnatelného věku, pohlaví a životního stylu (kontroly). Faktory životního stylu (s důrazem na kouření) byly zjišťovány formou dotazníku. Ve skupině pacientů bylo 72 mužů a 60 žen, ve skupině kontrol 85 mužů a 82 žen.

První studie byla zaměřena na hodnocení vlivu psoriázy a komorbidit na hladiny ukazatelů zánětu ze skupiny alarminů (HMGB1, IL-33, S100A7, S100A12). Studie se zúčastnilo 63 pacientů (34 mužů, 29 žen) a 95 kontrol (49 mužů a 46 žen). Hladiny všech sledovaných alarminů byly ve skupině pacientů významně zvýšené. Byl nalezen významný vztah mezi HMGB1 a S100A7 ve skupině pacientů a významný vztah mezi HMGB1 a IL-33 ve skupině kontrol.

Druhá studie byla zaměřena 1) na hodnocení vlivu psoriázy a jejích komorbidit na hladiny ukazatelů zánětu IL-17, VEGF, endocanu a CRP a 2) na analýzu vztahu mezi epigenetickým a kalendářním věkem pacientů s psoriázou a komorbiditami (*epigenetic clock*; počítačové vyhodnocení methylace více než 500 genových lokusů DNA souvisejících s věkem). Studie se zúčastnilo 28 pacientů (17 mužů a 11 žen) a 42 kontrol (21 mužů a 21 žen).

Ve skupině pacientů (jako celku) jsme našli významně zvýšené hladiny IL-17 a významně snížené hladiny endocanu. Stejná situace byla u podskupiny mužů (pacientů). U podskupiny žen (pacientek) jsme našli pouze významně zvýšené hladiny IL-17. Ve skupině pacientů (jako celku) byly nalezeny významně vyšší hladiny CRP. Hladina CRP vykazovala významný vztah s chronologickým věkem.

Analýza vztahu mezi epigenetickým věkem a kalendářním věkem neprokázala statisticky významný rozdíl mezi kontrolami a pacienty (jako celku). Významný rozdíl mezi epigenetickým a kalendářním věkem byl však nalezen u podskupiny žen (pacientek). Medián rozdílu dosahoval hodnoty 3,2 roku u žen s psoriázou, zatímco u zdravých žen (kontrol) hodnoty -1,3. Ženy s psoriázou tak byly zjednodušeně o přibližně čtyři roky biologicky (epigeneticky) starší než ženy zdravé.

Třetí studie byla zaměřena na hodnocení vlivu psoriázy a jejích komorbidit 1) na hladiny globální methylace DNA, 2) na hladiny oxidačního poškození DNA/RNA a 3) na

změny v délce telomer. Studie se zúčastnilo 41 pacientů (21 mužů a 20 žen) a 30 kontrol (15 mužů a 15 žen).

Úroveň globální methylace DNA byla u pacientů vyšší, avšak rozdíl nedosáhl statistické významnosti. Byl nalezen významný vztah mezi úrovní globální methylace a BMI.

Pacienti s psoriázou měli významně vyšší hladinu oxidačního poškození DNA/RNA jak z pohledu celé skupiny, tak i po rozdělení na muže a ženy. U pacientů nekuřáků jsme našli významně vyšší hladiny oxidačního poškození DNA/RNA než u nekuřáků kontrol. Hladiny oxidačního poškození DNA/RNA u pacientů s komorbiditou metabolického syndromu (MetS) nebyly významně odlišné od pacientů bez MetS. Pacienti bez MetS však měli významně vyšší hladiny oxidačního poškození DNA/RNA v porovnání s osobami kontrolní skupiny bez MetS.

Ve skupině pacientů (jako celku) a v podskupině pacientů žen (ne však v podskupině pacientů mužů) byla nalezena významně vyšší průměrná délka telomer na chromozom v porovnání s kontrolami. U pacientů nekuřáků byly telomery významně delší než u pacientů kuřáků. U pacientů bez MetS byly telomery významně delší než u pacientů s MetS. Byl nalezen významný negativní vztah mezi délkou telomer a kalendářním věkem kontrolních osob.

Závěry prvního cíle. Byla posouzena vhodnost (použitelnost) vybraných ukazatelů biologického stárnutí pro modelový systém onemocnění psoriázou a jejími komorbiditami. Alarmíny představují ukazatele procesu stárnutí popisující změněnou mezibuněčnou komunikaci a byly modelovým systémem onemocnění významně ovlivňovány. Lze je tedy pro tento systém považovat za vhodné. Další z vybraných ukazatelů změněné mezibuněčné komunikace, VEGF modelovým systémem ovlivňován nebyl a za vhodný ukazatel jej zřejmě považovat nelze. Změněnou mezibuněčnou komunikaci indikují i další vybrané ukazatele IL-17, endocan a CRP. V modelovém systému onemocnění byly pozorovány jejich významné změny. Oba ukazatele však mohou být významně ovlivňovány faktory životního/pracovního prostředí a životního stylu. Jejich využití jako ukazatelů stárnutí v modelovém systému onemocnění proto připadá v úvahu spíše na úrovni populace, nikoliv však na úrovni jedince.

Ze zástupců ukazatelů stárnutí popisujících epigenetické změny se ukázala jako vhodnější metoda *epigenetic clock* (oproti metodě globální methylace), která umožňuje podrobně charakterizovat jednotlivá methylační místa na epigenomu.

Měření genomové nestability pomocí oxidačního poškození RNA/DNA se zdá být slibnou metodou pro kvantifikaci míry rychlosti stárnutí v modelovém systému onemocnění. I

zde je však nutné brát v úvahu významný vliv faktorů životního/pracovního prostředí a životního stylu (například kouření).

Měření délky telomer přineslo neočekávané nálezy, které neumožňují formulovat objektivní hodnocení vhodnosti této metody jako ukazatele procesu stárnutí v modelovém systému onemocnění.

Závěry druhého cíle. Za použití vhodných ukazatelů procesu stárnutí byla provedena analýza vztahů mezi psoriázou, stárnutím a vznikem komorbidit. Prokázali jsme (podle literárních údajů zřejmě jako první), že u pacientů s psoriázou (modelový systém onemocnění) dochází k významným změnám parametrů souvisejících s procesem stárnutí. Nejvýznamnějším důkazem je nález vyššího epigenetického (biologického věku) u žen s psoriázou.

Souhrnně řečeno, prokázali jsme, že psoriáza kvalitativně ovlivňuje proces stárnutí a významně zvyšuje vznik a rozvoj komorbidit. Všechny uvedené interpretace a závěry jsou zatíženy určitou mírou nejistot.

Summary

Psoriasis vulgaris (psoriasis) is an autoimmune disease that primarily affects the skin. The pathogenesis of psoriasis involves a combination of genetic and epigenetic modifications with a significant influence of environmental factors. The disease is characterized by papulosquamous lesions with hyperproliferation of keratinocytes, angiogenesis and dysregulation of the normal immune response leading to chronic inflammation. Excessive activation of parts of the adaptive immune system is thought to be a central factor in the pathogenesis of psoriasis. More severe forms of psoriasis tend to be associated with other diseases (comorbidities). These include metabolic and cardiovascular diseases, psoriatic arthritis, Crohn's disease and psychiatric disorders or uveitis. Many of these comorbidities show a significant association with age (the biological process of human aging).

Aging is a process of gradual decline in the body's abilities and functional capabilities. It is a universal process with a considerable degree of variability that is characteristic of all higher animals. Among the theories describing aging, the theory of accumulation of damage, which integrates the previously known mechanisms of aging, is currently dominant. The theory is based on the fact that during pathophysiological processes, undesirable changes occur in the human body that can be understood as damage. Due to the continuous accumulation of these damages, the whole system is subsequently deteriorated.

Issue addressed. Literature data suggest that people with psoriasis have shorter lifespan and an increased likelihood of developing associated diseases (comorbidities). However, the possible links between dysfunctional chronic inflammation induced by the aging process (inflammaging) and the autoimmune disease process (psoriasis) have not yet been further elucidated.

The aims of this dissertation were (1) to assess the suitability (applicability) of selected aging indicators for a model system of psoriasis and its comorbidities and (2) to use appropriate aging indicators to analyze the relationships between psoriasis, aging, and the development of comorbidities.

Three independent studies were conducted to fulfill the objectives of this study. The indicators were selected from a group of simple molecular indicators of aging and a group of composite indicators of aging. The parameters HMGB1, IL-33, S100A7, S100A12, endocan, VEGF, IL-17 and CRP were selected to assess altered intercellular communication. To assess genomic instability, we measured the level of oxidative DNA/RNA damage. To quantify

epigenetic alterations, the level of global methylation and the epigenetic clock method were selected. The length of telomeres was selected to assess the telomere attrition. Biological sampling (whole blood) was performed between 2016 and 2020. A total of 132 individuals with psoriasis (patients) and 167 randomly selected healthy individuals of comparable age, sex and lifestyle (controls) were blood collected. Lifestyle factors (with emphasis on smoking) were collected by questionnaire. There were 72 men and 60 women in the patient group and 85 men and 82 women in the control group.

The first study was aimed at evaluating the effect of psoriasis and comorbidities on the levels of markers of inflammation from the group of alarmins (HMGB1, IL-33, S100A7, S100A12). 63 patients (34 men, 29 women) and 95 controls (49 men and 46 women) participated in the study. The levels of all alarmins studied were significantly elevated in the patient group. There was a significant relationship between HMGB1 and S100A7 in the patient group and a significant relationship between HMGB1 and IL-33 in the control group.

The second study was 1) to evaluate the effect of psoriasis and its comorbidities on the levels of inflammatory markers IL-17, VEGF, endocan and CRP and 2) to analyze the relationship between epigenetic and calendar age of psoriasis patients and comorbidities (epigenetic clock; computerized evaluation of methylation of more than 500 age-related DNA gene loci). Twenty-eight patients (17 men and 11 women) and 42 controls (21 men and 21 women) participated in the study.

In the patient group (as a whole), we found significantly increased IL-17 levels and significantly decreased endocan levels. The situation was the same in the subgroup of men (patients). In the subgroup of women (patients), we found only significantly elevated IL-17 levels. In the group of patients (as a whole), we found significantly higher CRP levels. CRP levels showed a significant relationship with chronological age.

Analysis of the relationship between epigenetic age and calendar age showed no statistically significant difference between controls and patients (as a whole). However, a significant difference between epigenetic age and calendar age was found in a subgroup of women (patients). The median difference was 3.2 years for women with psoriasis, while the median difference for healthy women (controls) was -1.3 years.

The third study was designed to assess the effect of psoriasis and its comorbidities on 1) levels of global DNA methylation, 2) levels of oxidative DNA/RNA damage, and 3) changes

in telomere length. Forty-one patients (21 men and 20 women) and 30 controls (15 men and 15 women) participated in the study.

The level of global DNA methylation was higher in the patients, but the difference did not reach statistical significance. A significant relationship was found between the level of global methylation and BMI.

Patients with psoriasis had significantly higher levels of oxidative DNA/RNA damage, both in terms of the whole group and when divided into men and women. We found significantly higher levels of oxidative DNA/RNA damage in non-smoking patients than in non-smoking controls. Levels of oxidative DNA/RNA damage in patients with metabolic syndrome (MetS) comorbidity were not significantly different from those without MetS. However, patients without MetS had significantly higher levels of oxidative DNA/RNA damage compared with controls without MetS.

Significantly higher mean telomere length per chromosome was found in the patient group (as a whole) and in the subgroup of female patients (but not in the subgroup of male patients) compared to controls. Telomeres were significantly longer in non-smoking patients than in smoking patients. Telomeres were significantly longer in patients without MetS than in patients with MetS. There was a significant negative relationship between telomere length and calendar age of controls.

Conclusions of the first objective. The suitability (applicability) of selected indicators of biological aging for a model system of psoriasis and its comorbidities was assessed. Alarmins are indicators of the aging process describing altered intercellular communication and were significantly influenced by the disease model system. They can therefore be considered appropriate for this system. Another of the selected indicators of altered intercellular communication, VEGF, was not influenced by the model system and probably cannot be considered a suitable indicator. Altered intercellular communication is also indicated by other selected IL-17, endocan and CRP markers. Significant changes were observed in the disease model system. However, both indicators may be significantly influenced by environmental/work and lifestyle factors. Their use as indicators of aging in a model disease system is therefore more appropriate at the population level than at the individual level.

Of the proxies for aging indicators describing epigenetic changes, the epigenetic clock method (as opposed to the global methylation method) has proven to be preferable, as it allows detailed characterization of individual methylation sites on the epigenome.

Measurement of genomic instability by RNA/DNA oxidative damage appears to be a promising method for quantifying the rate of aging in a disease model system. However, here again, the significant influence of environmental/occupational and lifestyle factors (e.g. smoking) must be taken into account.

Measurement of telomere length has produced unexpected findings that do not allow an objective assessment of the suitability of this method as an indicator of the aging process in a model system of the disease.

Conclusions of the second objective. Using appropriate indicators of the aging process, an analysis of the relationship between psoriasis, aging, and the development of comorbidities was performed. We have demonstrated (probably for the first time according to the literature data) that patients with psoriasis (disease model system) have significant changes in parameters related to the process of aging. The most significant evidence is the finding of higher epigenetic (biological age) in women with psoriasis.

In summary, we have shown that psoriasis qualitatively affects the aging process and significantly increases the onset and development of comorbidities. All these interpretations and conclusions are burdened with a certain degree of uncertainty.

A TEORETICKÁ ČÁST

1 Psoriáza

Psoriasis vulgaris (psoriáza, česky lupénka) je autoimunitní onemocnění, které postihuje především kůži (Obr. 1). Je charakterizována papuloskvamózními lézemi s hyperproliferaací keratinocytů, angiogenezí a dysregulací normální imunitní odpovědi, což vede k chronickému zánětu (1). Nemoc se projevuje dobře ohraničenými červenými plakami s přiléhajícími šupinami, nejčastěji na pokožce hlavy a extenzorových plochách končetin. Důsledky lupénky zdaleka přesahují rámec pacientovy kůže a mohou vést k významně zhoršené kvalitě života, jako je tomu u onkologických a kardiovaskulárních onemocnění (2). Patogeneze psoriázy je komplexní a je výsledkem kombinace genetických a epigenetických modifikací a vlivů prostředí (1).

Obr. 1. Psoriatické léze zadní části těla



Prevalence psoriázy se celosvětově obvykle udává v rozmezí jednoho až tří procent populace. Nicméně, ve výskytu tohoto onemocnění lze pozorovat značnou heterogenitu. Například Parisi et al. uvádějí rozsah prevalence psoriázy u dospělých osob od 0,9 % ve Spojených Státech Amerických až po 8,5 % v některých částech Norska. Výsledky dále ukazují, že výskyt psoriázy se liší v závislosti na věku a zeměpisné oblasti, přičemž častější je výskyt v zemích vzdálenějších od rovníku (bělošská populace) (3). Ačkoliv se psoriáza může objevit v jakémkoli věku, většina pacientů trpí tímto onemocněním před třicátým pátým rokem svého života. V roce 2014 Světová zdravotnická organizace (WHO) uznala psoriázu za závažné nepřenosné onemocnění a její doprovodná zpráva zdůraznila potřebu lépe porozumět globální zátěži tohoto onemocnění (4, 5). Dle posledních dostupných údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky bylo v České republice v roce 2017 celkem 97 450 osob trpících psoriázou. Z toho počtu bylo 49 215 mužů a 48 235 žen, rozdělení počtu případů dle pohlaví je tedy přibližně stejné, 50,5 % připadá na muže, 49,5 % na ženy (6).

Etiologie psoriázy dosud nebyla zcela uspokojivě objasněna, nicméně, je známa řada rizikových faktorů (včetně rodinné anamnézy a faktorů prostředí) které mají přímý vliv na vznik a rozvoj onemocnění (7). Klinické projevy psoriázy jsou závislé na interakci genů a prostředí. Onemocnění se většinou neprojeví, pokud se neobjeví tzv. spouštěč. Tímto spouštěčem může být stres, infekce (zejména streptokoková), konzumace alkoholu, kouření, zvýšená tělesná hmotnost, nadměrné užívání léků (například lithia, antimalarik, či nesteroidních protizánětlivých léčiv) a v některých případech i sluneční záření. Nutno doplnit, že nadváha a obezita představují jak významné spouštěče onemocnění, tak i možný důsledek života pacienta s lupénkou (8). Mimořádně významným faktorem vzniku a rozvoje psoriázy je stres. Studie dokládají, že u 26 až 88 % pacientů trpících psoriázou je přítomna zvýšená hladina stresu. Role stresu častěji inkriminuje ženy trpící psoriázou než muže. Tento rozdíl lze vysvětlit tím, že ženy přikládají větší význam dopadu onemocnění na tělesný obraz a sebeúctu. Četné studie zdůrazňují roli jedné nebo více stresových událostí před vznikem onemocnění a jeho vzplanutím. Důležité je, že přítomnost chronického stresu může vést nejen ke zhoršování či častějšímu vzplanutí psoriázy samotné, ale i ke zvyšování rizika komorbidit (9-12).

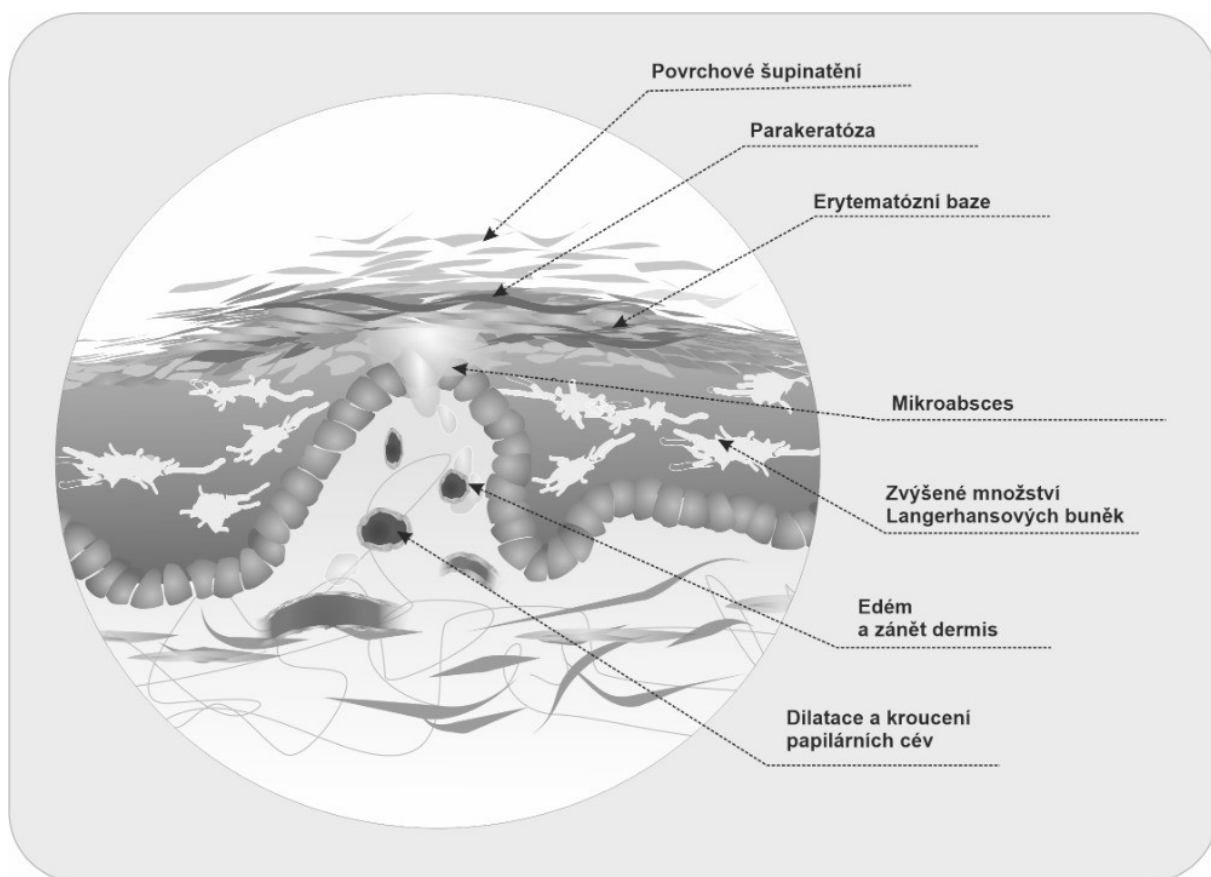
Hlavním rizikovým faktorem pro vznik psoriázy je zejména dědičnost, přičemž u jednovaječných dvojčat, ve srovnání s dvojčaty dvojvaječnými, je riziko zhruba dva až třikrát vyšší. Celogenomové asociační studie identifikovaly již více než 80 lokusů, které by mohly být odpovědné zhruba za 30 % dědičnosti onemocnění. Fenomén dědičnosti je však složitou

problematikou, která souvisí s širokým genovým spektrem (prezentace antigenu, vývoj a polarizace receptorů T-buněk a dráha jaderného faktoru $\kappa\beta$ a NF- $\kappa\beta$) (13-16).

Za ústřední faktor patogeneze psoriázy je považována nadměrná aktivace částí adaptivního imunitního systému. V počátečních fázích patogeneze psoriázy dochází k aktivaci různých buněčných typů, včetně plazmocytoidních dendritických buněk, keratinocytů, přirozených zabíječů T lymfocytů a dalších buněk (např. makrofágů). Následuje exprese cytokinů, které aktivují myeloidní dendritické buňky. V tomto procesu dochází k sekreci interferonu alfa (IFN- α), který následně aktivuje myeloidní dendritické buňky a indukci exprese interleukinů IL-12 a IL-23. První z nich, IL-12, aktivuje diferenciaci naivních T buněk na TH1 buňky, zatímco IL-23 má zásadní význam pro přežití a proliferaci buněk TH17a TH22. Buňky TH1 vylučují interferon gama (IFN- γ) a tumor nekrotizující faktor-alfa (TNF- α), zatímco buňky TH22 vylučují IL-22 a buňky TH17 vylučují IL-17, IL-22 a TNF- α . Mezi těmito cestami je za dominantní cestu považována interleukinem IL-23 zprostředkovaná aktivace TH17. Popsaný proces vede k transkripci klíčových zánětlivých mediátorů. Cytokiny způsobují proliferaci keratinocytů, zvýšenou expresi angiogenních mediátorů a endoteliálních adhezivních molekul a infiltraci imunitních buněk do postižené kůže (17).

Histologie psoriázy zahrnuje ztlustění epidermis (akantózu) se ztenčenou nebo chybějící granulární vrstvou, prodloužení a rozšíření kapilár, suprapapilární ztenčení, zánětlivý infiltrát T-buněk v dermis a epidermis a někdy i shluky neutrofilů v parakeratotických šupinách (obr. 2). Diagnóza je stanovována obvykle na základě klinického nálezu. Kožní biopsie se k diagnostice psoriázy používá jen ve výjimečných případech. Ke kvantifikaci závažnosti onemocnění (erytému, infiltrace, tloušťky kožních vrstev, šupinatění a rozsahu lézí) je používán ukazatel PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) (18, 19).

Obr. 2. grafické znázornění dermis a epidermis u pacienta s psoriázou



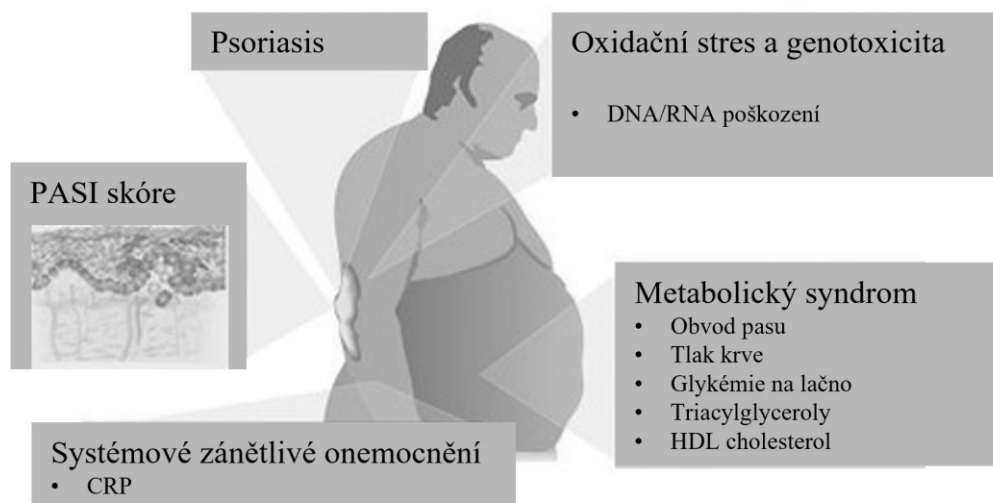
2 Komorbidity psoriázy

Psoriáza, zejména její nejzávažnější formy, bývá asociována s dalšími onemocněními (komorbiditami) s podobnými patogenetickými charakteristikami. Často se jedná o metabolická a kardiovaskulární onemocnění. Vyšší prevalenci mají psoriatická artritida (PsA), Crohnova choroba (CD), psychické/psychiatrické poruchy, uveitida a nádorová onemocnění. S ohledem na téma této disertační práce, uvádím níže podrobnější charakteristiky komorbidit, které mají významnou souvislost s věkem, respektive s biologickým procesem stárnutí člověka (20-22).

Riziko vzniku a rozvoje metabolických onemocnění je významně ovlivněno přítomností metabolického syndromu (MS). MS se vyskytuje častěji u psoriatických stejně jako u starších osob a je do jisté míry závislý na biologickém věku (23, 24). Dle autorů Grishma et Hirode se prevalence výskytu metabolického syndromu mezi 30. a 60. rokem života zhruba zdvojnásobuje a významně přispívá ke vzniku metabolických onemocnění (25). MS zahrnuje skupinu rizikových faktorů, včetně centrální obezity, dyslipidemie, hypertenze a inzulínové rezistence (Obr. 3). Diagnózu MS lze stanovit, pokud jsou přítomna tři z pěti uvedených kritérií:

(i) zvýšený obvod pasu nebo abdominální obezita (≥ 102 cm u mužů a ≥ 88 cm u žen); (ii) glukózová intolerance prezentovaná vyšší hladinou glukózy nalačno $\geq 5,6$ mmol/l nebo známou léčbou diabetu; (iii) zvýšená hladina triglyceridů (TAG) $\geq 1,7$ mmol/l; (iv) snížená hladina lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL cholesterol) $<1,03$ mmol/l u mužů a $<1,30$ mmol/l u žen; a (v) zvýšeným krevním tlakem (systolický krevní tlak ≥ 130 mmHg a/nebo diastolický krevní tlak ≥ 85 mmHg) (26, 27).

Obr. 3. Metabolický syndrom pacienta s psoriázou



Přítomnost MS je také silným prediktorem rozvoje kardiovaskulárních onemocnění (KVO). U pacientů s psoriázou byl prokázán zvýšený výskyt kardiovaskulárních komorbidit, až o 50 % vyšší pravděpodobnost vzniku kardiovaskulárních onemocnění, zejména u osob s těžkým kožním postižením. Jedná se o zvýšené riziko infarktu myokardu, aterosklerózy a ischemické cévní mozkové příhody. Patogeneze kardiovaskulárních komorbidit psoriázy nebyla dosud zcela objasněna, předpokládá se komplex psychologických a fyziologických mechanismů (28). Imunitní odpověď u psoriázy totiž zahrnuje, zvýšenou aktivaci T-buněk a myeloidních buněk, aktivaci krevních destiček a zvýšenou regulaci interferonů, tumor nekrotizujícího faktoru- α a interleukinů (IL) IL-23, IL-17 a IL-6, které jsou spojeny s vaskulárním zánětem a rozvojem aterosklerózy. Znalost aplikace různých strategií kardiovaskulární prevence by mohla znamenat výhodu při provádění odhadu kardiovaskulárního rizika a léčby kardiovaskulárních rizikových faktorů u psoriaticků (29, 30)

Nezávislým rizikovým faktorem pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění je i obstrukční spánková apnoe (OSA). Epidemiologické studie uvádějí, že prevalence obstrukční spánková apnoe u pacientů s psoriázou je vyšší než u zdravé kontrolní populace. Může tak společně s dalšími faktory přispívat k rozvoji kardiovaskulárních a dalších onemocnění (31).

Psoriatická artritida (PsA) je heterogenní, obvykle séronegativní chronická zánětlivá spondyloartritida, spojená s psoriázou. Přesná prevalence PsA není známa, ale odhady se pohybují od 20 do 420 případů na 100 000 obyvatel v západních zemích až po 1 případ na 100 000 obyvatel v Japonsku (31, 32). Nejvyšší výskyt PsA je mezi 30. a 50. rokem života. Klinicky je charakterizována otokem, bolestí a ztuhlostí kloubů, vazů a šlach (entezitida a daktylitida) (32). Vyznačuje se obdobími zhoršení a ústupů. Pokud není léčena, může vést až k chronickému zánětu. PsA může předcházet výskytu kožních lézí (zhruba v 75 % případů), být s nimi souběžná (zhruba v 10 % případů) nebo se objevit až po jejich projevu (zhruba 15 % případů). Nebyla potvrzena souvislost mezi typem nebo závažností kožních lézí a přítomností, typem nebo rozsahem kloubního postižení (27, 33).

Pacienti s Crohnovou chorobou (CD) mají (oproti běžné populaci) přibližně sedmkrát vyšší riziko vzniku a rozvoje psoriázy, zatímco pacienti s psoriázou mají zhruba třikrát vyšší riziko vzniku a rozvoje CD. Ukazuje se také, že pacienti s psoriázou a současným nespecifickým střevním zánětlivým onemocněním (IBD) mají vyšší pravděpodobnost výskytu dalších závažných komorbidit (séronegativní artritida, tyreoiditida, diabetes a lymfom), v porovnání s pacienty trpícími „pouze“ psoriázou. Tento jev lze vysvětlit na základě společných zánětlivých mechanismů a společných genetických rizik (34, 35).

Psychologické koreláty a psychiatrické poruchy jsou častými komorbiditami u pacientů postižených psoriázou. Byla popsána vysoká míra úzkosti, deprese a emočních dysfunkcí. Například alexithymie je charakterizována obtížemi s rozpoznáváním a/nebo vyjadřováním emocí. Onemocnění do jisté míry souvisí s časným věkem nástupu psoriázy a zvýšenou zranitelností pacienta vůči stresu. U dětí postižených psoriázou může mít tato nemoc dopad na jejich sebepojetí a může se stát součástí jejich vlastních vývojových zkušeností. Stigma spojené s viditelnými kožními lézemi a nepředvídatelnost vzplanutí nemoci vedou ke značné psychické zátěži, která může přetrvávat až do dospělosti. Pacienti mohou v rámci přizpůsobování se nemoci vykazovat úzkostné až depresivní příznaky. Prevalence psychiatrických onemocnění u psoriázy se pohybuje od 24 % až do 90 % (36, 37).

Uveitida je charakterizována zánětem uveálního traktu, který zahrnuje duhovku, řasnaté těleso, cévnatku a přilehlé struktury. Vysvětlení zvýšené pravděpodobnosti vzniku uveitidy u pacientů s psoriázou může být založeno na přítomnosti systematické zánětlivé reakce, která může vyvolávat i oční zánět. Některé cytokiny, významné v patogenezi psoriázy (TNF- α a interleukiny IL-2, IL-6, IL-17), byly ve zvýšených koncentracích nalezeny též v očním moku pacientů s uveitidou. Je také možné, že obě onemocnění mají společnou genetickou predispozici, která v konečném důsledku vede k autoimunitnímu onemocnění kůže i oka. Jako příklad společného predispozičního faktoru lze uvést antigen HLA-B27, který souvisí jak s psoriatickou artritidou, tak i s uveitidou (38-42).

Pacienti s psoriázou mají zvýšené riziko vzniku a rozvoje nádorových onemocnění, zejména nádorů keratinocytárních, maligních lymfomů, nádorů plic a nádorů močového měchýře. Lékaři, kteří léčí pacienty s psoriázou, by si měli být tohoto zvýšeného rizika vědomi, zejména v případě lymfomů, protože imunogenní léčba může být spojena s exacerbací. Současná literatura zatím nenaznačuje zvýšené riziko vzniku rakoviny v souvislosti s biologickými formami léčby psoriázy (43). Zvýšené riziko je pravděpodobně způsobeno kombinací chronického zánětu nízkého stupně u psoriázy a rizikových faktorů pro vznik rakoviny spojených s psoriázou (např. kouření, konzumace alkoholu, obezita, vrozená genetická predispozice). To souvisí i s kalendářním, respektive biologickým věkem jedince, neboť některé rizikové faktory jsou důvodem vzniku onemocnění až po delším čase expozice. Příkladem může být metaanalýza Fu et al, která potvrdila zvýšené riziko kolorektálního karcinomu u psoriatiků (44, 45).

3 Proces stárnutí

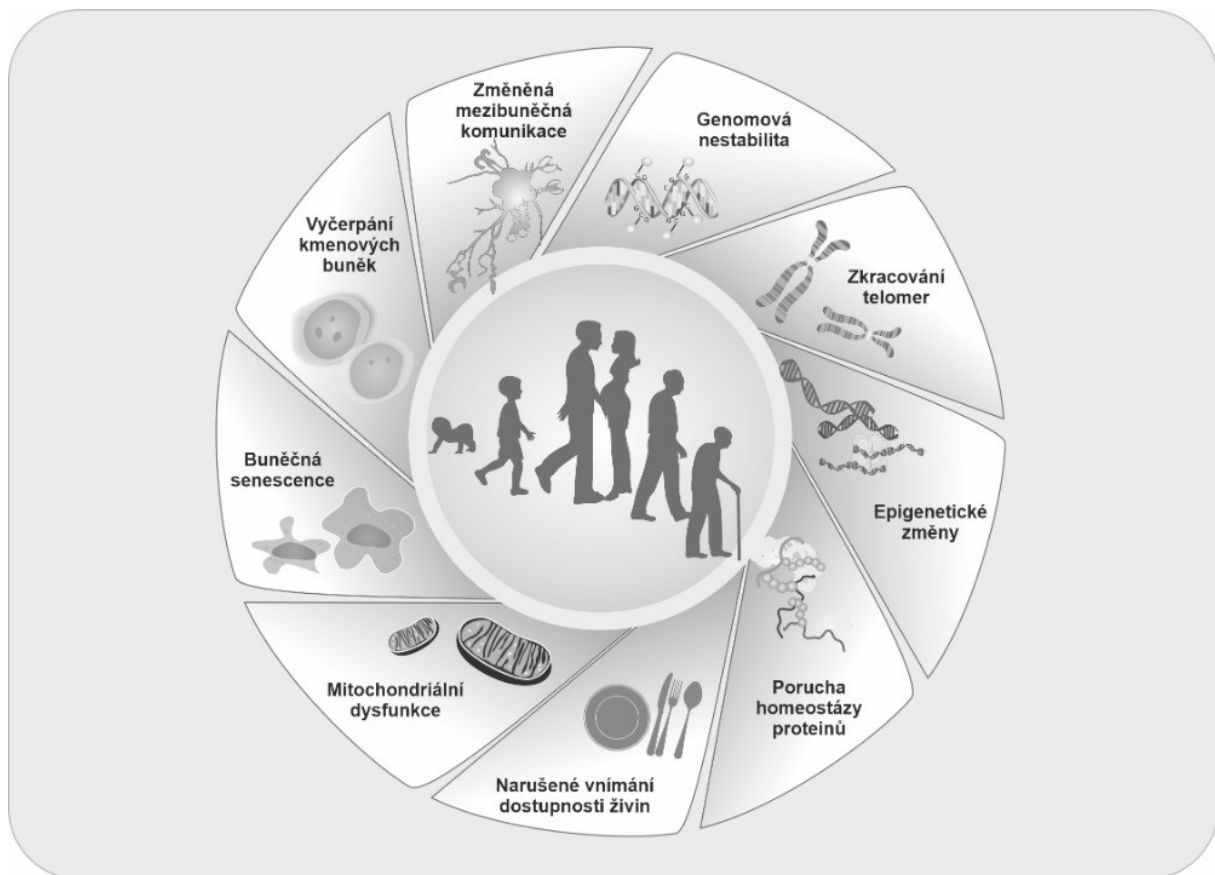
Stárnutí (*aging*) je proces postupného snižování funkčních kapacit lidského těla. Dochází při něm ke strukturálním změnám všech tělních systémů, orgánů, tkání i buněk. Vysoký věk člověka je nejvýznamnějším rizikovým faktorem celé řady onemocnění, neboť úmrtnost na kardiovaskulární, metabolická, onkologická a jiná onemocnění stoupá v průběhu života exponenciálně. Stárnutí je sice univerzální proces, vyskytující se u všech obratlovců, neměří však všem druhům stejně. Všechny živočišné druhy disponují přibližně stejným celoživotním počtem srdečních stahů v hodnotě okolo jedné miliardy. Tato skutečnost naznačuje, že zvířata s vysokou klidovou tepovou frekvencí stárnou rychleji a dožívají se kratšího života než ta s frekvencí nižší. Obecně řečeno, i když stárneme všichni, nestárneme všichni stejně rychle. Odlišné rychlosti stárnutí nalezneme mezi jedinci stejného druhu, a dokonce stárnou různě i jednotlivé tkáně (46, 47).

Během posledních dekad se objevila řada teorií popisujících příčiny stárnutí (48). Jednou z nejznámějších je teorie volných radikálů. Tato teorie uvádí, že volné kyslíkové radikály, vznikající při aerobním metabolismu, poškozují DNA a další důležité buněčné struktury, čímž indukují proces stárnutí. Nicméně, meta-analytické studie neprokázaly účinek intervencí (bránících tvorbě radikálů) na zpomalení stárnutí (prodloužení života nebo prodloužení života ve zdraví) (49). Další teorií je teorie mitochondriální, podle které je stárnutí způsobeno úbytkem funkcí mitochondrií. Některé studie v této souvislosti naznačují, že by se mohlo jednat o určitý prehistorický nesoulad mezi původně prokaryontní bakterií (mitochondrií), která se chce dělit a napadat další hostitele, a zestárlou eukaryontní buňkou, která již dělení není schopná. Uvedený rozpor by mohl být jednou z příčin sníženého výkonu hostitelské buňky a přibývání věkem podmíněných patologií (50). Jako další lze uvést například teorii neuroendokrinní, která uvádí, že proces stárnutí je dán změnami hladin hormonů v tělních tekutinách (51).

Postupně se objevovaly i další teorie, nicméně se zdá, že pouze teorie akumulace poškození dokáže integrovat všechny doposud známé patofyziologické mechanismy stárnutí. Teorie uvádí, že při každém procesu v lidském těle může docházet k chybě (změně, poškození) systému. Průběžnou akumulací těchto chyb (během života) pak dochází k postupné deterioraci celého systému (52). Tento nový pohled na příčiny stárnutí dal vzniknout jednotnému názoru na klíčové změny, odehrávající se v jeho průběhu. Změny pak byly přehledně shrnuty v publikaci „*The Hallmarks of Aging*“, která rozděluje znaky stárnutí na devět vzájemně propojených typů, u nichž bylo prokázáno, že ve větší či menší míře ovlivňují délku života

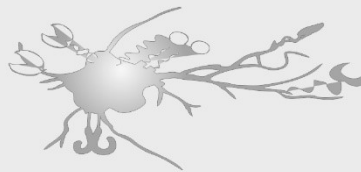
pokusných subjektů. Mezi znaky stárnutí patří (obr. 4) změněná mezibuněčná komunikace, epigenetické změny, genomová nestabilita, zkracování telomer, porucha homeostázy proteinů, narušené vnímání dostupnosti živin, mitochondriální dysfunkce, buněčná senescence, vyčerpání kmenových buněk (53). V mojí disertační práci jsem se věnoval zejména čtyřem z devíti znaků stárnutí (změněné mezibuněčné komunikaci, epigenetickým změnám, genomové nestabilitě a zkracování telomer). Vzhledem k vzájemné propojenosti jednotlivých znaků stárnutí se pro úplnost v úvodu budu krátce věnovat každému z nich.

Obr. 4. Znaků stárnutí (modifikováno dle práce „*The Hallmarks of Aging*“ (53))



3.1 Změněná mezibuněčná komunikace

Změněná mezibuněčná komunikace



Změny v mezibuněčné komunikaci jsou během stárnutí patrné na úrovni autokrinní, parakrinní, endokrinní, neuroendokrinní i neuronální. Průvodním jevem stárnutí je zánět (*inflammaging*), který je důsledkem kombinace celé řady faktorů. Jedná se o akumulaci poškození ve tkáních, snížení schopnosti organismu efektivně se zbavovat patogenů (nefunkčních a poškozených tělních struktur), zvýšení tvorby prozánětlivých působků senescentními buňkami a buňkami imunitního systému a snížení autofagie. Velkou roli v tomto procesu hraje dlouhodobé poškození buněk, při kterém se chronicky uvolňují alarminy, které řadíme mezi DAMPs (*damage associated molecular patterns*). DAMPs představují molekuly, které mimo buňky aktivují imunitní systém k neinfekční zánětlivé reakci. Jako další příklady lze uvést HSP (*heat shock proteins*), HMGB1 (*high-mobility group box 1*), ATP, adenosin, kyselinu močovou a heparansulfát (53, 54). Alarminy jsme využili v experimentální části práce.

Protein HMGB1, známý také jako amfoterin, je evolučně stará a velmi konzervativní molekula DAMPs. Vyskytuje se v jádře a ohýbá šroubovici DNA, čímž pomáhá regulovat jaderné biochemické transakce. Po poškození buňky se HMGB1 může dostat do extracelulární matrix, kde funguje jako signál poškození tkáně (55, 56). Nedávné studie zjistily, že HMGB1 hraje také významné role v mnoha kompartmentech lidského metabolomu. Studie nalézají i souvislosti mezi HMGB1 a imunopatologií poruch a traumat různých tělních systémů. Byla například potvrzena jeho role u ischemické cévní mozkové příhody a v procesu senescence kardiomyocytů a zánětlivého poškození srdce. Jeho komplexní funkci v senescenci kardiomyocytů a zánětlivém poškození srdce popsali Lu et al. (57, 58). Ohledně patogeneze psoriázy a HMBG1 jsou k dispozici jen velmi omezené údaje.

Interleukin IL-33 je zánětlivý člen nadrodiny cytokinů IL-1, který se uvolňuje v důsledku poškození buněk nebo jejich nekrózy (59). Produkce proinflatorních cytokinů vyvolaná IL-33 hraje důležitou roli jako most mezi vrozenou a adaptivní imunitní odpovědí u alergických onemocnění. Jeho vyšší sérové hladiny byly zjištěny u různých imunopatologických stavů, jako je revmatoidní artritida, zánětlivé onemocnění střev nebo atopická dermatitida (60, 61).

Protein S100A7 (psoriasin, člen genové rodiny S100) je antimikrobiální peptid a signální molekula, která reguluje buněčné funkce. Jeho role v epidermální diferenciaci zůstává z velké části neznámá, nicméně, důkazů o zapojení S100A7 do patogeneze psoriázy přibývá. Byla například zjištěna jeho vysoká exprese v keratinocytech psoriatických lézí (62-65). Protein S100A12 je také členem genové rodiny proteinů S100, který stejně jako ostatní sdílí domény EF-hand podílející se na vazbě vápníku. EF-hand je proteinový motiv, složený ze dvou alfa-helixů, který váže vápenaté ionty. Může být dokonce aktivně vylučován aktivovanými granulocyty za účelem indukce silné chemotaktické aktivity srovnatelné s jinými silně účinnými chemotaktickými látkami (66). Podle studie Wilsman-Theis et al. je S100A12 nejslibnějším markerem aktivity onemocnění psoriázou (67).

Do skupiny markerů změněné mezibuněčné komunikace patří také dále popsaná skupina látek, které jsme v experimentální části sledovali u osob s psoriázou. Účelem sledování byla bližší charakterizace jejich vztahu k úrovni kardiovaskulárního rizika. Endocan (*endothelial cell-specific molecule-1*) je molekula exprimovaná a vylučovaná především endoteliálními buňkami. V poslední době přibývá důkazů, že endocan je spojen s patogenními procesy souvisejícími s aterosklerózou (endoteliální dysfunkce, zánět a angiogeneze) a hraje významnou roli při vzniku a rozvoji KVO (68). Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) je silný stimulant angiogeneze, který je schopný vytvořit lokální proangiogenní prostředí mobilizací endoteliálních progenitorových buněk (69). V laboratorních pokusech byl po podání VEGF pozorován agresivní rozvoj aterosklerotického plátu a zrychlená neovaskularizace cévní stěny (70). Interleukin IL-17 je exprimován buňkami Th17 a CD8⁺ a přirozenými zabíječskými T-lymfocyty. IL-17 je kritickým mediátorem zánětu díky své schopnosti synergicky působit s dalšími zánětlivými signály a jedná se o velmi důležitý cytokin v patofyziologii psoriázy. Bylo zjištěno, že protilátky zaměřené proti IL-17 jsou velmi účinné při léčbě středně těžké až těžké psoriázy (71).

Do kategorie změněné buněčné komunikace lze také řadit parametr C-reaktivní protein (CRP). CRP je považován za jeden z nejcitlivějších ukazatelů zánětu a díky krátkému biologickému poločasu (6-8 h) je vhodným nástrojem pro sledování průběhu onemocnění. CRP představuje rovněž nezávislý rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění (72-78). V této souvislosti by zvýšený výskyt ischemické choroby srdeční u pacientů s psoriázou mohl souviset s jejich zvýšenými hladinami tohoto proteinu. Zvýšené hladiny CRP však byly nalezeny pouze u středně těžkých a těžkých forem onemocnění a v této chvíli neexistuje dostatek důkazů, které by potvrdily podobný vztah i u lehkých forem onemocnění (72, 79).

3.2 Epigenetické změny

Epigenetické změny



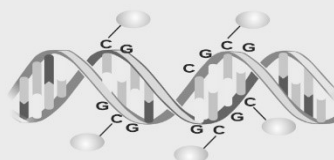
Stárnutí vede k významným změnám organizace chromatinu i DNA. Dochází k ovlivnění methylace DNA, snížení množství heterochromatinu, ke ztrátě a remodelaci nukleozomů a ke změnám na histonech. Methylace DNA je ve stáří celkově snížena, nicméně některé oblasti DNA mohou být i hypermethylovány (cytosin-fosfát-guaninové ostrůvky; CpG) (80). Během stárnutí se mění exprese velkého množství genů. Míra této exprese se velmi liší nejen mezi jedinci stejného druhu, ale může se lišit i mezi různými tkáněmi u stárnoucího jedince. Tento jev je známkou dysregulace genové exprese. Nicméně, i dysregulace (porucha regulace) si udržuje určité vzorce genové exprese, které jsou pro stárnutí typické. Například exprese genů a proteinů, které úzce souvisejí s funkcemi mitochondrií, bývají obvykle sníženy. Naopak se zvyšuje exprese genů a proteinů, které souvisejí s oxidačním stresem, zánětlivou odpovědí organismu a reparačními enzymy (81).

Pro experimenty mé disertační práce byly vybrány dva ukazatele epigenetických změn. Prvním ukazatelem je globální methylace, která hodnotí hladinu 5-methyl-cytosinu ve vzorku DNA. Úroveň methylace DNA leukocytů je ovlivňována zejména mírou expozice karcinogenním faktorům prostředí a životního stylu (kouření, alkohol, chemické karcinogeny, ionizující záření a UV záření) (82-84). Měření globální methylace leukocytů v plné krvi proto může představovat užitečný biomarker pro sledování rizika vzniku rakoviny. Celogenomová hypomethylace DNA je snížení celkového obsahu genomového 5-methyl-cytosinu (ve srovnání s celkovým obsahem cytosinů). Dochází k ní například v nádorové tkáni, kdy z přibližně čtyř procent v normální tkáni poklesá na dvě až tři procenta ve tkáni nádorové. Hypomethylace se vyskytuje ve velké míře v repetitivních a středně repetitivních sekvencích a v sekvencích DNA s jednou kopií napříč genomem (82, 85, 86). Během stárnutí genomu s věkem dochází k celkovému poklesu globální metylace DNA, a tvrdí se, že pokles globální metylace DNA by mohl být důležitým faktorem stárnutí, který vede k uvolnění regulace genové exprese a abnormální genové expresi. V souvislosti s věkem však dochází ke změnám metylace DNA v určitých oblastech, na konkrétních místech genomu, i když se globální metylace DNA nemění (87).

Druhým použitým ukazatelem je metoda nazývaná „*Epigenetic clock*“. Ta je v současné době nejznámějším a nejuznávanějším biomarkerem stárnutí. O tom, že některé CpG dinukleotidy (ostrůvky) mění s rostoucím věkem množství methylovaných cytosinů se vědělo již od šedesátých let minulého století, avšak teprve v roce 2013 vydal profesor Horvath soubornou publikaci, která popisuje algoritmus počítající biologický věk na základě analýzy 353 CpG ostrůvků. Princip metody je postaven na měření jednotlivých oblastí genomu, ve kterých kvalitativně stanovuje přítomnost hypo a hypermethylace. Tyto „epigenetické hodiny“ dokážou u zdravých osob odhadnout kalendářní věk s vysokou přesností. Střední mediánová chyba se pohybuje v nižších jednotkách let v závislosti na odebíraném materiálu a konkrétním matematickém modelu, který metoda užívá. U osob nemocných nebo vystavených delšímu působení rizikových faktorů (kouření, obezita aj.) udává zpravidla čísla významně vyšší. Naopak u osob zdravých s nízkým množstvím rizikových faktorů vychází epigenetický biologický věk významně nižší než věk kalendářní. Proto je výsledný věk charakteristikou biologického věku jedince, která dokáže lépe popsat jeho riziko úmrtí z jakýchkoliv příčin (88-92).

3.3 Genomová nestabilita

Genomová nestabilita



Vyšší míra poškození DNA zvyšuje pravděpodobnost časného úmrtí (93). V průběhu života jedince je jeho komplex genetických informací ovlivňován řadou faktorů (chemických, fyzikálních a biologických), čímž dochází ke kumulaci defektů DNA. Se zvyšujícím se počtem defektů buňka stárne a roste riziko její smrti a/nebo maligní transformace (26, 94). Přirozenou ochranou proti kumulaci DNA defektů jsou reparační mechanismy, jejichž účinnost během života postupně klesá. Při neúspěšné reparaci nastupují u poškozené buňky mechanismy programované buněčné smrti (94).

Význam genetiky v procesu stárnutí potvrzují genetické faktory (geny a jejich varianty), které mohou délku života zkracovat. Příkladem může být existence vzácných genetických syndromů, které podmiňují procesy předčasného stárnutí jako například progerie (95). Společným znakem těchto syndromů je mutace/poškození genů zodpovědných za opravu

jaderné DNA nebo za stabilizaci struktur jádra (například gen pro lamin A). Syndromy mají časný nástup některých fenotypových projevů stáří (například aterosklerózy, osteoporózy, maligních nádorů a cukrovky) již v dětství a jsou příčinami předčasných úmrtí (96-98). Jsou však popsány i varianty genů, které naopak predisponují k dlouhověkosti. Jedná se o geny, které ovlivňují metabolismus tuků, tumor supresi, odpověď na poškození DNA a další (například APOE, P53 nebo SIRT1) (99).

Pro experimenty v této disertační práci jsme ke stanovení míry nestability genetické informace (poškození DNA) využili ukazatele oxidačního poškození ribonukleových kyselin (DNA/RNA), založené na bázi stanovení sérových hladin oxidovaných nukleotidových bází 8-hydroxy-20-guanosinu, 8-hydroxyguanosinu a 8-hydroxiguaninu. Uvedené báze vznikají během destrukce DNA/RNA při ataku reaktivních forem kyslíku (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Těžké poškození DNA pak indukuje apoptózu a urychluje stárnutí buněk (26). ROS jsou tvořeny reaktivními endogenními molekulami, které vznikají jako vedlejší produkty normálního aerobního metabolismu a/nebo zánětlivé/imunitní odpovědi. Během uvedených procesů dochází také k narušení signálních drah v buňkách, což vede k další akceleraci buněčného stárnutí. Oxidační stres se podílí na vzniku a rozvoji mnoha chronických onemocnění včetně psoriázy (26, 100-103).

3.4 Zkracování telomer

Zkracování telomer



Dostatečně dlouhé koncové části chromozomů (telomery) jsou jednou ze základních podmínek pro úspěšné buněčné dělení. Při mitotickém dělení se však telomery zkracují a po dosažení určité kritické délky dojde k zástavě procesu dělení (maximální počet dělení buněk je nazýván Hayflickův limit). Buňky izolované ze starších organismů proto v podmínkách in vitro vykazují menší počet dělení než buňky izolované z organismů mladších. Telomery jsou považovány za "bio-molekulární hodiny". Při postupném zkracování ztrácejí svou funkci a následně spouštějí replikační senescenci prostřednictvím signálních drah, označovaných jako „DNA damage response“ (DDR). Význam délky telomer v procesu stárnutí potvrzují výsledky in vivo studií, zaměřených na jejich umělé prodloužování. Prodloužení telomer mělo za následek

prodloužení aktivního života myši a genová terapie telomerázou dokázala zvrátit jejich předčasné stárnutí (104-106). Při interpretaci výsledků měření délky telomer je nutno rozlišovat, zda byly měřeny průměrné délky telomer nebo podíl buněk s telomerami krátkými (104). Pro účely mé disertační práce jsem zvolil metodu měření průměrné délky telomer pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), jak je popsáno níže.

3.5 Ostatní znaky stárnutí

Porucha homeostázy proteinů



Porucha homeostázy proteinů: V lidském těle dochází k neustálé obměně proteinů. S narůstajícím věkem se obměna zpomaluje vlivem poklesu míry produkce proteinů, selháváním mechanismů degradace starých či nefunkčních proteinů a snižováním aktivity mechanismů, které se podílejí na správném prostorovém uspořádání nově exprimovaných proteinových molekul. Odstraňování starých, poškozených či změněných makromolekul zajišťují lysozomy a ubiquitin-proteazomový systém. Degradativní aktivita obou cest se během stárnutí snižuje, což vede ke hromadění pozměněných/agregovaných proteinových makromolekul; vznikají například agregáty β -amyloidu, α -synukleinu a τ proteinu. Akumulace chybně složených nebo agregovaných polypeptidových řetězců přispívá k vývoji degenerativních onemocnění (107).

Narušené vnímání dostupnosti živin



Narušené vnímání dostupnosti živin: Růst a vývoj je u savců regulován růstovým hormonem a jeho sekundárním mediátorem, inzulinu podobným růstovým faktorem-1 (IGF-1). Intracelulární signální cesta IGF-1 je analogická signální cestě pro inzulin, a proto bývá souhrnně označována jako inzulin a IGF-1 signální cesta (IIS) (53). Dosud provedené in vivo studie naznačují, že organismy s konstitutivně sníženou aktivitou IIS se dožívají vyššího věku díky nižší úrovni metabolismu a buněčného růstu, a tím i pravděpodobně pomalejší akumulaci

poškození (108-110). Dlouhodobá aktivace této signální dráhy v dospělosti má za následek nežádoucí stimulaci dalšího vývoje organismu bez ohledu na ukončení jeho vývojového období, což vede k akumulaci poškození a k urychlení procesu stárnutí (111, 112). Studie, ve kterých byla aktivita této signální dráhy uměle snížena, pozorovaly naopak prodloužení života laboratorních zvířat (108-110).

Mitochondriální dysfunkce



Mitochondriální dysfunkce: Mitochondrie jsou jedním z nejdůležitějších buněčných zdrojů ROS, hlavním místem produkce adenosintrifosfátu (ATP) a hrají klíčovou roli v procesu buněčné smrti (113). Dlouhodobým působením ROS (v procesu stárnutí organismu) dochází k poškození mitochondriální DNA, matrixových mitochondriálních proteinů, komplexů respiračního řetězce a k ultrastrukturálním změnám mitochondrií. V důsledku těchto změn postupně klesá produkce ATP (114, 115).

S nárůstem věku dochází i ke snižování účinnosti procesů mitofagie a mitoptózy (procesů zániku a odstraňování mitochondrií) s následkem kumulace poškozených mitochondrií v buňkách (116, 117). Patologicky změněné (poškozené) mitochondrie se zapojují do rozvoje chronického nefunkčního zánětu ve stáří („*inflammaging*“). Změny morfologie a funkcí mitochondrií jsou tedy jak příčinou, tak i důsledkem procesu stárnutí (118) (119).

Buněčná senescence



Buněčná senescence je proces přeměny buněk z hlediska funkčního a morfologického. Senescentními se buňky stávají po extrémním zkrácení délky telomer nebo pod vlivem významného poškození DNA, například působením radiace nebo silných chemických karcinogenů (114). Proces senescence brání poškozeným buňkám v dalším dělení a zabraňuje

tak šíření nežádoucích mutací v těle. Senescentní buňky navíc produkují celou řadu cytokinů a imunitně aktivních molekul. Na jednu stranu jsou tedy senescentní buňky nezbytné pro správné fungování imunitního systému, neboť signalizují, že v jejich okolí a v nich samotných došlo k nestabilitě genetické informace. Mohou podpořit reparaci tkání, bránit tumorigenezi a jsou nezbytné dokonce i pro zdárnou embryogenezi, během které parakrinně ovlivňují vývoj končetin a remodelaci tkání (120). Na druhou stranu platí, že s rostoucím věkem se počet senescentních buněk ve tkáních zvyšuje z důvodu zhoršující se efektivity imunitního systému a kvůli dlouhodobé expozici mutagenům a zkráceným telomerám buněk. Tento stav vede k chronické dysfunkční stimulaci imunitního systému (*inflammaging*), který k procesu stárnutí naopak přispívá (53, 120).

Vyčerpání kmenových buněk



Vyčerpání kmenových buněk: Jednou z nejvýznačnějších charakteristik stárnutí je ztráta regeneračního potenciálu tkání. S věkem dochází nejen ke snížení hematopoézy, ale také k postupnému snížení funkce všech ostatních kmenových buněk (53). Studie na myších prokázaly, že hematopoetické kmenové buňky starších myší jsou schopny podstoupit menší množství buněčných dělení než buňky od myší mladých (121). Uvedený jev je zřejmě důsledkem akumulace poškození DNA a postupného zkracování telomer kmenových buněk (53, 122).

Předkládaná disertační práce prezentuje v experimentální části výsledky ze čtyř oblastí ukazatelů stárnutí. Konkrétně se jedná o genomovou nestabilitu, epigenetické změny, zkracování telomer a o změny v mezibuněčné komunikaci.

4 Ukazatele stárnutí a biologický věk

Kalendářní věk je přesně definován časovým intervalem mezi narozením a smrtí. Délka a kvalita života každého jedince je přitom modifikována řadou ovlivnitelných a neovlivnitelných faktorů stárnutí/onemocnění (tab. 1) (123-126).

Studium ukazatelů stárnutí (a biologického věku) si klade za cíl zpřesnění predikce vnímavosti osob ke vzniku a rozvoji onemocnění, k závažnosti jeho průběhu a k pravděpodobnosti výskytu komplikací či smrti. Jinými slovy, aktivity v této oblasti jsou zaměřeny na zpřesnění predikce délky a kvality života jedince a zpřesnění postupů v oblastech primární, sekundární a terciární prevence (104, 127, 128). Chronologický věk je neovlivnitelný, nicméně poslední poznatky naznačují, že biologický věk je proměnnou, kterou je možné ovlivňovat. Z toho vyplývá význam změny paradigmatu lékařského myšlení ve smyslu přijetí biologického věku jako ovlivnitelného rizikového faktoru vzniku a progresu nemoci (tab. 1) (123-126).

Tab. 1. rizikové faktory onemocnění (123-126)

Rizikové faktory nemocí

<u>Neovlivnitelné</u>	<u>Ovlivnitelné</u>
Pohlaví	Faktory životního stylu
Etnicita	Faktory prostředí
Genetika	Faktory organismu
Věk	————→ Biologický věk

Ukazatele biologického věku by měly být relativně jednoduché a snadno použitelné v klinické praxi. U zdravého člověka by jejich hodnoty měly odpovídat kalendářnímu věku jedince (v případě jednoduchých markerů hodnotě stejné věkové skupiny). To by umožnilo posoudit stav pacienta ve vztahu ke stavu jeho vrstevníků. Markery biologického věku by měly být rovněž univerzální, s použitelností v širokých populačních skupinách a věkových kategoriích. Samozřejmostí by měla být jejich replikovatelnost a stabilita (biologický věk by se neměl měnit v krátkém časovém intervalu o několik let). Standardním požadavkem je také přijatelná cena a nízká invazivita. Terminologicky se ukazatelé stárnutí liší od ukazatelů

biologického věku pouze svým výsledkem, kdy ukazatele stárnutí si nekladou za cíl popsat výsledek číslem blížícím se kalendářnímu věku. Jsou tedy náročnější na interpretaci, zatímco ukazatele biologického věku mají za výsledek číslo, které je pro osobu s akcelerovaným stárnutím vyšší než její věk kalendářní a naopak (129-131).

Rozdělení ukazatelů stárnutí

- Jednoduché
 - o Molekulární
 - Genomová nestabilita
 - Zkracování telomer
 - Epigenetické změny
 - Porucha homeostázi proteinů
 - Narušené vnímání dostupnosti živin
 - Mitochondriální dysfunkce
 - Buněčná senescence
 - Vyčerpání kmenových buněk
 - Změněná mezibuněčná komunikace
 - o Funkční (fyziologické)
 - o Antropometrické (anatomické)
- Složené (*clocks* a *-omics*)

Ukazatele stárnutí lze v prvním přiblížení rozdělit na markery jednoduché, s dalším dělením na markery molekulární, funkční a antropometrické, a na markery složené („*clocks*“ a „*-omics*“).

Jednoduché ukazatele měří jen jeden parametr nebo úzkou skupinu parametrů spolu souvisejících, u nichž je známá souvislost s věkem (změna parametru v průběhu stárnutí člověka nebo experimentálního modelu) (131). Molekulární ukazatele vychází z objektivně měřitelných laboratorních parametrů v tělních tekutinách a ve tkáních. Můžeme je rozdělovat do skupin podle znaku stárnutí, který zachycují. Jednotlivé znaky stárnutí byly popsány v předcházejících kapitolách (změněná mezibuněčná komunikace, epigenetické změny, genomová nestabilita, zkracování telomer, porucha homeostázy proteinů, změna vnímání

dostupnosti živin, mitochondriální dysfunkce, buněčná senescence a vyčerpání kmenových buněk) (53, 132, 133).

Funkční ukazatele popisují fyziologický stav organismu. Nejjednodušším příkladem může být maximální tepová frekvence, jejíž hodnota se snižuje v průběhu života jedince. Sofistikovanějším ukazatelem je výsledek zátěžová ergometrie (např. index W170), která hodnotí adaptační kapacitu kardiovaskulárního systému na fyzickou zátěž. Rychlejší nárůst tepové frekvence při zátěži indikuje nižší odolnost organismu. Nejlepší kardiovaskulární kondice dosahuje jedinec okolo druhé až třetí dekády života, poté dochází k jejímu postupnému snižování (134-136). K dalším důležitým fyziologickým ukazatelům, jejichž hodnoty jsou významně ovlivňovány věkem patří například spirometrie, svalová síla, rychlost chůze a krátký test kognitivních funkcí („Mini-Mental-State Exam“) (134, 135, 137).

Antropometrické ukazatele stárnutí popisují morfologii organismu. Typickým ukazatelem je například množství a rozložení tělesného tuku. V průběhu života množství tukové tkáně obvykle narůstá, nicméně, v poslední fázi může docházet naopak k jejímu úbytku (kachektizaci). Tělesná váha, BMI (*Body Mass Index*), obvod pasu a úroveň bioelektrické impedance tak mohou poskytnout užitečné informace o stavu organismu a orientačním biologickém věku jedince (k přesnějšímu měření množství tělesného tuku se využívá kaliperace). V průběhu života se mění rovněž struktura a objem svalové tkáně. Její množství lze stanovit pomocí zobrazovacích metod a bioelektrické impedance. Nejjednodušší formou zhodnocení stavu svalové hmoty je měření obvodu velkých svalových skupin. Dalším antropometrickým ukazatelem, závislým na věku, je výška postavy (138-140).

Složené ukazatele stárnutí představují efektivní nástroj pro hodnocení biologického věku. Kombinují v sobě velké množství dat, které vyhodnocují pomocí algoritmů, opírajících se o možnosti umělé inteligence. Složené biomarkery lze rozdělovat do dvou skupin. První skupina zahrnuje „*clocks*“ (hodiny). Jejich příkladem může být metoda *epigenetic clock* popsané výše. Aplikováním většího množství dat na matematický model obvykle využívající umělou inteligenci (respektive strojové učení) lze odhalit biologický věk jedince. Druhá skupina, tzv. „*omics*“, vychází z měření metabolomu, proteomu, transkriptomu, či jiných komplexních měření všech látek v daném kompartmentu (53, 133, 141-145).

Vyšší biologický věk odhalení pomocí *epigenetic clock* je spojován s velkým množstvím stavů (rizikových faktorů) souvisejících s věkem: zvyšující se riziko rakoviny, Alzheimerova choroba, horší fyzická kondicí i kognitivní schopnosti. Metoda měření

epigenetického biologického věku se stále vyvíjí a zlepšuje. Nejnovější poznatky ukazují, že methylace DNA významně souvisí s předpokládanou nadějí dožití (délkou období do úmrtí v důsledku smrti z jakýchkoliv příčin). Metoda je totiž schopna pozorovat nejen změny spojené se stárnutím, ale také změny methylačního profilu objevující se při rizikovém chování (např. při kouření) (53, 133, 141-145).

Ve své disertační práci jsem se nejvíce zabýval skupinou jednoduchých a složených ukazatelů stárnutí založených na stanovování molekulárních mechanismů jednotlivých znaků stárnutí.

5 Psoriáza, zánět a stárnutí

S přibývajícím věkem dochází k přirozeným změnám vzhledu a funkce kůže. Změny jsou dále umocňovány působením biologických, chemických a fyzikálních faktorů. Při stárnutí dochází k degradaci a dezorganizaci kolagenových a elastických vláken v dermis a na dermálně-epidermálním spojení, což má za následek snížení elasticity a pevnosti kůže v tahu (146-148). K větší křehkosti kůže u starších lidí přispívá i zhoršení epidermálních buněčných spojů. Stafylokokové a streptokokové kožní infekce jsou u starších lidí časté v důsledku snížení bariérové funkce kůže a její imunitní obranné schopnosti. Riziko infekce zvyšuje i zhoršené (prodloužené) hojení ran (149-151).

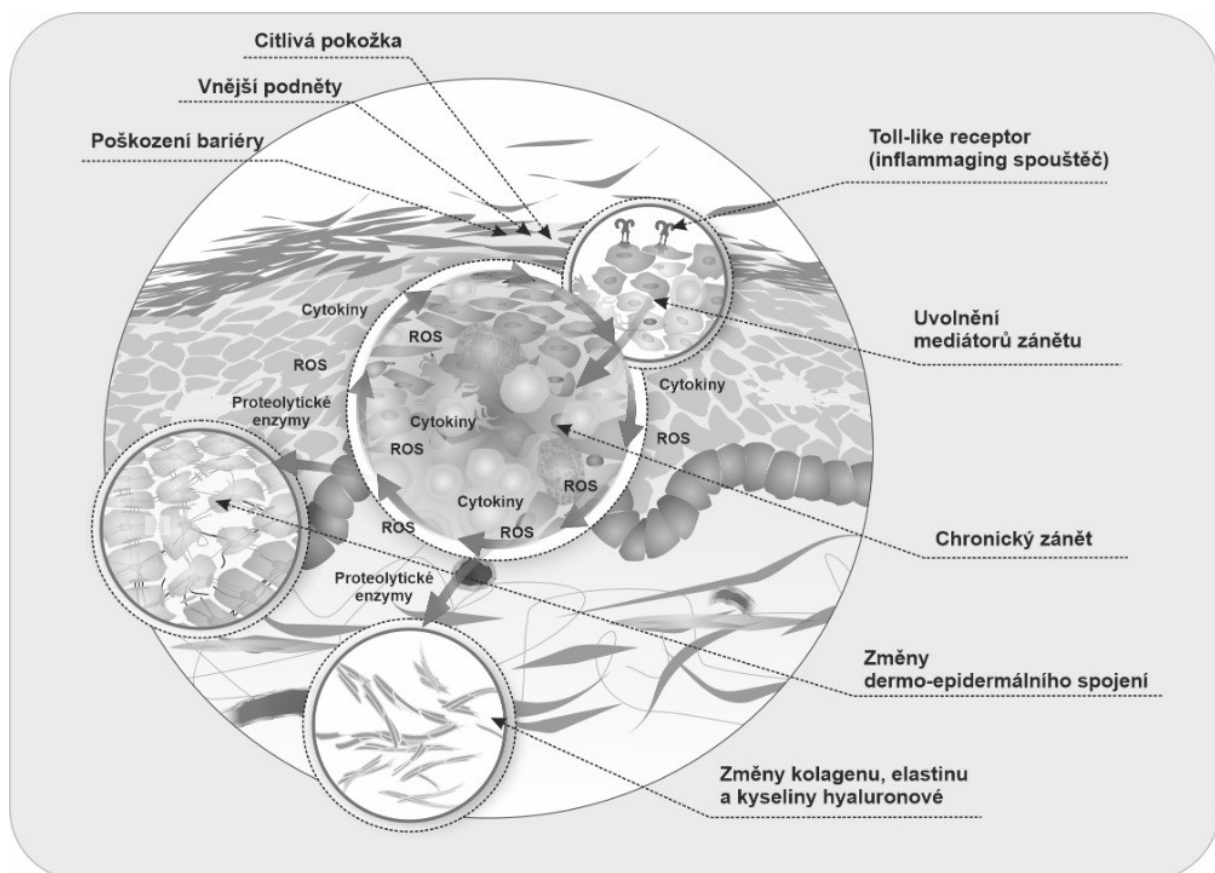
Redukce imunitních funkcí (s věkem) zahrnuje i pokles adaptivní imunity, označovaný jako imunosenescence, který je charakterizován omezenou schopností imunitního systému účinně reagovat na nové výzvy prostředí. Jev je připisován sníženému poměru naivních a paměťových T lymfocytů, zhoršené efektorové funkci, omezenému receptorovému repertoáru T-buněk, snížené diverzitě protilátek a zvýšení počtu senescentních buněk (146, 152, 153). Imunosenescence je doprovázena chronickým systémovým zánětem nízkého stupně, označovaným jako „*inflammaging*“, při kterém jsou zvýšeny sérové hladiny zánětlivých cytokinů IL-6, IL-8 a TNF- α . Cytokiny jsou vylučovány buňkami vrozené imunity a neimunitními buňkami, které se s věkem stávají nefunkčními (dendritickými buňkami, neutrofilů, makrofágy a fibroblasty) (154-157). V současné době není zcela zřejmé, zda je zánět důsledkem nebo příčinou defektní vrozené imunitní odpovědi, nicméně se předpokládá, že uvedené abnormality zvyšují úmrtnost starších osob při expozici virovým respiračním infekcím a jsou hnací silou rozvoje onemocnění souvisejících s věkem (artritidy, diabetes druhého typu a Alzheimerovy choroby). Poznatky o tom, jak tyto procesy mohou přispívat ke stárnutí kůže, jsou zatím velmi omezené (146, 158-160)

S věkem dochází k poklesu intenzity reakce B a T lymfocytů na antigenní podněty a k nárůstu exprese autoprotiilátek. Populace naivních T-buněk se stárnutím klesá a dochází k akumulaci paměťových buněk. Se stimulací dochází k posunu od Th1 k Th2 cytokinovým profilům, což by mohlo zvyšovat autoimunitní poruchy zprostředkované B buňkami. Tento změněný cytokinový profil je pravděpodobně způsoben zvýšeným poměrem paměťových a naivních T buněk. Celkové snížení odpovědi B buněk na stimulaci se přičítá snížené aktivitě Th a změnám ve vývoji B buněk (161-163).

Ve většině případů nemá mírné zvyšování hladin autoreaktivních protilátek závažnější klinický projev a jejich stav je udržován na přijatelné úrovni cestami mechanismů tolerance. V procesu stárnutí se však imunitní systém posouvá k Th2 odpovědi, mechanismy tolerance selhávají a autoreaktivní protilátky se stávají klinicky významnými. Stacy et al. se domnívají, že nárůst autoimunitních projevů s věkem je důsledkem aktivace paměťových B-buněk "neoantigeny" (162, 164, 165).

Inflammaging (chronický systémový zánět nízkého stupně) je důsledkem nevyvážené regulace imunitního systému. Jedná se o chronický, dysfunkční, poškozující zánět, způsobený nerovnováhou mezi vrozenou a adaptivní imunitou (obr. 5). Vrozená imunita si udržuje i ve vyšším věku relativně vysokou úroveň, zatímco účinnost adaptivního imunitního systému klesá (166, 167).

Obr. 5. Proces zánětu ve stáří, *inflammaging* (166, 167)



Právě představa podobnosti chronického dysfunkčního poškozujícího zánětu během stárnutí a při autoimunitním onemocnění v podobě elevace prozánětlivých cytokinů a dalších faktorů vedla k postulaci hypotéz této disertační práce. Ta si klade za cíl lépe popsat vztah mezi rozvojem zánětu u autoimunitního onemocnění, psoriázy, procesem stárnutí a chronologicky dřívější přítomností asociovaných onemocnění psoriázy.

6 Psoriáza a ukazatelé stárnutí

V odborné literatuře lze nalézt jen velmi omezené množství prací zaměřených na hodnocení biologického věku u osob s psoriázou.

Studie Shed et al. se zabývala měřením biologického věku metodou *epigenetic clock* ze vzorků psoriatické kůže. Ke své studii využili soubor dat čínské populace Han, který zahrnuje data DNA methylací (DNAm) 114 postižených psoriatických kožních tkání (PP) a 41 nepostižených psoriatických kožních tkání (PN) od pacientů s Ps a 62 normálních kožních tkání (NN) od zdravých kontrol. Jejich výsledky nenaznačili žádné významné změny v epigenetickém stáří u PN a PP. Zvýšení proliferace keratinocytů a změna DNAm způsobená psoriázou tedy nemusí mít vliv na biologické stáří psoriatické kožní tkáně (168). Tato studie jako první zkoumala, zda kožní tkáně psoriatiků trpí zrychleným stárnutím s tomu odpovídajícím methylačním profilem. Dle slov autorů byla jejich studie částečně motivována skutečností, že keratinocyty kůže postižené psoriázou obvykle podléhají abnormální a rychlé proliferaci. To je rys, který se podobá stárnoucím jedincům a nádorům, u nichž došlo k nadměrnému mitotickému dělení buněk. Takové nadměrné dělení v somatických buňkách by mohlo způsobit rozsáhlé pasivní změny methylace DNA (168-170). To jim poskytlo hypotézu, že dotčené části kůže mohou mít ovlivněný methylom DNA a stáří methylace, které se podobá vzorci u stárnoucích buněk nebo nádorových buněk. Jejich pozorování však této hypotéze odporovala, epigenetický věk se zdál být psoriázou neovlivněný (168, 171).

V rámci naší hypotézy o změně rychlosti stárnutí u psoriatiků se domníváme, že kožní problémy s psoriázou spojené jsou pouze projevem, ale ne příčinou onemocnění. Etiopatogeneze psoriázy spočívá, jak bylo pospáno výše v dysfunkci imunitního systému, která až sekundárně dává za vznik typickým klinickým kožním projevům. Právě z tohoto důvodu jsme se rozhodli měřit epigenetický věk v krvi, respektive leukocytech jakožto majoritních jaderných buňkách krve.

U pacientů s psoriázou byla zkoumána také délka telomer. Wu et al. ve své studii objevili zkrácené telomery a vyšší aktivitu telomerázy, enzymu telomery prodlužujícího. Naznačili, že zvýšená aktivita telomerázy a zkrácená délka telomer je následkem chronicky stimulovaných T lymfocytů psoriatiků, neboť jejich T lymfocyty mají zvýšený buněčný obrat *in vivo*. Telomerázová aktivita (enzymatická aktivita směřující k prodlužování telomer pomocí enzymu telomerázy) byla totiž významně zvýšena u pacientů ve srovnání s dárci. Délka telomer byla významně snížena u všech podskupin T buněk pacientů s psoriázou ve srovnání s

normálními osobami (172). Studie Coussens et al. naznačila nejednotnost ve výsledcích stanovování délky telomer u pacientů s psoriázou v literatuře. Jejich výsledky totiž nepodpořili délku telomer jako ukazatele pro predikci MetS nebo KVO u pacientů s psoriázou. Délka telomer nebyla změněná (132).

V širším slova smyslu, lze jakoukoliv ze studií, které se zabývaly fungováním imunitního systému u psoriatiků s ohledem na jejich věk posoudit jako náhled na ukazatele stárnutí. Avšak žádná z nich si nekladla za cíl posoudit autoimunitní onemocnění (psoriázu) s důrazem na problematiku stárnutí ve světle poznatků o znacích stárnutí dle publikace *Hallmarks of aging* nebo novějších (53).

Z výše uvedených informací vyplývá, že osoby s psoriázou se dožívají nižšího věku a jsou vystaveny zvýšené pravděpodobnosti vzniku a rozvoje asociovaných onemocnění (komorbidit). Biologický věk lze považovat za ovlivnitelný faktor vzniku a progresu nemocí, nicméně, dosud nebyla provedena studie, která by s využitím recentních metod odhadu biologického věku a ukazatelů stárnutí (*The Hallmarks of aging*) analyzovala vztahy mezi psoriázou, stárnutím a pravděpodobností vzniku asociovaných onemocnění. Pochopení těchto vztahů může významně přispět ke zpřesnění postupů v oblastech primární, sekundární a terciární prevence psoriázy a jejích komorbidit.

B CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

STÁVAJÍCÍ STAV:

Osoby s psoriázou se dožívají nižšího věku a mají zvýšenou pravděpodobnost rozvoje asociovaných onemocnění (komorbidit). Možné souvislosti mezi dysfunkčním chronickým zánětem vyvolaným procesem stárnutí (*inflammaging*) a procesem autoimunitního onemocnění (psoriázy) nebyly dosud blíže objasněny.

CÍLE:

1. Posoudit vhodnost (použitelnost) vybraných ukazatelů procesu stárnutí pro modelový systém onemocnění psoriázou a jejími komorbiditami.
2. Použít vhodné ukazatele procesu stárnutí pro analýzu vztahů mezi psoriázou, stárnutím a vznikem komorbidit.

HYPOTÉZA:

Níže uvedené vybrané ukazatele jsou vhodné pro charakteristiku procesu stárnutí a k odhadům biologického věku u modelového systému onemocnění psoriázou a jejími komorbiditami. Psoriáza a její komorbidity všechny vybrané ukazatele stárnutí významně ovlivňují. *Vybrané (posuzované) ukazatele: Hladiny HMGB1, IL-33, S100A7, S100A12, IL-17, VEGF a endocanu, CRP, globální methylace DNA, detailní methylace DNA (epigenetic clock), míra oxidačního poškození DNA/RNA a délka telomer.*

C. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1 Metody a soubor nemocných

1.1 Charakteristika souborů a náplň studií

Odběry vzorků plné krve byly prováděny v letech 2016 až 2020. Celkově byla odebrána krev od 132 osob s psoriázou (pacienti) a 167 náhodně vybraných zdravých osob srovnatelného věku, pohlaví a životního stylu (kontroly). Faktory životního stylu (s důrazem na kouření) byly zjišťovány formou dotazníku. Ve skupině pacientů bylo 72 mužů a 60 žen, ve skupině kontrol 85 mužů a 82 žen.

Byly provedeny tři nezávislé studie, na základě kterých jsme posuzovali vhodnost (použitelnost) vybraných ukazatelů úrovně procesu stárnutí na modelovém systému onemocnění psoriázou a jejími komorbiditami. Sledované ukazatele byly vybrány ze skupiny jednoduchých molekulárních ukazatelů stárnutí a ze skupiny složených ukazatelů stárnutí. Pro hodnocení změněné mezibuněčné komunikace byly vybrány parametry HMGB1, IL-33, S100A7, S100A12, endocan, VEGF, IL-17 a CRP. Pro hodnocení genomové nestability byla vybrána úroveň oxidačního poškození DNA/RNA a ke kvantifikaci epigenetických změn úroveň globální methylace a metoda *epigenetic clock*. Jako klasický znak stárnutí byla vybrána míra zkracování telomer.

První studie byla zaměřena na hodnocení vlivu psoriázy a komorbidit na hladiny ukazatelů zánětu ze skupiny alarminů (HMGB1, IL-33, S100A7, S100A12). Studie se zúčastnilo 63 pacientů (34 mužů, 29 žen) a 95 kontrol (49 mužů a 46 žen).

Druhá studie byla zaměřena 1) na hodnocení vlivu psoriázy a jejích komorbidit na hladiny ukazatelů zánětu IL-17, VEGF, endocanu a CRP a 2) na analýzu vztahu mezi epigenetickým a kalendářním věkem pacientů s psoriázou a komorbiditami (epigenetic clock; počítačové vyhodnocení methylace více než 500 genových lokusů DNA souvisejících s věkem). Studie se zúčastnilo 28 pacientů (17 mužů a 11 žen) a 42 kontrol (21 mužů a 21 žen).

Třetí studie byla zaměřena na hodnocení vlivu psoriázy a jejích komorbidit 1) na hladiny globální methylace DNA, 2) na hladiny oxidačního poškození DNA/RNA a 3) na změny v délce telomer. Studie se zúčastnilo 41 pacientů (21 mužů a 20 žen) a 30 kontrol (15 mužů a 15 žen).

1.2 Odběry krve a analýzy vybraných parametrů ze séra

V případě parametrů stanovených ze séra byly vzorky periferní krve z kubitální žíly odebrány pomocí zkumavek Vacutainer (Becton Dickinson). Poté bylo izolováno krevní sérum (odstředěním po dobu 10 minut při 1300 g) a vzorky séra byly až do analýzy zmrazeny (-70 °C). Bylo zabráněno opakovaným cyklům rozmrazování a zmrazování.

Sérová hladina HMGB1 byla stanovena ELISA metodou (Human HMGB1 ELISA; IBL International GmbH, Hamburg, Germany) s mezí detekce 0,20 ng/ml.

Sérová hladina cytokinu IL-33 byla stanovována ELISA metodou (Quantikine ELISA Human IL-33 Immunoassay; R&D System, Inc, Minneapolis, MN, USA) s mezí detekce 0,357 pg/ml. Hodnoty absorbance byly odečteny při 450nm a 620nm pomocí Multiskan RC ELISA (Thermo Fisher Scientific, USA).

Sérové hladiny S100A7 a S100A12 byly stanoveny ELISA metodou (ELISA Kit For S100 Calcium Binding Protein A7 /S100A7/ a ELISA Kit For S100 Calcium Binding Protein A12 /S100A12/; Cloud-Clone Corp., Houston, TX, USA) s mezemi detekce 0,050 ng/ml (S100A7) a 0,031 ng/ml (S100A12). Vzorky byly ředěny 10krát (S100A7) a 50krát (S100A12).

Sérová hladina Endocanu byla analyzována ELISA metodou (ELISA Human ESM1; Abcam, UK). Vzorky byly ředěny desetkrát a rozsah měření se pohyboval od 300 do 20000 pg/ml.

Sérová hladina VEGF byla analyzována ELISA metodou (Quantikine ELISA Human VEGF; R&D Systems, MN, USA). Vzorky nebyly ředěny a rozsah měření se pohyboval od 15,6 do 1000 pg/ml.

Sérová hladina cytokinu IL-17 byla analyzována ELISA metodou (Quantikine ELISA Human IL-17; R&D Systems, MN, USA). Vzorky séra nebyly ředěny a rozsah měření se pohyboval od 20 do 2000 pg/ml.

Sérová hladina CRP byla stanovena pomocí imuno-nefelometrie (IMMAGE 800, Beckman, Brea, CA, USA). Výsledky byly vyjádřeny v miligramech na litr séra s mezí detekce 1,0 mg/l.

K měření úrovně oxidačního poškození nukleových kyselin (poškození DNA/RNA) ze séra byla použita sada EIA (Enzyme Immunoassay, Cayman Chemical Company, MI, USA). Poškození bylo vyhodnoceno jako suma tří oxidovaných guaninových struktur v séru.

Konkrétně se jednalo o 8-hydroxy-2-deoxyguanosin uvolněný z DNA, 8-hydroxyguanosin uvolněný z RNA a 8-hydroxyguanin uvolněný z DNA nebo RNA. Úroveň poškození DNA/RNA jsme měřili v pg sumy guaninových struktur na ml séra. Detekční limit byl 33 pg/ml séra.

1.3 Odběry krve a analýzy vybraných parametrů z plné krve

Pro účely stanovení úrovně methylace DNA metodou „*epigenetic clock*” byly vzorky žilní krve odebrány pomocí zkumavek Vacutainer Becton Dickinson (ošetřené EDTA). Vzorky byly až do analýzy zmrazeny (-70 °C) a bylo zabráněno opakovaným cyklům rozmrazování a zmrazování. Do doby analýzy byly vzorky chráněny činidlem DNA/RNA Shield™ od společnosti Zymo Research Corp. (CA, USA, kat. č. R1100). Vzorky DNA byly přečištěny z plné krve pomocí soupravy Quick-DNA™ Miniprep Plus (Zymo Research Corp., CA, kat. č. D4068). Všechny vzorky prošly kontrolou kvality provedenou přístrojem Nanodrop. Bisulfitová konverze byla provedena pomocí soupravy EZ DNA Methylation-Lightning™ (Zymo Research Corp., CA, kat. č. D5030) podle standardního protokolu. Vzorky byly poté obohaceny pro sekvenování > 500 genových lokusů souvisejících s věkem. Hodnoty methylace DNA vzorků plné krve byly získány ze sekvenačních dat a použity k posouzení stáří DNA podle patentovaného prediktoru DNAge® společnosti Zymo Research.

Pro měření úrovně globální methylace DNA byla DNA extrahována ze vzorků žilní krve ošetřené EDTA podle pokynů výrobce (QIAamp Blood Mini Kit, Germany). Pro analýzu globální methylace DNA bylo použito 100 ng DNA. Hladina 5-metylcytosinu (5-mC) byla stanovena ELISA metodou pomocí soupravy 5-mC DNA ELISA Kit (Zymo Research Corporation, CA, USA) podle pokynů výrobce.

Po extrakci DNA dle výše uvedeného postupu byla délka telomer stanovována setem Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (ScienCell, USA). Stanovení bylo založeno na přímém měření průměrné délky telomer pomocí technologie PCR (Rotor-Gene 6000, Corbett Research, Austrálie). Podle pokynů výrobce byla získaná data normalizována na referenční vzorek lidské genomové DNA (byl dodán v setu). Výsledky byly vyjádřeny jako průměrná délka telomer (kilobáze, kb) na chromozom.

1.4 Statistické vyhodnocení

Všechna data byla statisticky zpracována pomocí programu MedCalc verze 19.0.5 (MedCalc software, Belgie) nebo v programovém prostředí 3.6.1 “nortest”, “compute.es”, a “ggplot2”. nebo v programu Statistica verze 13.5.0.17 (TIBCO Software Inc., CA, USA). Na základě D'Agostinova-Pearsonova testu nebo Anderson-Darlingova nebo Shapiro-Wilkova testu pro rozdělení dat byl použit buď parametrický, nebo neparametrický test pro zajištění správné citlivosti testu. Souvislosti mezi jednotlivými parametry byly hodnoceny pomocí Pearsonova korelačního testu a Spearmanova korelačního testu pořadí. Meziskupinové rozdíly byly hodnoceny pomocí Studentova t-testu nebo Mannova-Whitneyho testu. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud byla hladina pravděpodobnosti (p) nižší než hladina alfa 0,05.

1.5 Determinace tíže onemocnění

Determinace tíže onemocnění byla provedena pomocí standardizované klinické evaluace, tzv. PASI (*Psoriasis area severity index*), které se vypočítává na základě objektivně stanovitelného erytému, deskvamace pokožky a kožní infiltrace (18).

1.6 Charakteristiky fyziologického stavu (BMI, MetS)

Hodnocení přítomnosti metabolického syndromu (MetS) bylo u sledovaných osob provedeno v souladu s kritérii Národního cholesterolového vzdělávacího programu pro dospělé (NCE/ATPIII). Diagnózu MetS lze stanovit, pokud jsou přítomna tři z následujících pěti uvedených kritérií: zvýšený obvod pasu nebo abdominální obezita (≥ 102 cm u mužů a ≥ 88 cm u žen), glukózová intolerace prezentovaná vyšší glykemií nalačno ($\geq 5,6$ mmol/l) nebo známou léčbou diabetu, zvýšená hladina triglyceridů (TAG; $\geq 1,7$ mmol/l), snížená hladina lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL cholesterol) a zvýšený krevní tlak (systolický krevní tlak ≥ 130 mmHg, a/nebo diastolický krevní tlak ≥ 85 mmHg) (26).

Index tělesné hmotnosti (BMI), který se vypočítá jako hmotnost v kilogramech dělená výškou v metrech čtverečních (kg/m^2), je ukazatelem relativní hmotnosti a má přímou souvislost se zdravotními riziky a úmrtností (173).

2 Výsledky

2.1 Výsledky první studie (hladiny alarminů)

Medián PASI skóre ve skupině pacientů byl 17,4 (N = 63; interkvartilové rozpětí 13,3-21,0). Sérové hladiny všech sledovaných alarminů byly ve skupině pacientů významně zvýšené.

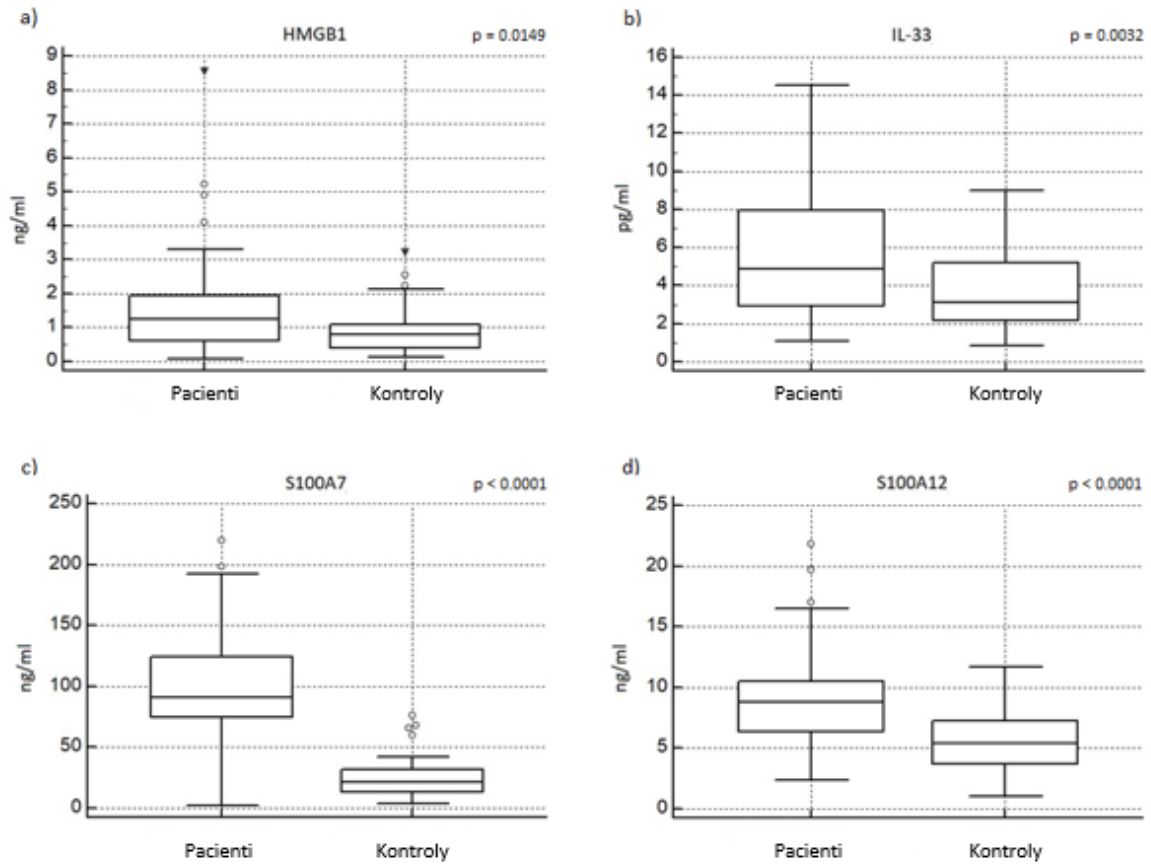
Hladina HMGB1 byla významně vyšší ve skupině pacientů (ng/ml; pacienti, N = 51, medián 1,250, mezikvartilové rozpětí 0,608-1,942; kontroly, N = 35, medián 0,810, mezikvartilové rozpětí 0,390-1,092; $p < 0,05$; obrázek 6(a)).

Hladina IL-33 byla významně vyšší ve skupině pacientů (pg/ml; pacienti, N = 51, medián 4,890, interkvartilové rozpětí 2,945-7,962; kontroly, N = 35, medián 3,110, interkvartilové rozpětí 2,158-5,200; $p < 0,01$; obrázek 6(b)).

Hladina S100A7 byla významně vyšší ve skupině pacientů (ng/ml; pacienti, N = 63, medián 91,0, interkvartilové rozpětí 75,0-124,0; kontroly, N = 60; medián 21,7, interkvartilové rozpětí 13,0-31,7; $p < 0,0001$; obrázek 6(c)).

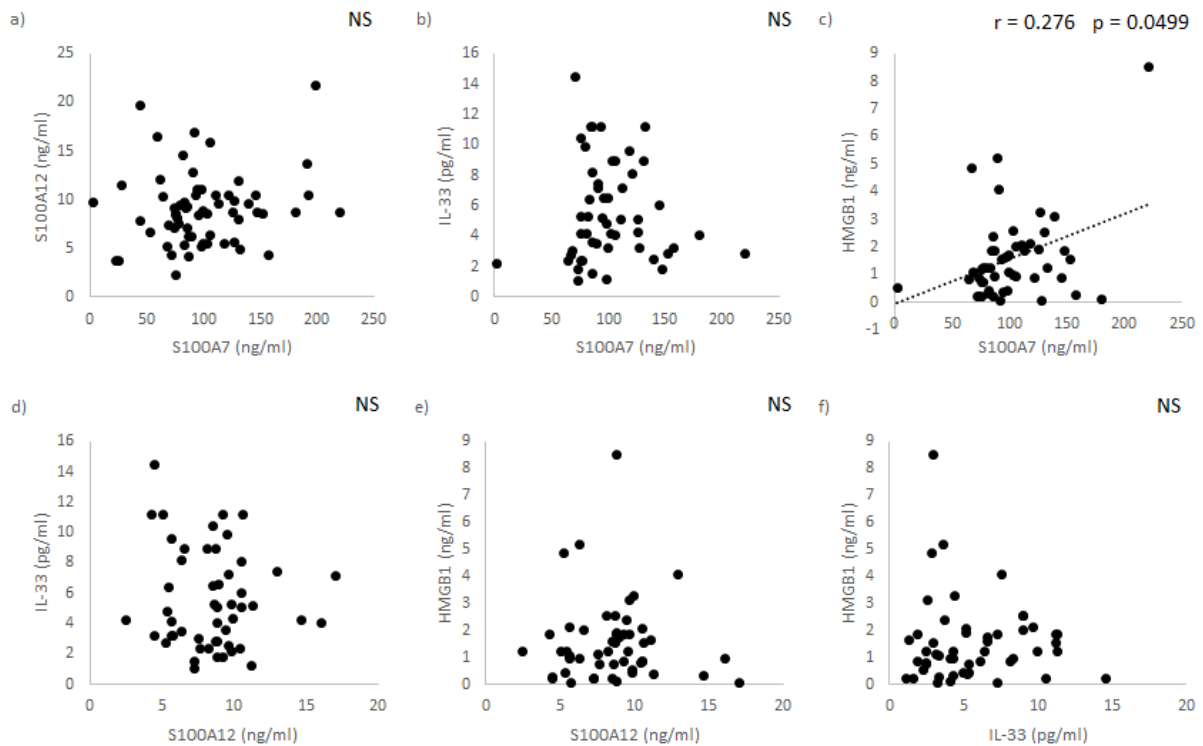
Hladina S100A12 byla významně vyšší ve skupině pacientů (ng/ml; pacienti, N = 63, medián 8,80, mezikvartilové rozpětí 6,35-10,50; kontroly, N = 60; medián: 5,40; mezikvartilové rozpětí 3,70-7,25; $p < 0,0001$; obrázek 6(d)).

Obr. 6. Hladiny alarminů u pacientů a kontrol



Byl nalezen významný vztah mezi HMGB1 a S100A7 (Spearman rho = 0,276, $p < 0,05$) ve skupině pacientů a významný vztah mezi HMGB1 a IL-33 ve skupině kontrol (Spearman rho = 0,416, $p < 0,05$). Mezi PASI a žádným z alarminů nebyl zjištěn významný vztah (Obr. 7).

Obr. 7. Vztahy mezi jednotlivými alarminy ve skupině pacientů



2.2 Výsledky druhé studie

2.2.1 Hladiny endocanu, VEGF, IL-17 a CRP

U pacientů jsme zjistili významně zvýšené hladiny IL-17 (pg/ml; pacienti, N = 28, medián 23,35, interkvartilové rozpětí 19,40-26,50; kontroly, N = 28, medián 18,00, interkvartilové rozpětí 15,30-19,25; $p < 0,0001$) a významně nižší hladiny endocanu ve srovnání s kontrolami (pg/ml; pacienti, N = 26, medián 278, interkvartilové rozpětí 243-346; kontroly, N = 28, medián 387, interkvartilové rozpětí 296-483; $p < 0,001$).

Významně nižší hladiny endocanu a vyšší hladiny IL-17 byly zjištěny také v podskupině pacientů mužského pohlaví: endocan (pg/ml; pacienti, N = 16, medián 274, mezikvartilové rozpětí 246-330; kontroly, N = 11, medián 429, mezikvartilové rozpětí 300-507; $p = 0,0042$) a IL-17 (pg/ml; pacienti, N = 17, medián 22,30, interkvartilové rozpětí 18,90-25,10; kontroly, N = 11, medián 18,90, interkvartilové rozpětí 15,30-21,30; $p = 0,0286$).

Významně vyšší hladiny IL-17 byly zjištěny v podskupině pacientek (pg/ml; pacientky, N = 11, medián 24,30, interkvartilové rozpětí 21,50-28,90; kontroly, N = 17, medián 15,70, interkvartilové rozpětí 15,30-18,90; $p < 0,0001$).

Hladiny VEGF významně změněné nebyly.

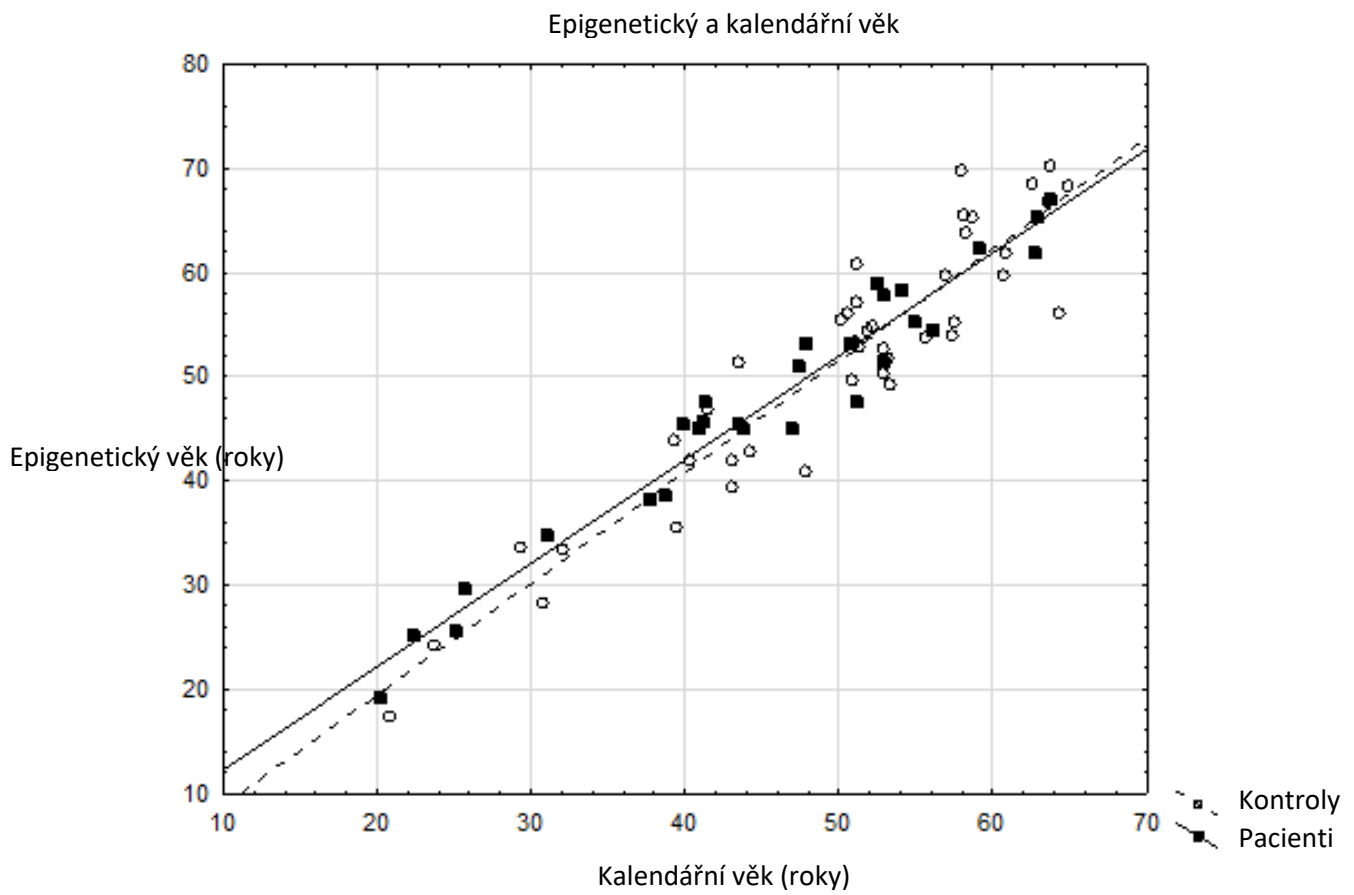
Ve skupině pacientů jsme při medianu PASI 18,7 zjistili významně vyšší hladiny CRP oproti kontrolám (mg/l; pacienti, N = 28, medián 3,1, interkvartilové rozpětí 2,1-5,5; kontroly, N = 22, medián 1,4, interkvartilové rozpětí 1,1-1,7, $p < 0,001$). CRP zároveň pozitivně korelovalo s chronologickým věkem (Spearman rho = 0,590; $p < 0,001$).

2.2.2 Úroveň methylace DNA stanovená metodou *epigenetic clock*

Analýza vztahu mezi epigenetickým věkem a chronologickým věkem neprokázala statisticky významný rozdíl mezi kontrolami a pacienty (Obr. 8).

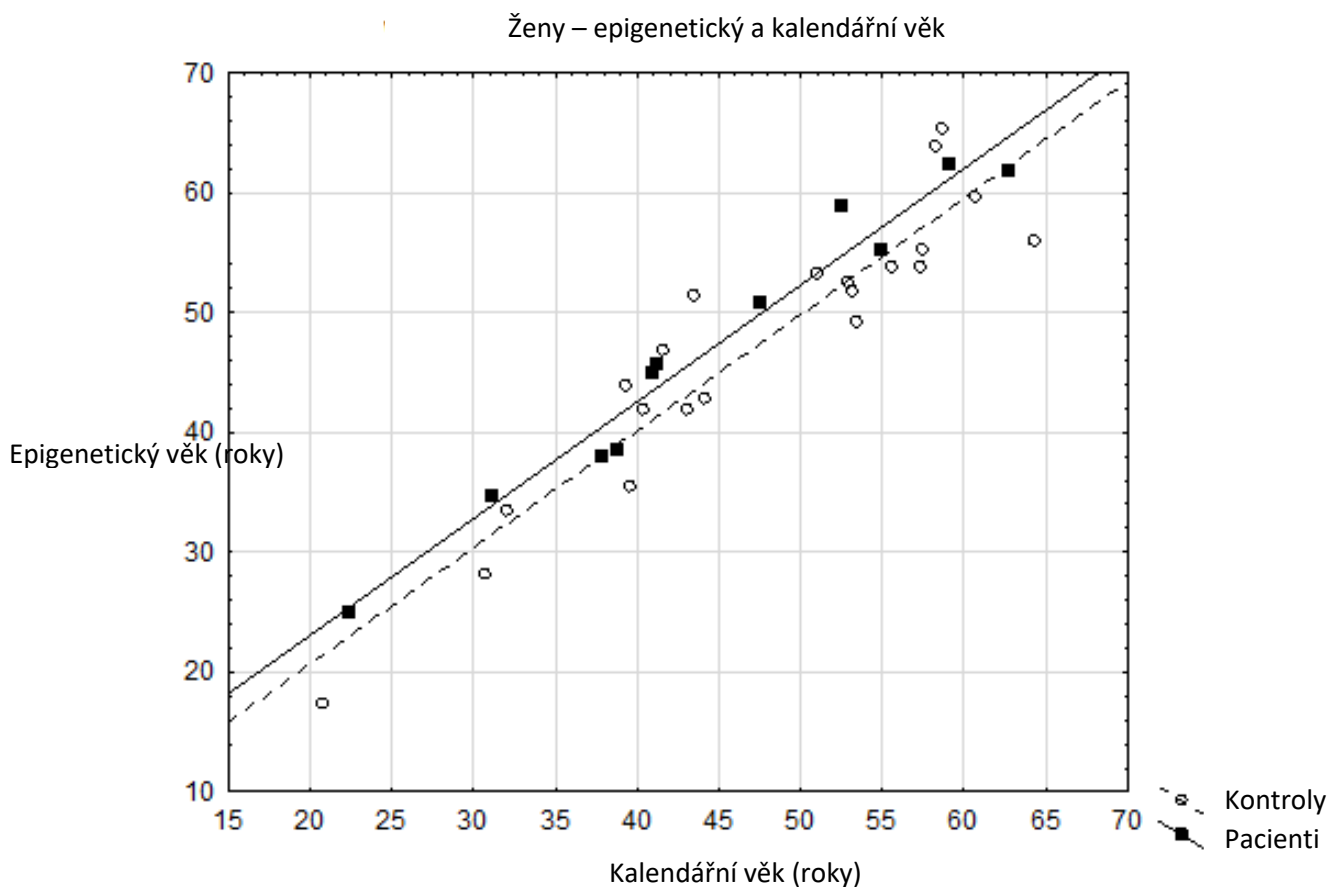
Významný rozdíl mezi kalendářním a epigenetickým věkem byl však nalezen u podskupiny žen s psoriázou. Procentuální rozdíl mezi kalendářním a epigenetickým věkem (Age diff) žen s psoriázou byl vyšší než Age diff žen v kontrolní skupině (%; pacienti, N = 11, medián 7,0, interkvartilové rozpětí 0,4 - 11,0; kontroly, N = 21, medián -3,0, interkvartilové rozpětí -6,0-4,0; $p=0,0404$; Obr. 9 a Obr. 10). Medián rozdílu mezi epigenetickým a chronologickým věkem dosahoval hodnoty 3,2 roku u žen s psoriázou (interkvartilové rozpětí 0,2-4,1 roku), zatímco u zdravých žen (kontrol) hodnoty -1,3 (interkvartilové rozpětí -2,6-2,2 roku). Ženy s psoriázou tak byly zjednodušeně o přibližně čtyři roky biologicky (epigeneticky) starší než ženy zdravé. U podskupiny mužů (pacientů) výše uvedený jev pozorován nebyl (Obr. 11).

Obr. 8. Kalendářní a epigenetický věk u pacientů a kontrol



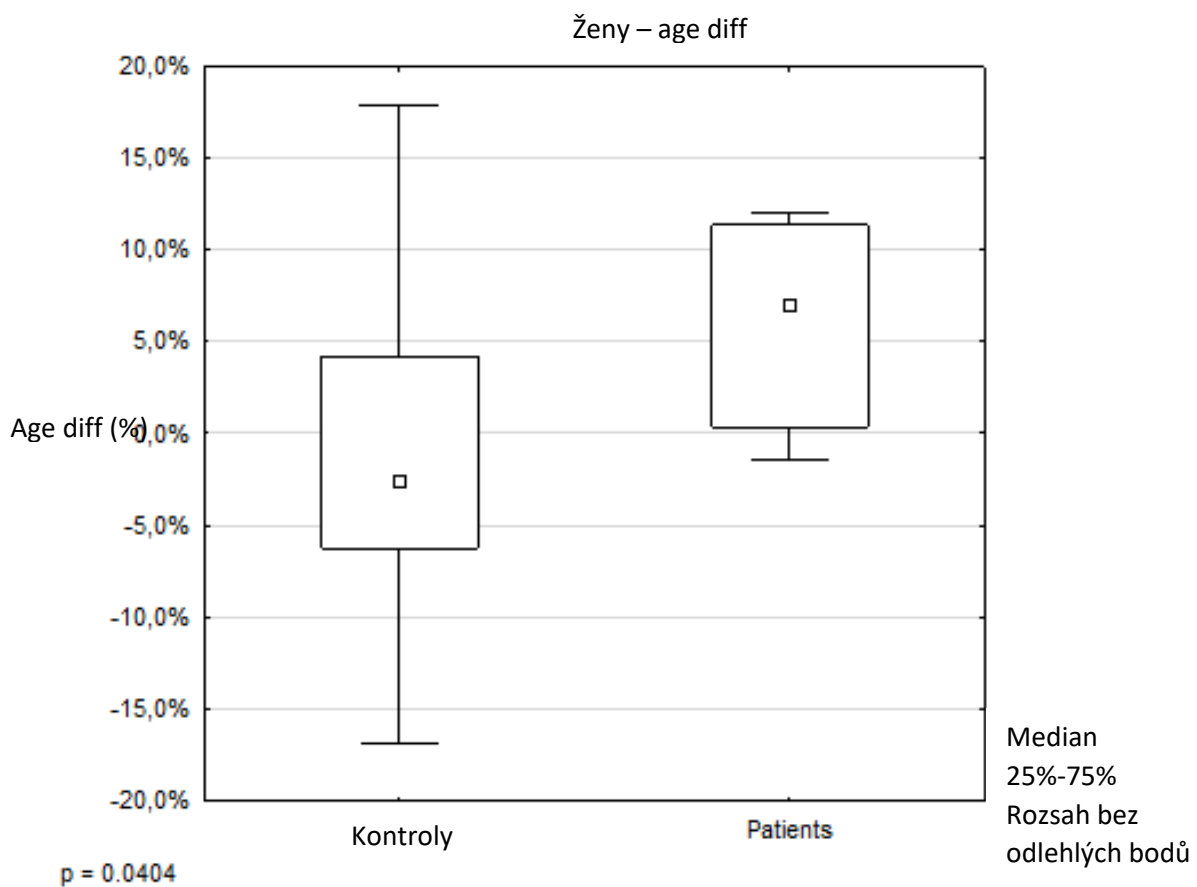
Legenda: Graf rozptylu zobrazuje kontroly jako bílá kolečka a pacienty jako černé čtverce.

Obr. 9. Kalendářní a epigenetický věk u pacientů a kontrol (pouze ženy)



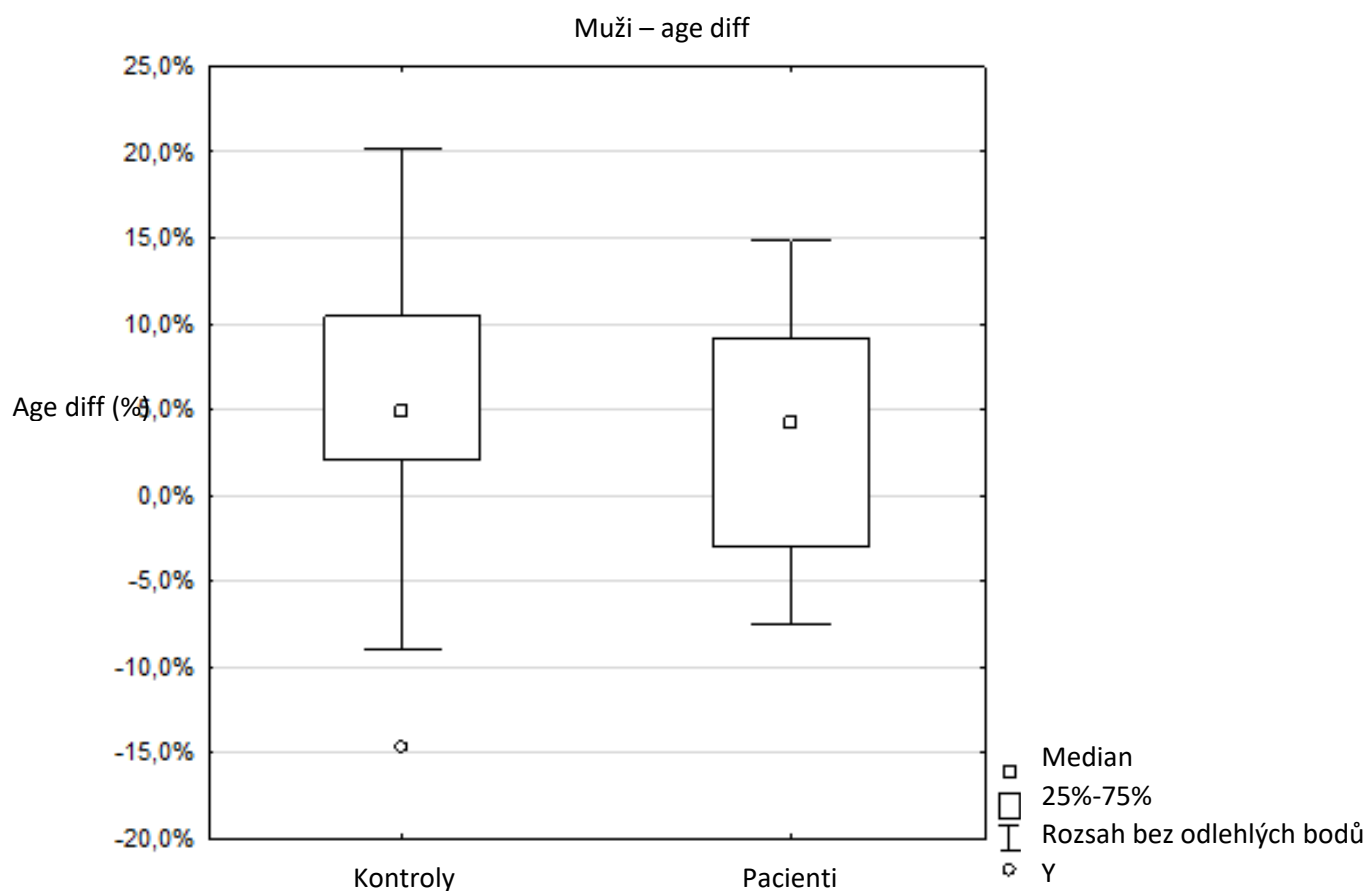
Legenda: Graf rozptylu zobrazuje vztah epigenetického a chronologického věku u žen s psoriázou (pacienti, černé čtverce) a u zdravých žen (kontroly, bílá kolečka).

Obr. 10. Age diff rozdíl mezi pacienty a kontrolami (pouze ženy)



Legenda: Ženy s psoriázou jsou epigeneticky starší než zdravé ženy ($p = 0,0404$). Odlehlý bod je jakákoli hodnota datového bodu $> 75.$ percentil $+ 1,5*(75.$ percentil $- 25.$ percentil) nebo jakýkoli datový bod $< 25.$ percentil $- 1,5*(75.$ percentil $- 25.$ percentil).

Obr. 11. Age diff rozdíl mezi pacienty a kontrolami (pouze muži)



Legenda: U mužů s psoriázou není statisticky významný rozdíl v rozdílu věku. Y je odlehlá hodnota. Odlehlý bod je jakákoli hodnota datového bodu $> 75. \text{ percentil} + 1,5 * (75. \text{ percentil} - 25. \text{ percentil})$ nebo jakýkoli datový bod $< 25. \text{ percentil} - 1,5 * (75. \text{ percentil} - 25. \text{ percentil})$.

2.3 Výsledky třetí studie

2.3.1 Úroveň globální methylace DNA

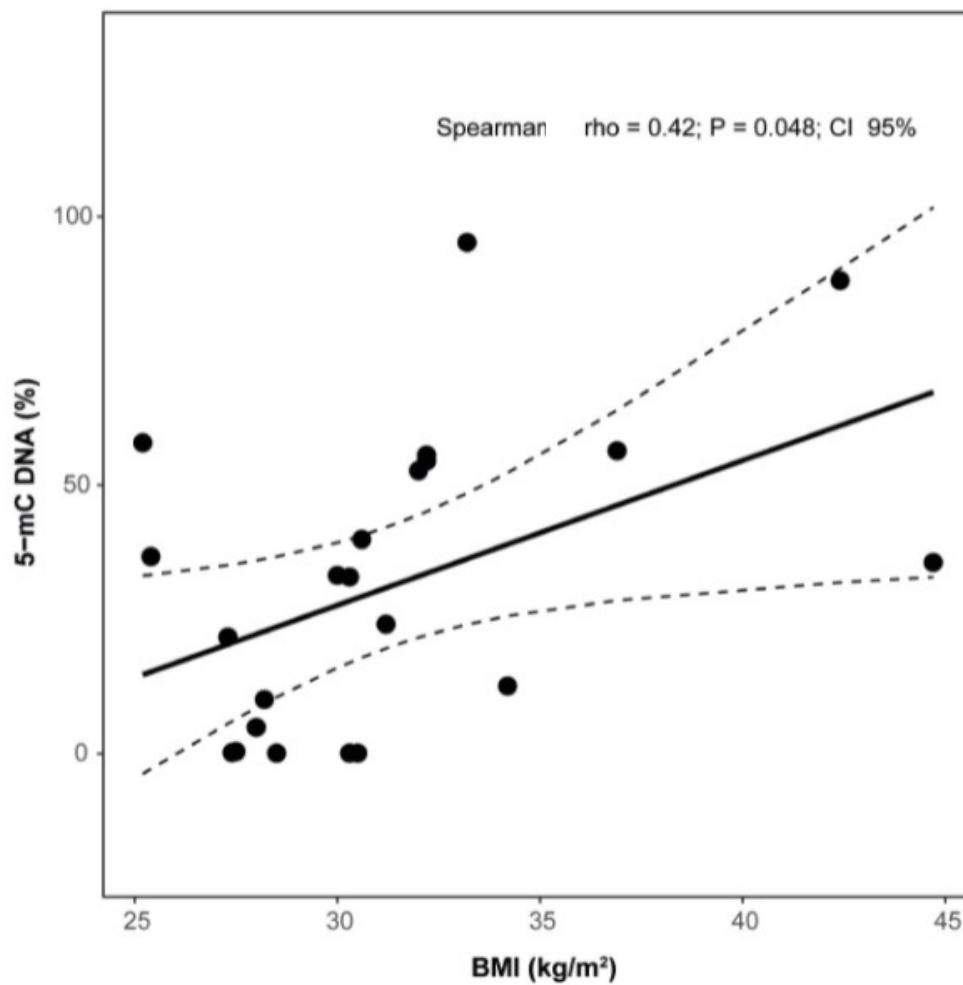
Úroveň globální methylace DNA (vyjádřená jako procenta 5-mC DNA) byla u pacientů vyšší než u kontrol, avšak rozdíl nedosáhl statistické významnosti (33,20 vs 23,35 %, $P = 0,234$). Vliv pohlaví, kouření, BMI a PASI na stav methylace byl nevýznamný. Byl nalezen významný vztah mezi úrovní globální methylace a BMI (Spearman $\rho = 0,417$, $p = 0,048$; Tab. 2, Obr. 12).

Tab. 2. Antropometrické charakteristiky souboru respondentů třetí studie, globální methylace, oxidační poškození a délky telomer (mediány a mezikvartilová rozpětí)

Proměnná (jednotky)	Nemocní	Kontroly	<i>p</i> hodnota
Věk (roky)			
Ženy	51 (41–68)	53 (40–58)	ns
Muži	60 (44–63)	53 (50–60)	ns
Celkem	53 (41–67)	53 (44–58)	ns
Váha (kg)			
Ženy	78 (68–88)	65 (62–71)	0,008
Muži	83 (79–100)	81 (71–99)	ns
Celkem	81 (72–94)	70 (64–83)	0,009
BMI (kg/m²)			
Ženy	28,9 (25,1–32,1)	24,2 (22,8–25,6)	<0,001
Muži	28,0 (24,7–30,3)	26,2 (23,7–29,3)	<0,001
Celkem	28,3 (24,8–30,6)	24,7 (23,2–27,7)	<0,001
Globální methylace (% 5-mC)			
Ženy	21,15 (9,65–49,80)	23,35 (2,90–40,10)	ns
Muži	39,90 (10,60–57,60)	20,55 (4,60–45,65)	ns
Celkem	33,20 (10,10–55,60)	23,35 (2,90–40,90)	ns
DNA/RNA oxidace (pg/mL)			
Ženy	4184 (2508–5802)	1985 (1559–2451)	<0,001
Muži	3559 (2568–4369)	2518 (1905–3091)	0,033
Celkem	3758 (2563–5269)	2286 (1559–2635)	<0,001
Délka telomer (kb)			
Ženy	3,65 (3,02–4,57)	3,04 (2,47–3,62)	0,020
Muži	3,33 (2,98–3,96)	2,95 (2,57–3,50)	ns
Celkem	3,57 (2,98–4,11)	3,04 (2,51–3,50)	0,011

Legenda: ns = statisticky nesignifikantní výsledek; % 5-mC = procento 5-methylecytosine v DNA; kb = tisíc nukleotidových bazí na chromosom

Obr. 12. Vztah mezi globální methylací a BMI



Legenda: Plná čára znázorňuje lineární regresní fit s 95% hranicí spolehlivosti vynesenu jako čárkované křivky.

2.3.2 Hladiny oxidačního poškození

Pacienti s psoriázou měli oproti kontrolám významně vyšší hladinu oxidačního poškození DNA/RNA (3758 vs 2286 pg/ml, $p < 0,001$) jak z pohledu celé skupiny, tak i po rozdělení na muže a ženy (Tab. 1).

U pacientů nekuřáků byly nalezeny významně vyšší hladiny oxidačního poškození DNA/RNA ($n = 25$) než u nekuřáků kontrol ($n = 27$; 4228 vs 2287 pg/ml, $p < 0,001$).

Hladiny oxidačního poškození DNA/RNA u pacientů s MetS nebyly významně odlišné od pacientů bez MetS (3559 vs 3774 pg/ml, $p = 0,928$). Pacienti bez MetS však měli významně vyšší hladiny oxidačního poškození DNA/RNA ($n = 18$) v porovnání s osobami kontrolní skupiny bez MetS ($n = 25$; 3774 vs 2287 pg/ml, $p = 0,001$).

2.3.3 Délka telomer

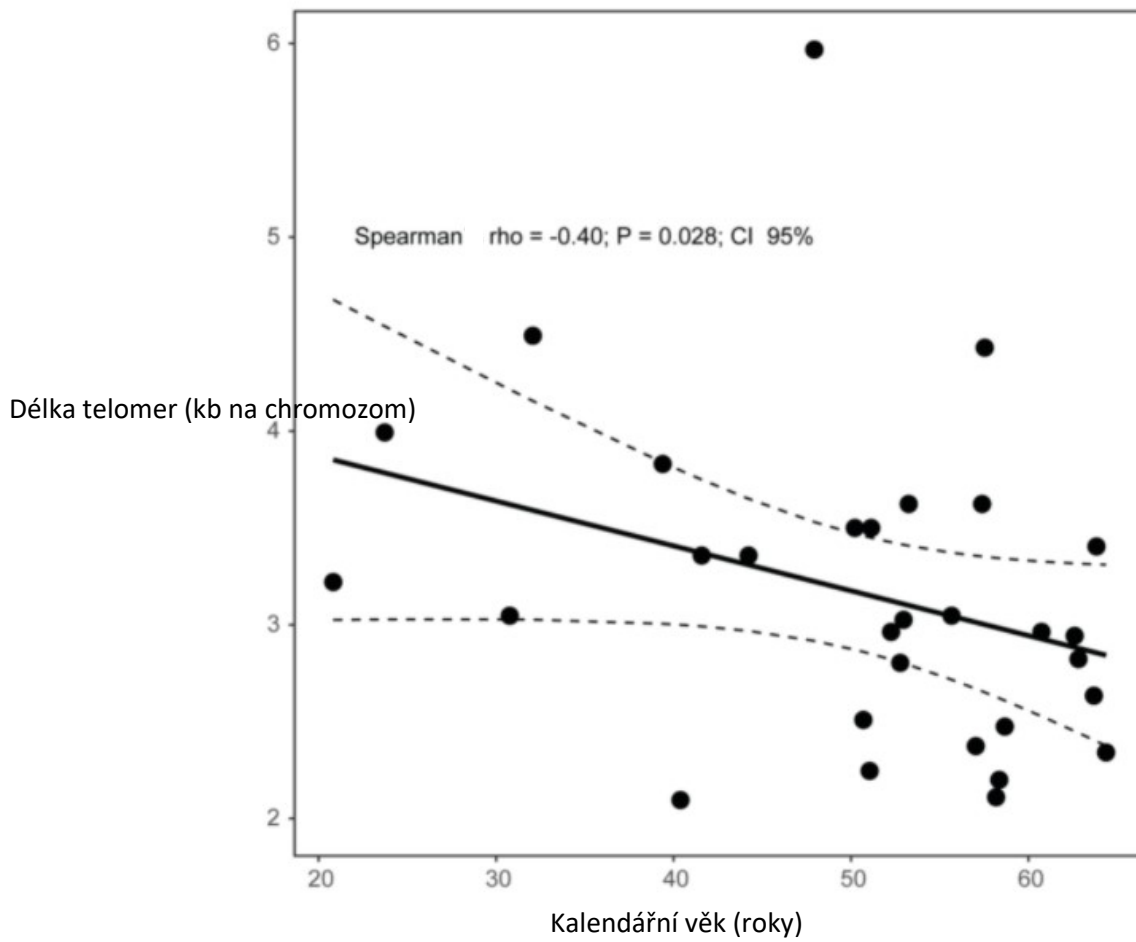
Ve skupině pacientů (jako celku) a v podskupině pacientů žen (ne však v podskupině pacientů mužů) byla nalezena významně vyšší průměrná délka telomer na chromozom v porovnání s kontrolami (3,57 vs 3,04 kb, $p = 0,011$; 3,65 vs 3,04 kb, $p = 0,020$).

U pacientů nekuřáků byly telomery významně delší než u pacientů kuřáků (3,88 vs 3,24 kb, $p = 0,048$) a než u kontrol nekuřáků (3,88 vs 3,03 kb, $p = 0,002$).

U pacientů bez MetS byly telomery významně delší (3,84 kb) než u pacientů s MetS (3,38 kb, $p = 0,024$) a kontrol bez MetS (3,03 kb, $p = 0,001$).

Byl nalezen významný negativní vztah mezi délkou telomer a kalendářním věkem kontrolních osob (Spearman $\rho = -0,420$, $p = 0,028$, obr. 13).

Obr. 13. Vztah kalendářního věku a délky telomer u kontrolních osob



Legenda: Plná čára znázorňuje lineární regresní fit s 95% hranicí spolehlivosti vynesenu jako čárkované křivky.

3 Diskuse

3.1 Alarminy

Alarminy se podílejí na řízení celé řady intracelulárních a/nebo extracelulárních funkcí, včetně regulace buněčné apoptózy, proliferace, diferenciací, migrace/invaze, energetického metabolismu, homeostázy Ca^{2+} , fosforylace proteinů a zánětu v různých typech buněk (174).

Naše výsledky ukázaly, že psoriáza je onemocnění, při kterém jsou ovlivněny hladiny všech zkoumaných alarminů. Nebylo však zjištěno, že by pro změnu těchto parametrů byl rozhodující rozsah onemocnění. Úloha alarminů zůstává nejasná a měla by být v budoucnu důkladně prozkoumána. Zatím není známo, zda jsou alarminy vedlejším produktem autoimunitních procesů, nebo zda se významně podílejí na kaskádě hlubší exacerbace psoriázy.

Prezentovaná studie zjistila vyšší hladiny HMGB1 u pacientů než u kontrol ($p < 0,05$). Ve shodě s našimi výsledky Bergman et al. již dříve prokázali, že HMGB1 je významně zvýšený v séru pacientů s psoriázou; rovněž naznačili, že přítomnost HMGB1 může mít vliv na složení chronického zánětu u psoriázy, což by mohlo mít vliv na Treg a Th17 buňky (56, 175). Na rozdíl od jejich studie jsme nezjistili žádný vztah mezi závažností onemocnění (PASI) a HMGB1. Vyšší sérové hladiny HMGB1 byly zjištěny také u několika dalších autoimunitních onemocnění, jako je neuromyelitis optica, lupusová nefritida nebo revmatoidní artritida (176-178). Tato zjištění naznačují, že HMGB1 může hrát roli v imunopatologii psoriázy i dalších autoimunitních onemocnění.

Potvrdili jsme, že pacienti s psoriasis vulgaris mají vyšší hladiny alarminu IL-33 než zdravé kontroly ($p < 0,01$). Toto zjištění je v souladu se studií Mitsui et al, kteří měřili hladiny IL-33 v séru u pacientů s psoriasis vulgaris, psoriatickou artritidou nebo pustulózní psoriázou a zjistili, že jsou vyšší než u kontrol. Zjistili také, že hladiny IL-33 korelují s hladinami TNF-alfa. V naší ani v jejich studii nebyla zjištěna žádná korelace mezi IL-33 a PASI skóre (179). Vyšší hladiny IL-33 u pacientů a žádná korelace s PASI byly zjištěny také ve studii Li et al. (180). Nedávná studie Sehat et al. však zjistila, že sérové hladiny IL-33 jsou stejné jako u kontrol, a zjistila korelaci mezi PASI a IL-33. (59). Tato rozporuplná zjištění naznačují, že je zapotřebí dalšího výzkumu zaměřeného na imunopatologii IL-33 u psoriázy. Vyšší sérové hladiny IL-33 byly zjištěny také u atopické dermatitidy, generalizovaného vitiliga nebo Stillovy choroby (61, 181, 182).

V naší studii jsme zjistili vyšší hladiny S100A7 (psoriasin) u pacientů než u zdravých kontrol, což je v souladu s výsledky studie Gambichlera et al. Nicméně jsme nezjistili žádný významný vztah S100A7 k PASI, stejně jako Gambichler et al. (183). Tým Andersona a spol. však zjistil u pacientů spíše nižší systémové hladiny psoriasinu. Důvodem byla přítomnost protilátek proti psoriasinu, přičemž psoriasin ani protilátky nebyly navrženy jako validní ukazatele psoriázy (62). Mechanismus jeho účinku v patogenezi psoriázy spočívá v tom, že připravuje keratinocyty a neutrofilů ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-6, IL-8). Zdá se také, že indukuje angiogenezi (184-186).

Další studie publikovaná v roce 2013 zjistila, že psoriasin souvisí s PASI pacientů a také s jejich obezitou (187). Význam psoriasinu zdůraznili Awad et al., kteří prokázali souvislost hladin psoriasinu s tloušťkou intimy-medie u pacientů a naznačili možnou souvislost mezi psoriázou a aterosklerózou (188). Kromě toho byly u pacientů se systémovou sklerózou zjištěny vyšší sérové hladiny psoriasinu (189).

Předchozí studie S100A7, S100A8, S100A9 a S100A12 ukázala, že všechny tyto alarminy byly u psoriatických pacientů významně vyšší než u kontrol. Bylo také naznačeno, že S100A12, nazývaný také kalgranulin-c, by mohl být nejslibnějším bioindikátorem psoriázy s nejužší vazbou na aktivitu onemocnění hodnocenou pomocí PASI (67). Naše data toto tvrzení hlouběji potvrzují, nicméně jsme nezjistili žádný významný vztah mezi kalgranulinem-c a závažností onemocnění, což podporuje myšlenku provedení dalšího výzkumu ohledně S100A12, než bude možné učinit závěr o kvalitě ukazatele psoriázy.

Ve skupině pacientů jsme zjistili významný vztah mezi HMGB1 a psoriasinem (Spearman rho = 0,276, p < 0,05). Tento vztah nebyl dosud u žádného onemocnění publikován a k objasnění jeho potenciální role v imunopatologii psoriázy bude třeba dalšího výzkumu. Pravděpodobným důvodem této korelace by mohlo být, že se tyto dva alarminy uvolňují současně během psoriatického autoimunitního procesu nebo že se uvolňují po specifické buněčné smrti. Možný vztah příčiny a následku by neměl být vyloučen jako hypotéza. Ve skupině zdravých kontrol jsme pozorovali významný vztah mezi HMGB1 a IL-33 (Spearman rho = 0,416, p < 0,05). Tuto korelaci lze přičíst předpokládanému vztahu mezi up-regulací IL-33 a uvolňováním HMGB1.

Mezi vybranými alarminy a PASI nebyla zjištěna žádná významná korelace. Skóre PASI je objektivním ukazatelem závažnosti onemocnění, u něhož byla zjištěna korelace s ukazatelem zánětu, jako je CRP nebo TNF- α (190). V našich předchozích studiích jsme však

korelaci těchto ukazatelů s PASI nezjistili (191, 192). To může být způsobeno tím, že ukazatele zánětu jsou ovlivněni mnoha proměnnými.

Výsledky studie měření alarminů u pacientů potvrzují přítomnost chronického zánětu změněné mezibuněčné komunikace u pacientů s psoriázou. Jejich komplexní hodnocení s ohledem na biologický věk není v tuto chvíli pro nedostatečné poznatky ve světové literatuře možné, jsou nicméně použitelnými ukazateli v rámci modelového onemocnění psoriázou. Jejich využití ale vyžaduje další zkoumání. Z našich výsledků vyplývá, že všechny alarminy hrají roli v patogenezi psoriázy či jejích komorbidit, nejvíce S100A7 (psoriasin), jehož hladina je u pacientů s psoriázou nejmarkantněji změněná oproti kontrolám. Vývoj jejich hladiny u osob zdravých vzhledem k věku (a nemocem souvisejícím se stárnutím) je slibným cílem pro budoucí studie.

3.2 CRP

CRP je jedním ze základních ukazatelů systémového zánětu a zvýšená hladina CRP indikuje akutní fázi zánětu u různých autoimunitních onemocnění (193). Stále více se ukazuje, že CRP je nejen zánětlivým ukazatelem, ale také důležitým rizikovým faktorem spojeným s nemocemi souvisejícími se stárnutím, včetně kardiovaskulárních onemocnění, hypertenze, diabetu mellitu a onemocnění ledvin. Nedávné studie prokázaly, že CRP je patologicky zvýšené u řady onemocnění včetně hypertenzních, kardiovaskulárních a ledvinových komplikací, diabetické nefropatie a akutních a chronických onemocnění ledvin. Bylo potvrzeno, že i mírně zvýšené CRP může u zdravých osob znamenat zvýšenou míru budoucího kardiovaskulárního rizika (194-196).

V naší studii jsme zjistili významně vyšší sérové hladiny CRP u psoriatických pacientů než u kontrol ($p < 0,001$), což svědčí jak o přítomnosti systémového zánětu, tak o zvýšeném kardiovaskulárním riziku a naznačuje přítomnost endoteliální dysfunkce. Věk může významně změnit stupeň systémového zánětu (191). V souladu s touto skutečností jsme ve skupině pacientů zjistili významný vztah mezi hladinou CRP a věkem (Spearman $\rho = 0,590$, $p < 0,001$). Vzhledem k tomuto zjištění lze hladinu CRP považovat za vhodný ukazatel časných stadií kardiovaskulárních komorbidit u psoriatických pacientů v závislosti na věku. Při jeho užití je samozřejmě třeba chápat jeho proměnlivost vzhledem k přítomnosti akutního zánětlivého onemocnění.

U osob s psoriázou popsaly některé studie významné vztahy mezi CRP a PASI a mezi CRP a BMI (197, 198). Jiné studie však tato zjištění nepotvrdily (199, 200). Výsledky naší studie rovněž nepotvrdily významnost výše uvedených vztahů (CRP s PASI, Spearman rho = -0,291, p = 0,132) a CRP s BMI (Spearman rho = 0,288, p = 0,137).

Souhrnně lze říci, že dostupné údaje naznačují, že CRP se významně podílí na patofyziologii psoriázy a zdá se být vhodný pro detekci časných stadií kardiovaskulárních onemocnění u osob s psoriázou. Zároveň je vhodné další zkoumání vztahu věku a CRP (a psoriázy)

3.3 Endocan, VEGF, IL-17 a *epigenetic clock*

Metoda *epigenetic clock* byla použita k porovnání biologického věku v různých studiích. Tyto studie porovnávaly vliv rasy, pohlaví, cvičení, faktorů životního stylu a nemocí (92, 142, 201). U zdravých lidí epigenetický věk striktně koreloval s chronologickým věkem, u patologických stavů se však značně lišil. Nejvýraznějším příkladem je Downův syndrom, u kterého bylo prokázáno, že urychluje epigenetické stárnutí plné krve pacientů. Studie prokázala, že trizomie 21 významně zvyšuje stáří plné krve a mozkové tkáně (v průměru o 6,6 roku, p = $7,0 \times 10^{-14}$). K prohlubování absolutních rozdílů mezi epigenetickým a kalendářním věkem navíc dochází v čase – rozdíl se zvyšuje s věkem jedince (89). V naší studii jsme nemohli dospět k závěru, že by v plné krvi našich pacientů existoval patofyziologický stav způsobující zrychlené stárnutí. Rozdíl mezi epigenetickým a kalendářním věkem se v průběhu života, v rámci jejich expozice onemocnění, nezvyšoval (obr. 8).

Zjistili jsme nicméně, že ženy s psoriázou jsou epigeneticky starší než ženy zdravé (obr. 9). To neplatí pro muže, ačkoli právě muži mají obvykle vyšší míru epigenetického stárnutí než ženy (201). V naší studii jsme nemohli konstatovat, že by u žen s psoriázou docházelo ke zrychlenému stárnutí, protože rozdíl mezi epigenetickým biologickým věkem (EpiA) a kalendářním chronologickým věkem (ChronA) nepostupoval s rostoucím ChronA. Správný popis je, že ženy s psoriázou byly epigeneticky starší v průměru o 2,5 roku (6,5 %) než zdravé ženy. Toto zjištění by mohlo vysvětlit, proč je délka života žen s psoriázou kratší. Nedávná metaanalýza ukázala, že každé zvýšení epigenetického věku o 5 let je spojeno s 8 až 15 % zvýšeným rizikem úmrtí (202). Tento výsledek tedy podporuje tezi, že ženy s psoriázou mohou mít sníženou naději dožití, dřívější rozvoj chorob spojených se stárnutím (např. KVO).

Pokud jsou naše závěry správné, proč se tento jev vyskytuje pouze u žen, nikoli u mužů? Zdá se, že musí existovat pohlavně specifické metabolické dráhy, které jsou psoriázou změněny, protože pouze ženy s psoriázou byly epigeneticky starší než zdravé kontroly. Zdá se, že existuje pohlavní specifická imunitní systém (204), hormony, životní styl (205), mikrobiom (206) a celou řadu dalších. Možná vysvětlení rozdílů ve fungování epigenetických mechanismů u mužů a žen převyšují svou komplexitou rozsah této disertační práce a mohla by být samostatným vědeckým bádáním řady vědeckých týmů. Pro úplnost zmíním nejdůležitější skutečnosti.

Yamagata a kol. ve své studii prokázali, že exprese DNA methyltransferáz 3a a 3b (DNMT3a a DNMT3b) v endometriálních stromálních buňkách je snížena působením medroxyprogesteron acetátu a estrogeneru (207). Bylo také zjištěno, že stav methylace DNA může být změněn různými faktory, včetně steroidů a vitaminů. Na druhé straně methylace DNA ovlivňuje estrogenové receptory v ženských reprodukčních orgánech (208, 209). Tyto nálezy naznačují úzký vztah mezi methylací DNA a ženskými pohlavními steroidními hormony. Další studie musí objasnit molekulární mechanismy a potenciální korelace steroidních hormonů a methylačních profilů v krvi. Zdá se, že toto je pravděpodobná cesta pro budoucí studie.

Rozdíly v imunitních funkcích a reakcích přispívají k rozdílům ve zdraví a délce života mezi pohlavími. Ženy mají silnější imunitní reakce na infekce a očkování než muži (204, 210). Silnější imunitní reakce má paradoxně svou cenu, kterou je vyšší výskyt autoimunitních onemocnění u žen (210). Tento vztah nebyl dosud jasně vysvětlen. Pohlavní hormony přispívají k vývoji a aktivitě imunitního systému a vysvětlují rozdíly v imunitních reakcích souvisejících s pohlavím. Jak vrozený imunitní systém, tak adaptivní imunitní systém nesou receptory pro pohlavní hormony a reagují na hormonální signály (204, 210).

Psoriáza, autoimunitní onemocnění, je ovlivněna pohlavní specifícností. Studie zaměřené na výskyt lupénky podle pohlaví však k podobným závěrům nedospěly. Vyšší prevalence byla popsána u žen v USA a Norsku, nižší prevalence byla zjištěna v Dánsku a Austrálii (211, 212). V České republice je výskyt u obou pohlaví přibližně stejný (6). Lupénku může zhoršovat mnoho faktorů, včetně výkyvů hormonů a stresu. V nedávných studiích ženy dokonce uváděly vyšší míru stigmatizace (silný prediktor kvality života) v důsledku přítomnosti onemocnění (213). Studie z roku 2016 uvádí, že riziko lupénky je vyšší u žen s nepravidelným menstruačním cyklem v dospělosti (214).

V naší studii jsme zjistili, že u zdravých mužů ani žen neexistuje korelace mezi Age diff a endocanem nebo VEGF. Rovněž u psoriatických mužů nebyla zjištěna žádná korelace mezi těmito parametry. Významné vztahy jsme však našli u žen s psoriázou. Přestože počet subjektů v naší studii je relativně nízký, tato skutečnost dále podporuje platnost výsledků naší analýzy EpiA podle pohlaví a skutečnost, že psoriáza v kombinaci s ženským pohlavím může být příčinou hlubokých metabolických změn.

Endocan a VEGF hrají roli v patogenezi endoteliální dysfunkce a aterosklerózy (68, 70). Naše výsledky by mohly podpořit hypotézu, že existuje souvislost mezi psoriázou a epigenetickým věkem, aterosklerózou, kardiovaskulárními komorbiditami a kratší délkou života u žen s psoriázou. Studie Garshicka et al. jasně uvádí, že psoriáza je u pacientek spojena s kardiovaskulárními onemocněními silněji než u pacientů mužského pohlaví (215). Závěry této studie založené na skupině mladých hospitalizovaných pacientů (věk ≥ 20 a < 35 let) jsou ve shodě s našimi výsledky, tj. že epigenetický věk je trvale vyšší než chronologický věk po celý život pacientek, a to i od raného věku. Tato zjištění by tedy mohla alespoň částečně vysvětlit příčiny kratšího života psoriatických žen. Použití léčby zaměřené na základní příčiny stárnutí (omlazovací terapie nebo geroprotektory) by proto mohlo vést k lepším vyhlídkám psoriatických pacientů.

V naší studii jsme zjistili nižší hladiny endocanu u psoriatických (p < 0,001). Rozdíl byl statisticky významný u mužů; nižší hladiny byly pozorovány také u žen, ale rozdíl nebyl významný (p = 0,08). Literatura je v názoru na endocan u psoriázy nejednotná. Některé studie prokázaly vyšší hladiny endocanu u pacientů (216, 217), zatímco u jiných byly naměřeny nižší hladiny u pacientů než u zdravých kontrol (218). K bližšímu objasnění těchto zjištění je zapotřebí dalšího výzkumu.

IL-17 byl významně zvýšen u mužů i žen s psoriázou ve srovnání s kontrolní skupinou, což je v souladu s dostupnou literaturou, nicméně jsme neobjevili žádnou korelaci mezi Age diff a IL-17 (219). Ačkoli je zapotřebí dalšího výzkumu, naše předběžné údaje naznačují, že IL-17 a s ním související imunitní dráhy by neměly způsobovat vyšší hladinu EpiA u žen s psoriázou.

Naše studie zjistila významnou negativní korelaci mezi endocanem a BMI u psoriatických žen (r = -0,661; p = 0,0376), což odpovídá literárním údajům (93, 94). U žen významně koreloval endocan s VEGF (r = 0,681; p = 0,0302). Podobná korelace mezi nimi byla dříve zjištěna např. ve sklivcové tekutině pacientů s diabetickou retinopatií (220); u

pacientů s psoriázou to však nikdy nebylo pozorováno. Dále byl zjištěn negativní vztah mezi VEGF a PASI skóre u pacientek ($r = -0,661$; $p = 0,0269$; tab. 4), což znamená, že akutní závažnost onemocnění může způsobit pokles VEGF. To je v rozporu se zjištěními Zablotta et al, kteří zjistili pozitivní korelaci mezi sérovým VEGF a PASI skóre u pacientů obou pohlaví (221). Možným vysvětlením je rozdílný podíl pohlaví ve studiích (50 % v jejich studii vs. 39 % v naší) nebo nižší průměrné skóre PASI v jejich studii (14,5 vs. 19,2). Toto zjištění se však zdá zvláštní vzhledem k odborné literatuře, která většinou popisuje pozitivní vztah mezi skóre PASI a VEGF v důsledku nadměrné exprese VEGF v psoriatických lézích (222, 223).

Bylo zjištěno, že skóre PASI negativně koreluje s Age diff u žen ($r = -0,627$; $p = 0,0388$). Předpokládá se, že akutní závažnost psoriázy (objektivizovaná pomocí PASI) neodráží změny epigenomu. Vyslovujeme hypotézu, že akutní příznaky psoriázy mohou být dokonce opravnou reakcí organismu. Je možné, že tělo pacientů se akutními vzplanutími nemoci dlouhodobě chrání před negativními epigenetickými změnami. Studie Jaina a kol. naznačuje, že bílé krvinky rychle mění svůj epigenom, aby lépe vyhovoval hrozbě, které čelí (224). Jakkoli je to možné, je toto vysvětlení za současného stavu znalostí čistě spekulativní. Výsledek je bezprecedentní a k jeho objasnění bude třeba dalších studií.

Je třeba konstatovat, že pacienti měli celkově vyšší BMI. Vědecká literatura popisuje, že pacienti s psoriázou trpí častěji metabolickým syndromem a nadváhou (225-227). Nelze určit, zda vyšší BMI přispěl k vyššímu epigenetickému věku žen s psoriázou, nicméně se to zdá nepravděpodobné vzhledem k negativnímu nesignifikantnímu vztahu mezi Age diff a BMI v podskupině.

Souhrnně lze říct, že naše zjištění předběžně naznačují, že ženy s psoriázou jsou náchylné ke změnám v epigenomu, které souvisejí s vyšším biologickým věkem. V současné době nelze určit, zda je příčinou genetické pozadí nebo specifická stimulace imunitního systému hned po začátku onemocnění či jiné faktory. Kratší život mužů s psoriázou nelze vysvětlit vyšším epigenetickým věkem. Otázku, zda jejich kratší život vůbec souvisí s urychleným stárnutím, nebo zda jsou ovlivněny jiné znaky stárnutí, je třeba zodpovědět v budoucnu.

3.4 Globální methylace

Ve studii jsme stanovili globální methylici DNA pomocí monoklonální protilátky anti-5-metylcytosin a kolorimetrické detekce. Úroveň methylace u pacientů s MetS pozitivně korelovala s BMI, nicméně nebyly zjištěny žádné rozdíly v methylaci mezi pacienty a kontrolní skupinou. Nebyly zjištěny ani žádné souvislosti mezi stavem methylace a pohlavím, kouřením, BMI, PASI nebo přítomností MetS.

Dříve stanovená hladina methylace DNA ve vzorcích kůže, ale nikoli v buňkách periferní krve jako v naší studii, pozitivně korelovala s PASI skóre (228). Naše výsledky nepotvrzují význam stanovení globálního stavu methylace DNA ve vzorcích plné krve u pacientů s psoriázou. Ačkoli medián 5-mC DNA, stanovený u pacientů (33,20 %), byl zřejmě vyšší než u kontrol (23,35 %), statistická významnost rozdílu byla znemožněna velkým kolísáním hodnot 5-mC DNA v obou skupinách (10-55,60 % u pacientů vs 2,90-40,90 % u kontrol, viz tab. 2) a relativně nízkým počtem případů uvedených ve studii.

Přidání metylové skupiny k cytosinovým bázím v poloze 5 cytosinového kruhu ovlivňuje geny spojené s imunitní odpovědí, regulací buněčného cyklu a apoptózou a může hrát důležitou roli v patogenezi psoriázy (228). Změny v methylaci DNA byly zjištěny jak v kůži, tak v mononukleárních buňkách periferní krve. V kožních buňkách bylo objeveno více než tisíc odlišně methylovaných CpG ostrůvků, včetně hypermethylace promotorů genů p14 a p16 (229, 230).

V mononukleárních buňkách psoriatické kostní dřeně byla pozorována demethylace promotorů genů p15, p16 a p21 snižujících proliferaci krvetvorných buněk (231). Na druhé straně byl nalezen hypermethylovaný gen FOXP3, jehož kódovaný protein je hlavním regulátorem vývoje regulačních Treg buněk (232). Jiná studie, která zkoumala rozdíly v methylaci plné krve u psoriázy, identifikovala tři oblasti na chromozomu 8 a lokusy na chromozomu 6 MICA, IRIF1, PSORS1C3 a TNFSF4 jako hypermethylované u otcovsky přenášeného onemocnění, zatímco PSORS1C1 byl hypomethylovaný (233).

Dále byla v literatuře popsána významně zvýšená globální methylace DNA v psoriatických mononukleárních buňkách. CD4⁺ a CD8⁺ T buňky izolované z plné krve nevykazovaly žádné významné rozdíly v methylaci nebo genové expresi mezi postiženými a nepostiženými sourozenci, přestože byly zaznamenány jak hypermethylované, tak hypomethylované stavy u psoriatiků ve srovnání se zdravými kontrolami (228, 234, 235).

Tisíce hypo- a hypermethylovaných jednotlivých míst v genech patofyziologicky spojených s psoriázou mohou být odhaleny, neboť hrají roli v podpoře nebo snížení exprese genů ovlivňujících patogenezí psoriázy. Nedá se však říci, že by docházelo primárně k hypo- nebo hypermethylaci celého genomu. Další studie s bližším pohledem na proces methylace v různých místech kůže, jednotlivých buněčných liniích a konkrétních genech nebo přímo CpG ostrůvcích jejich promotorových oblastí jsou smysluplnějším přístupem při hledání laboratorních ukazatelů stárnutí nebo procesů probíhajících u psoriázy či obojího. Oproti výše zmíněné metodě *epigenetic clock* je měření globální methylace sice významně levnější, ale zdaleka nedosahuje tak kvalitních výsledků a není schopno s dostatečnou komplexitou obsáhnout změny methylačního profilu u pacientů s psoriázou.

3.5 Oxidační poškození

Oxidační stres může být způsoben jak přítomností reaktivních forem kyslíku, tak sníženým počtem antioxidantů v organismu (236). Dřívější studie ukázaly, že oxidační změny v nukleových kyselinách psoriatických pacientů pozitivně korelovaly s hodnotami PASI skóre (237). V naší práci jsme zjistili vyšší obsah oxidovaných DNA/RNA v séru u psoriatických žen i mužů ve srovnání s kontrolami. Oxidační stres přítomný u osob s exacerbovanou psoriázou vulgaris obou pohlaví tak může přispívat k urychlenému stárnutí buněk. Dále jsme zjistili významně zvýšený obsah oxidačního poškození DNA/RNA ve skupině pacientů bez MetS ve srovnání s kontrolami bez MetS. Údaje o oxidačním poškození DNA/RNA pacientů s MetS se nelišily od pacientů bez MetS. Naše výsledky naznačují, že oxidační změny, objevující se v nukleových kyselinách v důsledku chronického systémového zánětu, jsou běžnou součástí patofyziologie psoriázy bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost MetS.

Tato zjištění jsou v souladu s některými dalšími studiemi, které odhalily zvýšené hladiny oxidačního poškození v plazmě i séru psoriatických pacientů (100, 238, 239). Borska et al. již dříve popsali, zvýšené množství DNA/RNA oxidačního poškození a zvýšené CRP u pacientů. V této práci se navíc podařilo odhalit další zvýšení hladin u pacientů, kde se kombinovala psoriáza s metabolickým syndromem. Psoriáza podle této studie přispívá ke zvýšení hladin obou účinků výrazněji než MetS. Snížila také vztah mezi CRP a oxidačním poškozením nukleových kyselin existující u kontrol (26).

Pacienti s autoimunitními onemocněními se vyznačují aberantní imunitní odpovědí na vlastní antigeny s rozsáhlou tvorbou autoprotilátek a mnohočetným poškozením tkání a také zvýšeným oxidačním stresem. Nedávné údaje ukazují akumulaci endogenního poškození DNA v mononukleárních buňkách periferní krve těchto pacientů, což souvisí s i) zvýšenou tvorbou poškození DNA, přinejmenším částečně v důsledku indukce oxidačního stresu, a s ii) epigeneticky regulovanými funkčními abnormalitami základních mechanismů opravy DNA. Protože endogenní akumulace poškození DNA má závažné důsledky pro buněčné zdraví, včetně genomové nestability a posílení aberantní imunitní odpovědi, lze tyto výsledky využít pro pochopení patogeneze a progrese systémových autoimunitních onemocnění, jakož i pro vývoj nových léčebných postupů (240).

Míra oxidačního poškození DNA/RNA se zdá být potenciálně vhodným markerem pro sledování rizika zrychleného stárnutí, resp. zvýšené prevalence komorbidit v mladším (kalendářním) věku pacientů, neboť byla zvýšená hladina prokázána již několika studii s korespondujícími výsledky. Navíc je vzhledem k výše popsaným teoriím stárnutí (a příčinám stárnutí) více než zřejmá souvislost mezi oxidačním poškozením DNA a její nestabilitou vedoucí ke zrychlenému stárnutí a tím k nižší naději dožití a vyššímu riziku chorob se stárnutím spojeným.

3.6 Délka telomer

Telomery jsou opakující se nukleotidové elementy na koncích chromozomů, které je chrání před degradací a ztrátou genetické informace. Normální diploidní buňky ztrácejí telomery v každém buněčném cyklu a jejich skutečná délka může předpovídat délku života buňky. Délka telomer v krevní DNA se shoduje s délkou telomer v jiných tkáních a indukované zkracování telomer je spojeno s mnoha zdravotními problémy včetně stárnutí, poruch souvisejících se stárnutím a rakoviny (241, 242). V naší studii jsme předpokládali, že délka telomer v psoriatických krevních buňkách bude nepřímo úměrně souviset s úrovní oxidovaných molekul DNA/RNA, tedy že čím více bude oxidačního poškození, tím kratší nalezneme telomery. Předběžně publikované studie poskytly na toto téma poněkud kontroverzní údaje (243). V jedné z popsaných vědeckých studií T-buňky psoriatických pacientů vykazovaly kratší délku telomer. Naproti tomu Svenson a spol. prokázali, že intenzivní oxidační stres prodlužuje telomery u granulocytů a naivních T buněk (172, 244, 245). Delší telomery byly zaznamenány také u leukocytů osob s revmatoidní artritidou, psoriatickou artritidou, ankylozující

spondylitidou, systémovou sklerodermií a Parkinsonovou chorobou. Rozdíly ve výše uvedených pracích byly částečně vysvětleny rozdílným přístrojovým vybavením použitým pro analýzu délky telomer a zaměřením se na rozdílné typy buněk (246).

Naše výsledky ukázaly, že u pacientů s psoriázou jsou telomery na chromozom významně delší než u věkově odpovídajících kontrol. Podobně, jako v jiných studiích, délka telomer u zdravých kontrol negativně korelovala s jejich věkem (246). Tato skutečnost odpovídá obecné teorii stárnutí (53). U psoriatiků jsme však podobný vztah nepozorovali, neboť psoriáza délku telomer ovlivnila. Údaje odhalily rozdíly mezi pohlavími; délky telomer u psoriatických žen, ale nikoli u mužů, byly významně vyšší než u zdravých žen. Pro srovnání, Tamayo et al. dříve nezjistili žádné rozdíly v délce telomer mezi pohlavími ani u chronických systémových zánětlivých onemocnění, ani u kontrol (246).

V důsledku oxidačního stresu by kouření mělo způsobovat rychlejší úbytek telomer než u nekuřáků. Výsledky mnoha prací však ukázaly protichůdné účinky kouření na telomery. Některé z nich uváděly úbytek telomer u kuřáků, jiné studie nezjistily žádnou souvislost mezi kouřením a délkou telomer, zatímco jiné objevily krátké telomery v leukocytech kuřáků, ale rychlost úbytku telomer byla dlouhodobě pomalejší (247). Abychom minimalizovali vliv kouření cigaret na proces úbytku telomer, hodnotili jsme dále délku telomer pouze u nekuřáků. V této podskupině jsme zjistili významně delší telomery u pacientů bez MetS ve srovnání s příslušnými kontrolami; přestože dříve nebyla publikována žádná souvislost délky telomer s rozvojem MetS nebo kardiovaskulárních onemocnění u psoriázy (132).

Na základě našich údajů se zdá, že délka telomer v krevních buňkách neodpovídá vysokému oxidačnímu poškození molekul DNA/RNA přítomných u pacientů s psoriázou. Pacienti s psoriázou měli vyšší poškození DNA/RNA a také delší telomery než kontrolní skupina. Příčina našich zjištění není zcela jasná a v úvahu by mohla přicházet řada exogenních i endogenních faktorů pomalejšího úbytku telomer, včetně cytokinů uvolňovaných z aktivovaných imunocytů, zvýšené monocytopenické aktivity psoriatické kostní dřene, hyperplazie fagocytů a dalších (231). Tamayo et al. navrhli několik možných vysvětlení těchto nálezů: i) stimulaci telomerázové aktivity v psoriatických leukocytech nebo primitivních hematopoetických progenitorech, ii) dysfunkci komplexu shelterin/telosom nezbytného pro proces cappingu, iii) jiný buněčný nebo systémový imunologický mechanismus zajišťující správnou funkci telomer nebo iv) epigenetický efekt methylace subtelomerních repetitivních DNA (246). Zmínit by se na tomto místě dala i již dříve nastíněná hypotéza, že akutní příznaky

psoriázy mohou být dokonce opravou reakcí organismu a, že tělo pacientů se akutními vzplanutími nemoci dlouhodobě možná chrání před negativními epigenetickými změnami a v tomto případě i před změnami délky telomer. Pacienti, kteří byli součástí našich studií jsou totiž vždy v akutním stádiu onemocnění.

Katalytická aktivita telomerázy přidává další kopie sekvence TAG, aby kompenzovala ztrátu telomer v důsledku buněčného dělení. Za normálních okolností je tato aktivita reverzní transkriptázy omezena především na typy buněk s vysokou proliferací, tj. zárodečné buňky a hemopoetické progenitory. V krevních buňkách byla telomerázová aktivita zjištěna v T-buňkách, ale ne v neutrofilech (126, 164, 247). U revmatoidní artritidy vykazovaly T-buňky sníženou schopnost regulace telomerázové aktivity, přestože jiní autoři prokázali, že lymfocyty pacientů vykazují zvýšenou telomerázovou aktivitu (13, 127). Již dříve bylo zjištěno, že psoriáza indukuje aktivitu telomerázy v T-buňkách a mononukleárních buňkách periferní krve, která pozitivně koreluje se závažností onemocnění (13, 172). Tímto způsobem by krevní buňky mohly zpomalit zkracování telomer, prodloužit svou replikační kapacitu v krevním oběhu a podpořit imunitní odpověď pacientů s psoriázou.

Délka telomer je tedy zatím nedostatečně prozkoumaným ukazatelem stárnutí u psoriatiků. Její souvislost s věkem, rozvojem komorbidit a rizikem úmrtí je vzhledem k našim výsledkům a nejednoznačností ve vědecké literatuře stále nejasná. Pro další zkoumání bude zdá se vhodné přistoupit ke složitějším metodám umožňujícím měření nejen průměrné (mediánové) délky telomer jako tomu bylo v našem případě, ale také měření podílu nejkratších telomer ve vzorku, tzv. nejkratší telomery. Podle posledních studií se zdá, že právě proměnlivost množství nejkratších telomer by mohla mít největší dopad na přítomnost procesu *inflammaging* a dalších se stárnutím spojených stavů (248, 249).

3.7 Prevence psoriatiků

Na vzniku a zhoršení psoriázy se podílí řada faktorů. Mezi genetické rizikové faktory patří HLA-Cw6 a mutace v genu CARD14, členu rodiny 14 kaspázové náborové domény. U geneticky predisponovaných jedinců mohou onemocnění vyvolat různé spouštěcí faktory. Podílí se na nich rizikové faktory prostředí, včetně infekčních onemocnění, léků a životního stylu (250, 251). Obdobný náhled na propuknutí komorbidit u pacientů s psoriázou lze popsat právě díky genetickým predispozicím a následnému působení spouštěcích faktorů, které jsou

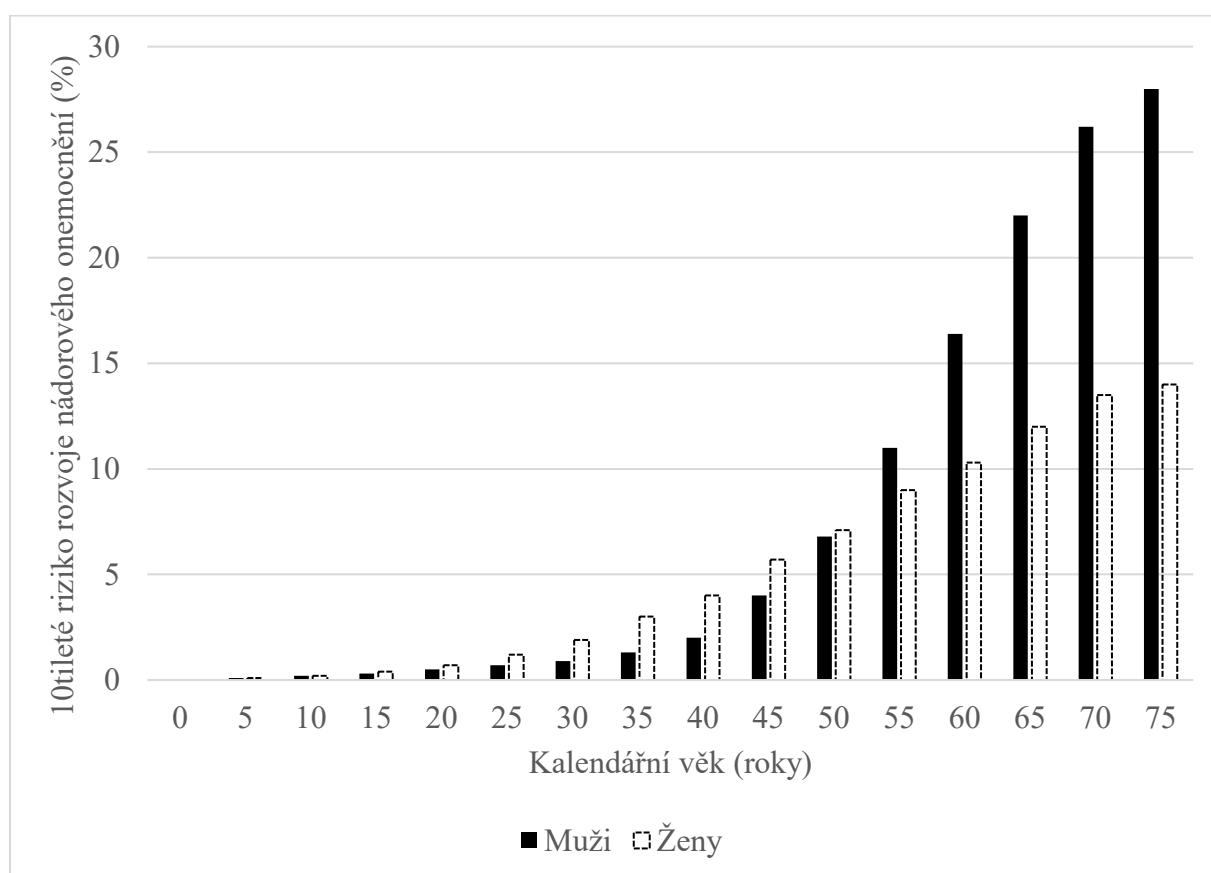
asociované s psoriázou i s okolními vlivy (250, 252, 253). V mojí disertační práci jsem se zabýval zejména pohledem na stárnutí jakožto významným spouštěcím a rizikovým faktorem rozvoje onemocnění.

Stárnutí je nejdůležitějším rizikovým faktorem ovlivňujícím kardiovaskulární homeostázu (254). Pokroky v léčbě kardiovaskulárních onemocnění (KVO), a zejména akutního infarktu myokardu, prodloužily střední délku života, přičemž se odhaduje, že počet osob ve věku nad 75 let se zvýšil čtyřikrát. V souladu s tím bude v roce 2030 přibližně pětina světové populace ve věku 65 let a více, přičemž prevalence KVO exponenciálně poroste vzhledem k tomu, že dalších 27 milionů lidí bude mít hypertenzi, 8 milionů ischemickou chorobu srdeční, 4 miliony cévní mozkovou příhodu a 3 miliony srdeční selhání (255). Kromě toho se u starší populace výrazně zvyšuje výskyt metabolických poruch, konkrétně metabolického syndromu a diabetu, což dále přispívá ke KV morbiditě a mortalitě. Tato čísla mohou vysvětlovat, proč je přibližně 40 % úmrtí u osob ve věku > 65 let způsobeno aterosklerotickým onemocněním a jeho komplikacemi (255, 256).

Stejně tak u metabolických onemocnění je riziko jejich vzniku, rozvoje a komplikovaného průběhu závislé na věku, tedy na procesu stárnutí. Příkladem může být diabetes mellitus II. typu, jež je typickou chorobou pozdějšího věku. S ní přichází zvýšené riziko (fatálních) pádu a dalších přidružených onemocnění (257, 258).

Neopomenutelným faktorem rizika úmrtí nebo vážného onemocnění je i diagnóza rakoviny. Riziko nádorového onemocnění přitom významně stoupá s věkem, jak ukazuje graf na obrázku 14, který vychází z dat popsanych ve studii Goossens et al. (259).

Obr. 14. Desetileté riziko rozvoje nádorového onemocnění (%)



Naše výsledky naznačují, že u pacientů s psoriázou dochází ke změnám parametrů souvisejících se stárnutím. Zvýšené alarminy mohou být podkladem pro pozitivní zpětnou vazbu zánětlivé reakce a posilování procesu *inflammaging*. Chronická přítomnost zánětu zvyšuje rychlost stárnutí a riziko vzniku nebo rozvoje vážného onemocnění (260). Změněné hladiny IL-17 a endocanu přispívají ke změněné mezibuněčné komunikaci. Ovlivnění biologického věku, respektive epigenetického věku, u psoriatiků se objevilo pouze u žen. Globální methylace byla v naší studii nesignifikantně zvýšená. Zakládáme důvodné podezření se domnívat, že psoriáza alteruje epigenetickou informaci buněk nemocných, a to nejen ve smyslu samotného onemocnění, ale také v podobě predisponující jedince k transkripci proteinů typických pro starší věkovou skupinu (vyšší epigenetický věk). Naše data potvrzují, že dochází k oxidačnímu poškození DNA a RNA, tedy k destabilizaci samotné genetické informace. Neočekávaným zjištěním je vyšší průměrná délka telomer u psoriatiků, která vyžaduje bližší zkoumání k posouzení pravděpodobnosti jednotlivých vysvětlujících hypotéz. Bez ohledu na vysvětlení však podporuje námi zjištěný signifikantní rozdíl hypotézu, že psoriáza a proces

stárnutí vzájemně nejen souvisí, ale dokonce se vzájemně ovlivňují. Rád bych svou disertační práci podpořil ostatní vědecké týmy ve světě k dalšímu studování tématu, neboť věřím, že naše výsledky jsou základem pro další zkoumání, která pomohou nejen definitivně rozhodnout zda, ale také, jak se psoriáza a stárnutí vzájemně ovlivňují.

Hypotézu, že zvýšené riziko zrychleného stárnutí u psoriatiků vede k elevaci pravděpodobnosti komorbidit a předčasného úmrtí, se nám v rámci naší práce nepodařilo vyvrátit. Zdá se, že snížená naděje dožití opravdu může souviset s procesem stárnutí. Studie Salahadeen et al. popsala v roce 2015 sníženou naději dožití vůči zbylé populaci o 2,1 roku u osob s mírnou psoriázou a o 4,5 roku pro střední až těžkou (261).

Americká rada preventivní medicíny definuje preventivní medicínu jako "specializaci lékařské praxe, která se zaměřuje na zdraví jednotlivců, komunit a definovaných populací." Primární prevence spočívá v předcházení vzniku nemoci pomocí ovlivnění rizikových faktorů. Snižováním expozice nežádoucím faktorům pracovního a životního prostředí, změnami životního stylu, užíváním medicínských technologií a postupů. Sekundární prevence se zaměřuje na včasné rozpoznání nemoci. V dnešní době navíc v kombinaci se stanovováním rizika dědičných chorob v rámci individuálních predispozic jedince, které potom mohou sloužit k dřívějšímu odhalení vzniku onemocnění nejen u průměrné populace, ale i u jedinců s individuálně vyšším rizikem pro konkrétní onemocnění. Terciární prevence se zabývá omezením progresu onemocnění, zabráněním opakování klinických příhod či postižení nebo ztráty soběstačnosti (262-264).

Dle těchto definicí platí, že cílem prevence je prodlužovat lidský život ve zdraví, v případě mé disertační práce tedy účinně předcházet komorbiditám psoriázy a předčasnému úmrtí. K tomu, abychom je mohli odhalovat, mohou do budoucna sloužit i ukazatele stárnutí. Stávají se v takovou chvíli vlastně nástroji na pomezí primární a sekundární prevence, neboť jsou schopny zpětnovazebně ovlivňovat chování pacientů, měnit tak jejich životní styl a rizikové faktory, zároveň ale v podstatě již z pohledu sekundární prevence rovnou odhalují a popisují zvýšený biologický věk jakožto faktor, který je sám o sobě vlastně onemocněním, zrychleným (akcelerovaným) stárnutím.

4 Závěry

4.1 Závěry prvního cíle

Byla posouzena vhodnost (použitelnost) vybraných ukazatelů biologického stárnutí pro modelový systém onemocnění psoriázou a jejími komorbiditami.

Alarminy představují ukazatele procesu stárnutí popisující změněnou mezibuněčnou komunikaci a byly modelovým systémem onemocnění významně ovlivňovány. Lze je tedy pro tento systém považovat za vhodné. Další z vybraných ukazatelů změněné mezibuněčné komunikace, VEGF modelovým systémem ovlivňován nebyl a za vhodný ukazatel jej zřejmě považovat nelze. Změněnou mezibuněčnou komunikaci (znak stárnutí) indikují i další vybrané ukazatele endocan, IL-17 a CRP. V modelovém systému onemocnění bylo pozorováno významné snížení endocanu a významné zvýšení IL-17 a CRP. V těchto případech je však nutné brát v úvahu skutečnost, že tyto ukazatele mohou být ovlivňovány řadou dalších faktorů životního/pracovního prostředí a životního stylu. Jejich využití jakožto ukazatelů stárnutí v modelovém systému onemocnění proto připadá v úvahu spíše na úrovni populace, nikoliv však na úrovni jedince.

Ze zástupců ukazatelů stárnutí popisujících epigenetické změny se ukázala jako vhodnější metoda *epigenetic clock* (oproti metodě globální methylace), která umožňuje podrobně charakterizovat jednotlivá methylační místa na epigenomu. Použití umělé inteligence výrazně zvyšuje výpovědní hodnotu měření, v tomto případě hodnotu odhadu stavu procesu stárnutí v modelovém systému onemocnění.

Měření genomové nestability pomocí oxidačního poškození RNA/DNA se zdá být slibnou metodou pro kvantifikaci míry rychlosti stárnutí v modelovém systému onemocnění. I v tomto případě je však nutné brát v úvahu silný vliv faktorů životního/pracovního prostředí a životního stylu (například kouření) na hodnocené ukazatele.

Měření délky telomer přineslo neočekávané nálezy, které neumožňují formulovat objektivní hodnocení vhodnosti této metody jako ukazatele procesu stárnutí v modelovém systému onemocnění. Jinými slovy, v tuto chvíli nelze říci, zda měření průměrné délky telomer v periferní krvi metodou PCR je schopno správně kvantifikovat rychlost stárnutí v modelovém systému onemocnění.

4.2 Závěry druhého cíle

Za použití vhodných ukazatelů procesu stárnutí byla provedena analýza vztahů mezi psoriázou, stárnutím a vznikem komorbidit. Prokázali jsme (podle literárních údajů zřejmě jako první), že u pacientů s psoriázou (modelový systém onemocnění) dochází k významným změnám parametrů souvisejících s procesem stárnutí. Nejvýznamnějším důkazem je nález vyššího epigenetického (biologického věku) u žen s psoriázou.

4.3 Vyhodnocení hypotézy

Stanovená hypotéza nebyla potvrzena. Jen část vybraných ukazatelů procesu stárnutí byla významně ovlivňována modelovým systémem onemocnění psoriázou a jejími komorbiditami a lze je tedy považovat (pro tento systém) za vhodné pro charakterizaci procesu stárnutí a k odhadům biologického věku. Jedná se o HMGB1, IL-33, S100A7, S100A12, IL-17 a detailní metylaci DNA (epigenetic clock). S určitými výhradami (zejména z důvodu možného ovlivnění řadou faktorů) by bylo možné akceptovat i endocan, CRP a míru oxidačního poškození RNA/DNA.

Závěrem lze konstatovat, že i když předkládané výsledky nejsou zcela jednoznačné z pohledu kvantitativního a jsou zatíženy dále uvedenými nejistotami, zdá se, že psoriáza kvalitativně ovlivňuje proces stárnutí a významně zvyšuje vznik a rozvoj komorbidit. Tato zjištění dávají základ pro další vědeckou práci na tomto poli.

4.4 Analýza nejistot

Výpovědní hodnota výsledků, jejich interpretací a zobecňujících závěrů je limitována především počtem respondentů a s tím souvisejícím počtem provedených měření. Důvodem této nejistoty jsou v první řadě omezené finanční zdroje školícího pracoviště na velmi nákladná měření (zejména na metody *epigenetic clock*). Dalším zdrojem nejistoty pro zobecňování závěrů je demografické rozložení sledované populace (v dané geografické poloze) a silný vliv faktorů životního/pracovního prostředí a životního stylu na hodnocené ukazatele stárnutí.

4.5 Další přínosy disertační práce

Bližším popisem bych rád zmínil, že se nám podařilo přispět k rozšíření poznatků v oblasti komorbidit psoriázy. Umožnit lépe popsat vzájemný patofyziologický vztah mezi

psoriázou, stárnutím a rozvojem komorbidit, tedy přispět k lepšímu pochopení vztahu mezi nemocí a stárnutím a blíže pochopit, jak psoriáza ovlivňuje naději dožití a ukazatele biologického věku.

Tento cíl se podařilo splnit díky úspěšnému stanovení řady ukazatelů. Komplexnost posouzení vztahu psoriázy a procesu biologického stárnutí lze deklarovat díky sledování čtyřech různých znaků stárnutí, tedy 4 oblastí, ve kterých dochází ke snižování funkčních kapacit v průběhu stárnutí člověka. Těmito oblastmi jsou změněná mezibuněčná komunikace, epigenetické změny, genomová nestabilita a zkracování telomer.

Můj vlastní přínos spatřuji zejména v plánování a tvorbě konceptu tohoto výzkumného směru. Žádný ze znaků stárnutí nebyl na našem pracovišti do mého příchodu systematicky sledován. Během mé práce v rámci postgraduálního studia se podařilo navázat spolupráci s řadou výzkumných, dobročinných i komerčních institucí.

Za významnou považuji spolupráci s firmou *Zymo research* z USA, která umožnila stanovení epigenetického biologického věku pomocí algoritmů umělé inteligence a měření methylace DNA. Můj přínos v této oblasti spočíval ve stanovení hypotéz, vyhledání vhodného způsobu testování, posléze nalezení laboratorního partnera, zprostředkování veškeré komunikace se zahraničním subjektem ze Spojených států Amerických, úspěšné dokončení odběrů od pacientů i kontrolních subjektů s ohledem na požadavky laboratoře, statistickou analýzu, zpracování výsledků, potvrzení či vyvrácení hypotéz, sepsání vědeckého článku a jeho publikování v impaktovaném časopise.

Další ze spoluprací, které vznikly díky mé disertační práci je například vědecká kooperace s *Clock Foundation* založenou prof. Stevem Horvathem z *University of California L.A.* (UCLA), kde jsem komunikoval s jejím výkonným ředitelem Robertem Brookem v rámci konzultací ohledně metody *epigenetic clock* a dalších rozvíjejících se na strojovém učení závislých metod měření biologického věku. Věřím, že tato spolupráce s přední institucí v oblasti stárnutí nám pomohla se rychleji posunout v našem cíli a slibuje velké šance na další budoucí úspěšné projekty.

Za významné považuji také rozšíření portfolia ukazatelů, které jsme dokázali ve spolupráci s Ústavem klinické alergologie a imunologie a s Ústavem klinické biochemie a diagnostiky úspěšně vyzkoušet či zavést. Jedná se zejména o měření průměrné délky telomer, množství globální methylace, hladiny alarminů (HMGB-1, IL-33, S100A7, S100A12). V rámci

studie jsme též pokračovali v měření již dříve užívaných ukazatelů (endocan, VEGF, IL-17, DNA/RNA oxidační poškození).

Originalitu našeho výzkumného záměru spatřuji zejména v propojení poznání procesů odehrávajících se v prostředí autoimunitního onemocnění a procesů v průběhu stárnutí. Bližší poznání etiopatogeneze stárnutí, následná tvorba ukazatelů a případně i terapeutických postupů je velkým příslibem budoucích medicínských technologií.

V naší studii jsme popsali a úspěšně publikovali v mezinárodním impaktovaném časopise výsledek ohledně možné epigenetické zátěže u žen s psoriázou v podobě vyššího biologického věku oproti jejich zdravým vrstevnicím. Naše hypotéza o vyšším epigenetickém věku u všech psoriaticů se nicméně nepotvrdila. Na této publikaci jsem měl majoritní podíl a byl jsem jejím prvním autorem.

V rámci sledování změněné mezibuněčné komunikace jsme objevili statisticky významné zvýšení všech sledovaných alarminů u pacientů s psoriázou oproti kontrolám. Tyto výsledky jsme taktéž publikovali v mezinárodním impaktovaném časopise. Na publikaci jsem měl majoritní podíl a byl jsem jejím prvním autorem.

Překvapivým bylo zjištění delší průměrné délky telomer u pacientů s psoriázou než u zdravých kontrol. Naše hypotéza očekávala opačný stav. Přispěli jsme tak k ambivalenci aktuálního vědeckého poznání, kdy mnohé z vědeckých prací udávají rozporuplné výsledky. V příštích letech bychom se rádi zaměřili na bližší prozkoumání celého profilu délky telomer u pacientů s psoriázou v periferní krvi a umožnili tak blíže popsat, jaké procesy se v průběhu onemocnění v oblasti telomer odehrávají. Příkladem takového budoucího postupu může být již navázaná spolupráce se Španělským *spin-offem* Národního institutu pro Výzkum Onkologických Onemocnění (CNIO). V kooperaci s nimi bychom rádi změřili nejen průměrnou délku telomer, kterou jsme měřili u nás, ale také kompletní profil délky telomer v periferní krvi, vč. podílu nejkratších telomer. Právě nejkratší telomery mají totiž největší vliv na rychlost stárnutí a přítomnost chronického dysfunkčního poškozujícího zánětu.

Výsledky mé disertační práce přispěly k hlubšímu poznání ohledně dosud opomíjené oblasti psoriázy, jejích komorbidit a stárnutí a podpořily hypotézu o vzájemném ovlivňování procesu stárnutí a autoimunitního onemocnění. Dle námi objevených výsledků dochází ke změnám ukazatelů stárnutí u pacientů s psoriázou. Získané informace bychom nicméně rádi využili v dalším zkoumání, neboť prozatím nelze vyvozovat definitivní závěry. Již nyní však

pracujeme na pokračování našeho výzkumu pomocí dalších metod a s rozšířeným souborem pacientů.

D SEZNAM CITACÍ POUŽITÉ LITERATURY

1. Woo YR, Cho DH, Park HJ. Molecular Mechanisms and Management of a Cutaneous Inflammatory Disorder: Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12).
2. Burfield L, Burden AD. Psoriasis. *J R Coll Physicians Edinb.* 2013;43(4):334-8; quiz 9.
3. Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, Ashcroft DM, Identification, Management of P, et al. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol.* 2013;133(2):377-85.
4. Parisi R, Iskandar IYK, Kontopantelis E, Augustin M, Griffiths CEM, Ashcroft DM, et al. National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: systematic analysis and modelling study. *BMJ.* 2020;369:m1590.
5. Rachakonda TD, Schupp CW, Armstrong AW. Psoriasis prevalence among adults in the United States. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(3):512-6.
6. ZDRAVOTNICTVÍ ČR: Stručný přehled činnosti oboru dermatovenerologie za období 2007–2017 NZIS REPORT č. K/12 (08/2018) Uzis.cz2018 [cited 2022 20.07.2022]. Available from: https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/nzis_rep_2018_K12_A032_dermatovenerologie_2017.pdf.
7. Huerta C, Rivero E, Rodriguez LA. Incidence and risk factors for psoriasis in the general population. *Arch Dermatol.* 2007;143(12):1559-65.
8. Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, Barker J. Psoriasis. *Lancet.* 2021;397(10281):1301-15.
9. Rousset L, Halioua B. Stress and psoriasis. *Int J Dermatol.* 2018;57(10):1165-72.
10. Leovigildo ES, David RA, Mendes AS. Stress level of people with psoriasis at a public hospital. *An Bras Dermatol.* 2016;91(4):446-54.
11. Sampogna F, Chren MM, Melchi CF, Pasquini P, Tabolli S, Abeni D, et al. Age, gender, quality of life and psychological distress in patients hospitalized with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2006;154(2):325-31.
12. McKenna KE, Stern RS. The impact of psoriasis on the quality of life of patients from the 16-center PUVA follow-up cohort. *J Am Acad Dermatol.* 1997;36(3 Pt 1):388-94.
13. Dehbi AZ, Radstake TR, Broen JC. Accelerated telomere shortening in rheumatic diseases: cause or consequence? *Expert Rev Clin Immunol.* 2013;9(12):1193-204.
14. Tsoi LC, Stuart PE, Tian C, Gudjonsson JE, Das S, Zawistowski M, et al. Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants. *Nat Commun.* 2017;8:15382.

15. Tang H, Jin X, Li Y, Jiang H, Tang X, Yang X, et al. A large-scale screen for coding variants predisposing to psoriasis. *Nat Genet.* 2014;46(1):45-50.
16. Sun LD, Cheng H, Wang ZX, Zhang AP, Wang PG, Xu JH, et al. Association analyses identify six new psoriasis susceptibility loci in the Chinese population. *Nat Genet.* 2010;42(11):1005-9.
17. Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA.* 2020;323(19):1945-60.
18. Salihbegovic EM, Hadzigraphic N, Suljagic E, Kurtalic N, Hadzic J, Zejcirovic A, et al. Psoriasis and dyslipidemia. *Mater Sociomed.* 2015;27(1):15-7.
19. Schmitt J, Wozel G. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology.* 2005;210(3):194-9.
20. Henseler T, Christophers E. Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 1995;32(6):982-6.
21. Christophers E. Comorbidities in psoriasis. *Clin Dermatol.* 2007;25(6):529-34.
22. Naldi L, Mercuri SR. Epidemiology of comorbidities in psoriasis. *Dermatol Ther.* 2010;23(2):114-8.
23. Dominguez LJ, Barbagallo M. The biology of the metabolic syndrome and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2016;19(1):5-11.
24. Gisondi P, Fostini AC, Fossa I, Girolomoni G, Targher G. Psoriasis and the metabolic syndrome. *Clin Dermatol.* 2018;36(1):21-8.
25. Hirode G, Wong RJ. Trends in the Prevalence of Metabolic Syndrome in the United States, 2011-2016. *JAMA.* 2020;323(24):2526-8.
26. Borska L, Kremlacek J, Andrys C, Krejsek J, Hamakova K, Borsky P, et al. Systemic Inflammation, Oxidative Damage to Nucleic Acids, and Metabolic Syndrome in the Pathogenesis of Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11).
27. Oliveira Mde F, Rocha Bde O, Duarte GV. Psoriasis: classical and emerging comorbidities. *An Bras Dermatol.* 2015;90(1):9-20.
28. Tablazon IL, Al-Dabagh A, Davis SA, Feldman SR. Risk of cardiovascular disorders in psoriasis patients: current and future. *Am J Clin Dermatol.* 2013;14(1):1-7.
29. Masson W, Lobo M, Molinero G. Psoriasis and Cardiovascular Risk: A Comprehensive Review. *Adv Ther.* 2020;37(5):2017-33.
30. Garshick MS, Ward NL, Krueger JG, Berger JS. Cardiovascular Risk in Patients With Psoriasis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* 2021;77(13):1670-80.
31. Kelly A, Meurling J, Kirthi Jeyarajah S, Ryan C, Hughes R, Garvey J, et al. Obstructive sleep apnoea in psoriasis and hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol.* 2021;184(6):1183-5.

32. Gottlieb A, Korman NJ, Gordon KB, Feldman SR, Lebwohl M, Koo JY, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 2. Psoriatic arthritis: overview and guidelines of care for treatment with an emphasis on the biologics. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(5):851-64.
33. Mysliwiec H, Baran A, Mysliwiec P, Gorska M, Flisiak I. Upregulation of the sFas/sFasL system in psoriatic patients. *Adv Med Sci*. 2015;60(1):64-8.
34. Kim JS, Kim IH, Byun JM, Chang JH. Population-based study on the association between autoimmune disease and lymphoma: National Health Insurance Service-National Sample Cohort 2002-2015 in Korea. *J Autoimmun*. 2021;121:102647.
35. Binus AM, Han J, Qamar AA, Mody EA, Holt EW, Qureshi AA. Associated comorbidities in psoriasis and inflammatory bowel disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(5):644-50.
36. Ros S, Puig L, Carrascosa JM. Cumulative life course impairment: the imprint of psoriasis on the patient's life. *Actas Dermosifiliogr*. 2014;105(2):128-34.
37. Torales J, Echeverria C, Barrios I, Garcia O, O'Higgins M, Castaldelli-Maia JM, et al. Psychodermatological mechanisms of psoriasis. *Dermatol Ther*. 2020;33(6):e13827.
38. El-Asrar AM, Struyf S, Kangave D, Al-Obeidan SS, Opdenakker G, Geboes K, et al. Cytokine profiles in aqueous humor of patients with different clinical entities of endogenous uveitis. *Clin Immunol*. 2011;139(2):177-84.
39. Ooi KG, Galatowicz G, Calder VL, Lightman SL. Cytokines and chemokines in uveitis: is there a correlation with clinical phenotype? *Clin Med Res*. 2006;4(4):294-309.
40. Queiro R, Morante I, Cabezas I, Acasuso B. HLA-B27 and psoriatic disease: a modern view of an old relationship. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55(2):221-9.
41. Wakefield D, Yates W, Amjadi S, McCluskey P. HLA-B27 Anterior Uveitis: Immunology and Immunopathology. *Ocul Immunol Inflamm*. 2016;24(4):450-9.
42. Chaiyabutr C, Ungprasert P, Silpa-Archa N, Wongpraparut C, Chularojanamontri L. Psoriasis and Risk of Uveitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2020;2020:9308341.
43. Vaengebjerger S, Skov L, Egeberg A, Loft ND. Prevalence, Incidence, and Risk of Cancer in Patients With Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol*. 2020;156(4):421-9.
44. Loft ND, Vaengebjerger S, Skov L. Cancer risk in patients with psoriasis: should we be paying more attention? *Expert Rev Clin Immunol*. 2020;16(5):479-92.
45. Fu Y, Lee CH, Chi CC. Association of psoriasis with colorectal cancer. *J Am Acad Dermatol*. 2021;85(6):1429-36.
46. Levine HJ. Rest heart rate and life expectancy. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30(4):1104-6.

47. Borsky P, Holmannova D, Fiala Z, Borska L, Hruska L, Kucera O. Physiology of ageing. *Cas Lek Cesk.* 2022;161(1):11-6.
48. da Costa JP, Vitorino R, Silva GM, Vogel C, Duarte AC, Rocha-Santos T. A synopsis on aging-Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev.* 2016;29:90-112.
49. Vina J. The free radical theory of frailty: Mechanisms and opportunities for interventions to promote successful aging. *Free Radic Biol Med.* 2019;134:690-4.
50. Greenberg EF, Vatolin S. Symbiotic Origin of Aging. *Rejuvenation Res.* 2018;21(3):225-31.
51. Bowen RL, Atwood CS. Living and dying for sex. A theory of aging based on the modulation of cell cycle signaling by reproductive hormones. *Gerontology.* 2004;50(5):265-90.
52. Phoenix C, de Grey AD. A model of aging as accumulated damage matches observed mortality patterns and predicts the life-extending effects of prospective interventions. *Age (Dordr).* 2007;29(4):133-89.
53. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.
54. Aunan JR, Watson MM, Hagland HR, Soreide K. Molecular and biological hallmarks of ageing. *Br J Surg.* 2016;103(2):e29-46.
55. Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi AA, Bianchi ME, Rovere-Querini P. HMGB1: An immune odyssey. *Discov Med.* 2005;5(28):388-92.
56. Strohbuecker L, Koenen H, van Rijssen E, van Cranenbroek B, Fasse E, Joosten I, et al. Increased dermal expression of chromatin-associated protein HMGB1 and concomitant T-cell expression of the DNA RAGE in patients with psoriasis vulgaris. *Psoriasis (Auckl).* 2019;9:7-17.
57. Ye Y, Zeng Z, Jin T, Zhang H, Xiong X, Gu L. The Role of High Mobility Group Box 1 in Ischemic Stroke. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:127.
58. Lu H, Zhang Z, Barnie PA, Su Z. Dual faced HMGB1 plays multiple roles in cardiomyocyte senescence and cardiac inflammatory injury. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019.
59. Sehat M, Talaei R, Dadgostar E, Nikoueinejad H, Akbari H. Evaluating Serum Levels of IL-33, IL-36, IL-37 and Gene Expression of IL-37 in Patients with Psoriasis Vulgaris. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2018;17(2):179-87.
60. Lloyd CM. IL-33 family members and asthma - bridging innate and adaptive immune responses. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(6):800-6.
61. Vaccaro M, Cicero F, Mannucci C, Calapai G, Spatari G, Barbuzza O, et al. IL-33 circulating serum levels are increased in patients with non-segmental generalized vitiligo. *Arch Dermatol Res.* 2016;308(7):527-30.
62. Anderson KS, Wong J, Polyak K, Aronzon D, Enerback C. Detection of psoriasin/S100A7 in the sera of patients with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2009;160(2):325-32.

63. Granata M, Skarmoutsou E, Mazzarino MC, D'Amico F. S100A7 in Psoriasis: Immunodetection and Activation by CRISPR technology. *Methods Mol Biol.* 2019;1929:729-38.
64. Son ED, Kim HJ, Kim KH, Bin BH, Bae IH, Lim KM, et al. S100A7 (psoriasin) inhibits human epidermal differentiation by enhanced IL-6 secretion through IkappaB/NF-kappaB signalling. *Exp Dermatol.* 2016;25(8):636-41.
65. Ye L, Sun PH, Martin TA, Sanders AJ, Mason MD, Jiang WG. Psoriasin (S100A7) is a positive regulator of survival and invasion of prostate cancer cells. *Urol Oncol.* 2013;31(8):1576-83.
66. Foell D, Kane D, Bresnihan B, Vogl T, Nacken W, Sorg C, et al. Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2003;42(11):1383-9.
67. Wilsmann-Theis D, Wagenpfeil J, Holzinger D, Roth J, Koch S, Schnautz S, et al. Among the S100 proteins, S100A12 is the most significant marker for psoriasis disease activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(7):1165-70.
68. He XW, Ke SF, Bao YY, Hong WJ, Shen YG, Li C, et al. Serum levels of endocan and endoglin are associated with large-artery atherosclerotic stroke. *Clin Chim Acta.* 2018;478:157-61.
69. Jaipersad AS, Lip GY, Silverman S, Shantsila E. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(1):1-11.
70. Celletti FL, Hilfiker PR, Ghafouri P, Dake MD. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor165 on progression of atherosclerotic plaque. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(8):2126-30.
71. Amatya N, Garg AV, Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 2017;38(5):310-22.
72. Beygi S, Lajevardi V, Abedini R. C-reactive protein in psoriasis: a review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014;28(6):700-11.
73. Boehncke S, Salgo R, Garbaraviciene J, Beschmann H, Hardt K, Diehl S, et al. Effective continuous systemic therapy of severe plaque-type psoriasis is accompanied by amelioration of biomarkers of cardiovascular risk: results of a prospective longitudinal observational study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25(10):1187-93.
74. Strober B, Teller C, Yamauchi P, Miller JL, Hooper M, Yang YC, et al. Effects of etanercept on C-reactive protein levels in psoriasis and psoriatic arthritis. *Br J Dermatol.* 2008;159(2):322-30.
75. McBride JD, Cooper MA. A high sensitivity assay for the inflammatory marker C-Reactive protein employing acoustic biosensing. *J Nanobiotechnology.* 2008;6:5.
76. Kanelleas A, Liapi C, Katoulis A, Stavropoulos P, Avgerinou G, Georgala S, et al. The role of inflammatory markers in assessing disease severity and response to treatment in patients with psoriasis treated with etanercept. *Clin Exp Dermatol.* 2011;36(8):845-50.

77. Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HW, Verheugt FW, Wolbink GJ, et al. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? *Circulation*. 1999;100(1):96-102.
78. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation*. 1998;98(8):731-3.
79. Siegel D, Devaraj S, Mitra A, Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Jialal I. Inflammation, atherosclerosis, and psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;44(2):194-204.
80. Kane AE, Sinclair DA. Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2019;54(1):61-83.
81. Booth LN, Brunet A. The Aging Epigenome. *Mol Cell*. 2016;62(5):728-44.
82. Borsky P, Chmelarova M, Fiala Z, Palicka V, Beranek M, Kremlacek J, et al. Variation of selected genotoxic and epigenetic markers due to therapeutic exposure to PAHs and ultraviolet radiation. *Bratisl Lek Listy*. 2020;121(8):558-64.
83. Brennan K, Flanagan JM. Is there a link between genome-wide hypomethylation in blood and cancer risk? *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(12):1345-57.
84. Dhillon VS, Fenech M. Mutations that affect mitochondrial functions and their association with neurodegenerative diseases. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2014;759:1-13.
85. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*. 2002;21(35):5400-13.
86. Ehrlich M, Lacey M. DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomics*. 2013;5(5):553-68.
87. Unnikrishnan A, Hadad N, Masser DR, Jackson J, Freeman WM, Richardson A. Revisiting the genomic hypomethylation hypothesis of aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2018;1418(1):69-79.
88. Horvath S, Erhart W, Brosch M, Ammerpohl O, von Schonfels W, Ahrens M, et al. Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(43):15538-43.
89. Horvath S, Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Salvioli S, Gentilini D, et al. Accelerated epigenetic aging in Down syndrome. *Aging Cell*. 2015;14(3):491-5.
90. Berdyshev GD, Korotaev GK, Boiarskikh GV, Vaniushin BF. [Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of humpback and its changes during spawning]. *Biokhimiia*. 1967;32(5):988-93.
91. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Chen BH, Colicino E, Harris SE, et al. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol*. 2015;16:25.
92. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013;14(10):R115.

93. Whittemore K, Martinez-Navado E, Blasco MA. Slower rates of accumulation of DNA damage in leukocytes correlate with longer lifespans across several species of birds and mammals. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(21):9829-45.
94. Qiu GH, Zheng X, Fu M, Huang C, Yang X. The protective function of non-coding DNA in DNA damage accumulation with age and its roles in age-related diseases. *Biogerontology*. 2019;20(6):741-61.
95. Xu Y, Sun Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocr Rev*. 2015;36(2):174-93.
96. Kubben N, Misteli T. Shared molecular and cellular mechanisms of premature ageing and ageing-associated diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(10):595-609.
97. Lu L, Jin W, Wang LL. Aging in Rothmund-Thomson syndrome and related RECQL4 genetic disorders. *Ageing Res Rev*. 2017;33:30-5.
98. Laugel V. Cockayne syndrome: the expanding clinical and mutational spectrum. *Mech Ageing Dev*. 2013;134(5-6):161-70.
99. Bin-Jumah MN, Nadeem MS, Gilani SJ, Al-Abbasi FA, Ullah I, Alzarea SI, et al. Genes and Longevity of Lifespan. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3).
100. Borska L, Andrys C, Krejsek J, Palicka V, Vorisek V, Hamakova K, et al. Influence of dermal exposure to ultraviolet radiation and coal tar (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the skin aging process. *J Dermatol Sci*. 2016;81(3):192-202.
101. Nordholm D, Poulsen HE, Hjorthoj C, Randers L, Nielsen MO, Wulff S, et al. Systemic oxidative DNA and RNA damage are not increased during early phases of psychosis: A case control study. *Psychiatry Res*. 2016;241:201-6.
102. Mantha AK, Sarkar B, Tell G. A short review on the implications of base excision repair pathway for neurons: relevance to neurodegenerative diseases. *Mitochondrion*. 2014;16:38-49.
103. Rogulj D, El Aklouk I, Konjevoda P, Ljubic S, Pibernik Okanovic M, Barbir A, et al. Age-dependent systemic DNA damage in early Type 2 Diabetes mellitus. *Acta Biochim Pol*. 2017;64(2):233-8.
104. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev*. 2008;88(2):557-79.
105. Zhu Y, Liu X, Ding X, Wang F, Geng X. Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. *Biogerontology*. 2019;20(1):1-16.
106. Steenstrup T, Kark JD, Verhulst S, Thinggaard M, Hjelmborg JVB, Dalgard C, et al. Telomeres and the natural lifespan limit in humans. *Aging (Albany NY)*. 2017;9(4):1130-42.
107. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev*. 2011;10(2):205-15.
108. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009;460(7253):392-5.

109. Bitto A, Ito TK, Pineda VV, LeTexier NJ, Huang HZ, Sutlief E, et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *Elife*. 2016;5.
110. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science*. 2012;335(6076):1638-43.
111. Blagosklonny MV. Aging and immortality: quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition. *Cell Cycle*. 2006;5(18):2087-102.
112. Blagosklonny MV. Rapamycin for the aging skin. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(24):12822-6.
113. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*. 2015;6:472-85.
114. Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, et al. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284(2):R474-80.
115. Sas K, Szabo E, Vecsei L. Mitochondria, Oxidative Stress and the Kynurenine System, with a Focus on Ageing and Neuroprotection. *Molecules*. 2018;23(1).
116. Zorov DB, Popkov VA, Zorova LD, Vorobjev IA, Pevzner IB, Silachev DN, et al. Mitochondrial Aging: Is There a Mitochondrial Clock? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;72(9):1171-9.
117. Zorov DB, Krasnikov BF, Kuzminova AE, Vysokikh M, Zorova LD. Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. *Biosci Rep*. 1997;17(6):507-20.
118. Jang JY, Blum A, Liu J, Finkel T. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest*. 2018;128(9):3662-70.
119. Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J, et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013;61(1):43-58.
120. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1047-78.
121. Ho TT, Warr MR, Adelman ER, Lansinger OM, Flach J, Verovskaya EV, et al. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature*. 2017;543(7644):205-10.
122. Flores I, Blasco MA. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett*. 2010;584(17):3826-30.
123. Fan H, Xie Q, Zhang Z, Wang J, Chen X, Qiu P. Chronological Age Prediction: Developmental Evaluation of DNA Methylation-Based Machine Learning Models. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:819991.
124. Orkaby AR. Moving beyond chronological age: frailty as an important risk factor for cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2021;42(37):3866-8.

125. Elguezabal-Rodelo R, Ochoa-Precoma R, Vazquez-Marroquin G, Porchia LM, Montes-Arana I, Torres-Rasgado E, et al. Metabolic age correlates better than chronological age with waist-to-height ratio, a cardiovascular risk index. *Med Clin (Barc)*. 2021;157(9):409-17.
126. Robertson JD, Gale RE, Wynn RF, Dougal M, Linch DC, Testa NG, et al. Dynamics of telomere shortening in neutrophils and T lymphocytes during ageing and the relationship to skewed X chromosome inactivation patterns. *Br J Haematol*. 2000;109(2):272-9.
127. Fujii H, Shao L, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4360-5.
128. Sagers L, Melas-Kyriazi L, Patel CJ, Manrai AK. Prediction of chronological and biological age from laboratory data. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(9):7626-38.
129. Galkin F, Mamoshina P, Aliper A, de Magalhaes JP, Gladyshev VN, Zhavoronkov A. Biohorology and biomarkers of aging: Current state-of-the-art, challenges and opportunities. *Ageing Res Rev*. 2020;60:101050.
130. Bai X. Biomarkers of Aging. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1086:217-34.
131. Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B. Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology. *Nutrients*. 2016;8(6).
132. Coussens E, Grine L, Bostoen J, Mielants H, Lambert J. Analysis of telomere length as predictive marker in psoriasis for comorbidities. *Exp Dermatol*. 2016;25(5):388-90.
133. Dodig S, Cepelak I, Pavic I. Hallmarks of senescence and aging. *Biochem Med (Zagreb)*. 2019;29(3):030501.
134. Trombetti A, Reid KF, Hars M, Herrmann FR, Pasha E, Phillips EM, et al. Age-associated declines in muscle mass, strength, power, and physical performance: impact on fear of falling and quality of life. *Osteoporos Int*. 2016;27(2):463-71.
135. Vaz Fragoso CA, McAvay G, Van Ness PH, Casaburi R, Jensen RL, MacIntyre N, et al. Phenotype of normal spirometry in an aging population. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(7):817-25.
136. Tanaka H, Monahan KD, Seals DR. Age-predicted maximal heart rate revisited. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(1):153-6.
137. Harada CN, Natelson Love MC, Triebel KL. Normal cognitive aging. *Clin Geriatr Med*. 2013;29(4):737-52.
138. Tosato M, Marzetti E, Cesari M, Saveria G, Miller RR, Bernabei R, et al. Measurement of muscle mass in sarcopenia: from imaging to biochemical markers. *Aging Clin Exp Res*. 2017;29(1):19-27.
139. Tchkonja T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrbale H, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010;9(5):667-84.
140. JafariNasabian P, Inglis JE, Reilly W, Kelly OJ, Ilich JZ. Aging human body: changes in bone, muscle and body fat with consequent changes in nutrient intake. *J Endocrinol*. 2017;234(1):R37-R51.

141. Levine ME, Lu AT, Bennett DA, Horvath S. Epigenetic age of the pre-frontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer's disease related cognitive functioning. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(12):1198-211.
142. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Ritchie SJ, Muniz-Terrera G, Harris SE, et al. The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. *Int J Epidemiol*. 2015;44(4):1388-96.
143. Lu AT, Quach A, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Raj K, et al. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(2):303-27.
144. Sehl ME, Carroll JE, Horvath S, Bower JE. The acute effects of adjuvant radiation and chemotherapy on peripheral blood epigenetic age in early stage breast cancer patients. *NPJ Breast Cancer*. 2020;6:23.
145. Zhang Y, Wilson R, Heiss J, Breitling LP, Saum KU, Schottker B, et al. DNA methylation signatures in peripheral blood strongly predict all-cause mortality. *Nat Commun*. 2017;8:14617.
146. Pilkington SM, Bulfone-Paus S, Griffiths CEM, Watson REB. Inflammaging and the Skin. *J Invest Dermatol*. 2021;141(4S):1087-95.
147. Langton AK, Halai P, Griffiths CE, Sherratt MJ, Watson RE. The impact of intrinsic ageing on the protein composition of the dermal-epidermal junction. *Mech Ageing Dev*. 2016;156:14-6.
148. Naylor EC, Watson RE, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*. 2011;69(3):249-56.
149. Gould L, Abadir P, Brem H, Carter M, Conner-Kerr T, Davidson J, et al. Chronic wound repair and healing in older adults: current status and future research. *J Am Geriatr Soc*. 2015;63(3):427-38.
150. Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM, Feingold KR, Elias PM. The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2281-90.
151. Norman RA. Geriatric dermatology. *Dermatol Ther*. 2003;16(3):260-8.
152. Akbar AN, Gilroy DW. Aging immunity may exacerbate COVID-19. *Science*. 2020;369(6501):256-7.
153. Fulop T, Larbi A, Pawelec G. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Front Immunol*. 2013;4:271.
154. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):238-46.
155. Salvioli S, Monti D, Lanzarini C, Conte M, Pirazzini C, Bacalini MG, et al. Immune system, cell senescence, aging and longevity--inflamm-aging reappraised. *Curr Pharm Des*. 2013;19(9):1675-9.

156. Hearps AC, Martin GE, Angelovich TA, Cheng WJ, Maisa A, Landay AL, et al. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. *Aging Cell*. 2012;11(5):867-75.
157. Pereira LF, de Souza AP, Borges TJ, Bonorino C. Impaired in vivo CD4+ T cell expansion and differentiation in aged mice is not solely due to T cell defects: decreased stimulation by aged dendritic cells. *Mech Ageing Dev*. 2011;132(4):187-94.
158. Robinson LA, Pierce CM. Is 'inflammaging' fuelling severe COVID-19 disease? *J R Soc Med*. 2020;113(9):346-9.
159. McElhaney JE, Verschoor CP, Andrew MK, Haynes L, Kuchel GA, Pawelec G. The immune response to influenza in older humans: beyond immune senescence. *Immun Ageing*. 2020;17:10.
160. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*. 2007;128(1):92-105.
161. Boren E, Gershwin ME. Inflamm-aging: autoimmunity, and the immune-risk phenotype. *Autoimmun Rev*. 2004;3(5):401-6.
162. Stacy S, Krolick KA, Infante AJ, Kraig E. Immunological memory and late onset autoimmunity. *Mech Ageing Dev*. 2002;123(8):975-85.
163. Rink L, Cakman I, Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly. *Mech Ageing Dev*. 1998;102(2-3):199-209.
164. Jurisic D, Kirin I, Rabic D, Dojcinovic B, Coklo M, Zamolo G. The role of telomerase activity in psoriatic skin lesions. *Med Hypotheses*. 2007;68(5):1093-5.
165. Stephan RP, Lill-Elghanian DA, Witte PL. Development of B cells in aged mice: decline in the ability of pro-B cells to respond to IL-7 but not to other growth factors. *J Immunol*. 1997;158(4):1598-609.
166. Fulop T, Larbi A, Witkowski JM. Human Inflammaging. *Gerontology*. 2019;65(5):495-504.
167. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;908:244-54.
168. Shen C, Wen L, Ko R, Gao J, Shen X, Zuo X, et al. DNA methylation age is not affected in psoriatic skin tissue. *Clin Epigenetics*. 2018;10(1):160.
169. Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF, Hinoue T, Ramjan Z, Liu Y, et al. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat Genet*. 2011;44(1):40-6.
170. Zhou W, Dinh HQ, Ramjan Z, Weisenberger DJ, Nicolet CM, Shen H, et al. DNA methylation loss in late-replicating domains is linked to mitotic cell division. *Nat Genet*. 2018;50(4):591-602.

171. Vandiver AR, Irizarry RA, Hansen KD, Garza LA, Runarsson A, Li X, et al. Age and sun exposure-related widespread genomic blocks of hypomethylation in nonmalignant skin. *Genome Biol.* 2015;16:80.
172. Wu K, Higashi N, Hansen ER, Lund M, Bang K, Thestrup-Pedersen K. Telomerase activity is increased and telomere length shortened in T cells from blood of patients with atopic dermatitis and psoriasis. *J Immunol.* 2000;165(8):4742-7.
173. Consultation WHOE. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet.* 2004;363(9403):157-63.
174. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med.* 2013;13(1):24-57.
175. Bergmann C, Strohbuecker L, Lotfi R, Sucker A, Joosten I, Koenen H, et al. High mobility group box 1 is increased in the sera of psoriatic patients with disease progression. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(3):435-41.
176. Uzawa A, Mori M, Masuda S, Muto M, Kuwabara S. CSF high-mobility group box 1 is associated with intrathecal inflammation and astrocytic damage in neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84(5):517-22.
177. Zickert A, Palmblad K, Sundelin B, Chavan S, Tracey KJ, Bruchfeld A, et al. Renal expression and serum levels of high mobility group box 1 protein in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(1):R36.
178. Andersson U, Harris HE. The role of HMGB1 in the pathogenesis of rheumatic disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1799(1-2):141-8.
179. Mitsui A, Tada Y, Takahashi T, Shibata S, Kamata M, Miyagaki T, et al. Serum IL-33 levels are increased in patients with psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 2016;41(2):183-9.
180. Li J, Liu L, Rui W, Li X, Xuan D, Zheng S, et al. New Interleukins in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Patients: The Possible Roles of Interleukin-33 to Interleukin-38 in Disease Activities and Bone Erosions. *Dermatology.* 2017;233(1):37-46.
181. Han JH, Suh CH, Jung JY, Ahn MH, Kwon JE, Yim H, et al. Serum Levels of Interleukin 33 and Soluble ST2 Are Associated with the Extent of Disease Activity and Cutaneous Manifestations in Patients with Active Adult-onset Still's Disease. *J Rheumatol.* 2017;44(6):740-7.
182. Tamagawa-Mineoka R, Okuzawa Y, Masuda K, Katoh N. Increased serum levels of interleukin 33 in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(5):882-8.
183. Gambichler T, Bechara FG, Scola N, Rotterdam S, Altmeyer P, Skrygan M. Serum levels of antimicrobial peptides and proteins do not correlate with psoriasis severity and are increased after treatment with fumaric acid esters. *Arch Dermatol Res.* 2012;304(6):471-4.
184. Batycka-Baran A, Maj J, Wolf R, Szepietowski JC. The new insight into the role of antimicrobial proteins-alarmins in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Immunol Res.* 2014;2014:628289.

185. Hegyi Z, Zwicker S, Bureik D, Peric M, Koglin S, Batycka-Baran A, et al. Vitamin D analog calcipotriol suppresses the Th17 cytokine-induced proinflammatory S100 "alarmins" psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2012;132(5):1416-24.
186. Shubbar E, Vegfors J, Carlstrom M, Petersson S, Enerback C. Psoriasin (S100A7) increases the expression of ROS and VEGF and acts through RAGE to promote endothelial cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;134(1):71-80.
187. Salama RH, Al-Shobaili HA, Al Robaee AA, Alzolibani AA. Psoriasin: a novel marker linked obesity with psoriasis. *Dis Markers.* 2013;34(1):33-9.
188. Awad SM, Attallah DA, Salama RH, Mahran AM, Abu El-Hamed E. Serum levels of psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) as potential markers of atherosclerosis in patients with psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 2018;43(3):262-7.
189. Takahashi T, Asano Y, Yamashita T, Nakamura K, Saigusa R, Miura S, et al. A potential contribution of psoriasin to vascular and epithelial abnormalities and inflammation in systemic sclerosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2018;32(2):291-7.
190. Uysal S, Yilmaz FM, Karatoprak K, Artuz F, Cumbul NU. The levels of serum pentraxin3, CRP, fetuin-A, and insulin in patients with psoriasis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(22):3453-8.
191. Beranek M, Fiala Z, Kremlacek J, Andrys C, Krejsek J, Hamakova K, et al. Changes in circulating cell-free DNA and nucleosomes in patients with exacerbated psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2017;309(10):815-21.
192. Kondelkova K, Borska L, Andrys C, Krejsek J, Hamakova K, Rendarova S, et al. Selected Inflammatory and Metabolic Markers in Psoriatic Patients Treated with Goeckerman Therapy. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:979526.
193. Ctirad A, Lenka B, David P, Zdenek F, Kveta H, Karel E, et al. Goeckerman's therapy for psoriasis with special reference to serum pentraxin 3 level. *Int J Dermatol.* 2008;47(10):1011-4.
194. Tang Y, Fung E, Xu A, Lan HY. C-reactive protein and ageing. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44 Suppl 1:9-14.
195. Evrin PE, Nilsson SE, Oberg T, Malmberg B. Serum C-reactive protein in elderly men and women: association with mortality, morbidity and various biochemical values. *Scand J Clin Lab Invest.* 2005;65(1):23-31.
196. Borsky P, Fiala Z, Andrys C, Beranek M, Hamakova K, Kremlacek J, et al. C-reactive protein, chemerin, fetuin-A and osteopontin as predictors of cardiovascular risks in persons with psoriasis vulgaris. *Physiol Res.* 2021;70(3):383-91.
197. Coban M, Tasli L, Turgut S, Ozkan S, Tunc Ata M, Akin F. Association of Adipokines, Insulin Resistance, Hypertension and Dyslipidemia in Patients with Psoriasis Vulgaris. *Ann Dermatol.* 2016;28(1):74-9.

198. Sudhesan A, Rajappa M, Chandrashekar L, Ananthanarayanan PH, Thappa DM, Satheesh S, et al. Association of C-Reactive Protein (rs1205) Gene Polymorphism with Susceptibility to Psoriasis in South Indian Tamils. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(10):GC01-GC4.
199. Gisondi P, Lora V, Bonauguri C, Russo A, Lippi G, Girolomoni G. Serum chemerin is increased in patients with chronic plaque psoriasis and normalizes following treatment with infliximab. *Br J Dermatol.* 2013;168(4):749-55.
200. Baran A, Flisiak I, Jaroszewicz J, Swiderska M. Effect of psoriasis activity on serum adiponectin and leptin levels. *Postepy Dermatol Alergol.* 2015;32(2):101-6.
201. Horvath S, Gurven M, Levine ME, Trumble BC, Kaplan H, Allayee H, et al. An epigenetic clock analysis of race/ethnicity, sex, and coronary heart disease. *Genome Biol.* 2016;17(1):171.
202. Fransquet PD, Wrigglesworth J, Woods RL, Ernst ME, Ryan J. The epigenetic clock as a predictor of disease and mortality risk: a systematic review and meta-analysis. *Clin Epigenetics.* 2019;11(1):62.
203. Vignoli A, Tenori L, Luchinat C, Saccenti E. Age and Sex Effects on Plasma Metabolite Association Networks in Healthy Subjects. *J Proteome Res.* 2018;17(1):97-107.
204. Marquez EJ, Chung CH, Marches R, Rossi RJ, Nehar-Belaid D, Eroglu A, et al. Sexual-dimorphism in human immune system aging. *Nat Commun.* 2020;11(1):751.
205. Fang X, Wang L, Wu C, Shi H, Zhou Z, Montgomery S, et al. Sex Hormones, Gonadotropins, and Sex Hormone-binding Globulin in Infants Fed Breast Milk, Cow Milk Formula, or Soy Formula. *Sci Rep.* 2017;7(1):4332.
206. Younes JA, Lievens E, Hummelen R, van der Westen R, Reid G, Petrova MI. Women and Their Microbes: The Unexpected Friendship. *Trends Microbiol.* 2018;26(1):16-32.
207. Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, et al. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and estrogen. *Hum Reprod.* 2009;24(5):1126-32.
208. Lapidus RG, Nass SJ, Davidson NE. The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1998;3(1):85-94.
209. Asada H, Yamagata Y, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Hattori N, et al. Potential link between estrogen receptor-alpha gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Mol Hum Reprod.* 2008;14(9):539-45.
210. Moulton VR. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Front Immunol.* 2018;9:2279.
211. Merola JF, Li T, Li WQ, Cho E, Qureshi AA. Prevalence of psoriasis phenotypes among men and women in the USA. *Clin Exp Dermatol.* 2016;41(5):486-9.
212. Egeberg A, Skov L, Gislason GH, Thyssen JP, Mallbris L. Incidence and Prevalence of Psoriasis in Denmark. *Acta Derm Venereol.* 2017;97(7):808-12.

213. Hooper D. Impact of Psoriasis on Women. *J Drugs Dermatol*. 2019;18(9):950.
214. Wu S, Cho E, Li W, Grodstein F, Qureshi AA. Hormonal Factors and Risk of Psoriasis in Women: A Cohort Study. *Acta Derm Venereol*. 2016;96(7):927-31.
215. Garshick MS, Vaidean G, Nikain CA, Chen Y, Smilowitz NR, Berger JS. Sex differences in the prevalence of vascular disease and risk factors in young hospitalized patients with psoriasis. *Int J Womens Dermatol*. 2019;5(4):251-5.
216. Balta I, Balta S, Demirkol S, Mikhailidis DP, Celik T, Akhan M, et al. Elevated serum levels of endocan in patients with psoriasis vulgaris: correlations with cardiovascular risk and activity of disease. *Br J Dermatol*. 2013;169(5):1066-70.
217. Sabry HH, Sabry JH, Daifalla AEH, Akl EM, Hamed AM, Torky AAA. Serum markers for asymptomatic atherosclerosis in Egyptian psoriatic patients: study controlled by Doppler estimation of carotid intima-media thickness. *Vasc Health Risk Manag*. 2018;14:145-52.
218. Sigurdardottir G, Ekman AK, Verma D, Enerback C. Decreased Systemic Levels of Endocan-1 and CXCL16 in Psoriasis Are Restored following Narrowband UVB Treatment. *Dermatology*. 2018;234(5-6):173-9.
219. Malakouti M, Brown GE, Wang E, Koo J, Levin EC. The role of IL-17 in psoriasis. *J Dermatolog Treat*. 2015;26(1):41-4.
220. Abu El-Asrar AM, Nawaz MI, De Hertogh G, Al-Kharashi AS, Van den Eynde K, Mohammad G, et al. The angiogenic biomarker endocan is upregulated in proliferative diabetic retinopathy and correlates with vascular endothelial growth factor. *Curr Eye Res*. 2015;40(3):321-31.
221. Zablotna M, Sobjanek M, Nedoszytko B, Lange M, Kozicka D, Glen J, et al. Association of psoriasis with the VEGF gene polymorphism in the northern Polish population. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27(3):319-23.
222. Sankar L, Arumugam D, Boj S, Pradeep P. Expression of Angiogenic Factors in Psoriasis Vulgaris. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(3):EC23-EC7.
223. Shahidi-Dadras M, Haghhighatkhah HR, Abdollahimajd F, Younespour S, Partovi Kia M, Zargari O. Correlation between vascular endothelial growth factor and subclinical atherosclerosis in patients with psoriasis. *Int J Dermatol*. 2016;55(1):52-9.
224. Jain N, Shahal T, Gabrieli T, Gilat N, Torchinsky D, Michaeli Y, et al. Global modulation in DNA epigenetics during pro-inflammatory macrophage activation. *Epigenetics*. 2019;14(12):1183-93.
225. Kim GE, Seidler E, Kimball AB. The relative impact of psoriasis and obesity on socioeconomic and medical outcomes in psoriasis patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(2):216-21.
226. Shreberk-Hassidim R, Galili E, Hassidim A, Ramot Y, Merdler I, Baum S, et al. Epidemiology and Comorbidities of Psoriasis among Israeli Adolescents: A Large Cross-Sectional Study. *Dermatology*. 2019;235(6):488-94.

227. Holmannova D, Borsky P, Borska L, Andrys C, Hamakova K, Rehacek V, et al. Metabolic Syndrome, Clusterin and Elafin in Patients with Psoriasis Vulgaris. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16).
228. Zhang P, Su Y, Chen H, Zhao M, Lu Q. Abnormal DNA methylation in skin lesions and PBMCs of patients with psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci.* 2010;60(1):40-2.
229. Chen M, Chen ZQ, Cui PG, Yao X, Li YM, Li AS, et al. The methylation pattern of p16INK4a gene promoter in psoriatic epidermis and its clinical significance. *Br J Dermatol.* 2008;158(5):987-93.
230. Roberson ED, Liu Y, Ryan C, Joyce CE, Duan S, Cao L, et al. A subset of methylated CpG sites differentiate psoriatic from normal skin. *J Invest Dermatol.* 2012;132(3 Pt 1):583-92.
231. Zhang K, Zhang R, Li X, Yin G, Niu X, Hou R. The mRNA expression and promoter methylation status of the p16 gene in colony-forming cells with high proliferative potential in patients with psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32(6):702-8.
232. Ngalamika O, Liang G, Zhao M, Yu X, Yang Y, Yin H, et al. Peripheral whole blood FOXP3 TSDR methylation: a potential marker in severity assessment of autoimmune diseases and chronic infections. *Immunol Invest.* 2015;44(2):126-36.
233. Pollock RA, Abji F, Gladman DD. Epigenetics of psoriatic disease: A systematic review and critical appraisal. *J Autoimmun.* 2017;78:29-38.
234. Mervis JS, McGee JS. DNA methylation and inflammatory skin diseases. *Arch Dermatol Res.* 2020;312(7):461-6.
235. Capell BC, Seykora JT. Loss of Methylation Modification Marks the Presence of Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2020;140(6):1127-8.
236. Barygina V, Becatti M, Lotti T, Taddei N, Fiorillo C. Low dose cytokines reduce oxidative stress in primary lesional fibroblasts obtained from psoriatic patients. *J Dermatol Sci.* 2016;83(3):242-4.
237. Holmannova D, Borska L, Andrys C, Borsky P, Kremlacek J, Hamakova K, et al. The Impact of Psoriasis and Metabolic Syndrome on the Systemic Inflammation and Oxidative Damage to Nucleic Acids. *J Immunol Res.* 2020;2020:7352637.
238. Lin X, Huang T. Oxidative stress in psoriasis and potential therapeutic use of antioxidants. *Free Radic Res.* 2016;50(6):585-95.
239. Borska L, Andrys C, Krejsek J, Palicka V, Chmelarova M, Hamakova K, et al. Oxidative damage to nucleic acids and benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-DNA adducts and chromosomal aberration in children with psoriasis repeatedly exposed to crude coal tar ointment and UV radiation. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:302528.
240. Souliotis VL, Vlachogiannis NI, Pappa M, Argyriou A, Ntouros PA, Sfikakis PP. DNA Damage Response and Oxidative Stress in Systemic Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1).

241. Njajou OT, Cawthon RM, Damcott CM, Wu SH, Ott S, Garant MJ, et al. Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(29):12135-9.
242. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet*. 2003;361(9355):393-5.
243. Tosevska A, Franzke B, Hofmann M, Vierheilg I, Schober-Halper B, Oesen S, et al. Circulating cell-free DNA, telomere length and bilirubin in the Vienna Active Ageing Study: exploratory analysis of a randomized, controlled trial. *Sci Rep*. 2016;6:38084.
244. Ma H, Zhou Z, Wei S, Liu Z, Pooley KA, Dunning AM, et al. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(6):e20466.
245. Svenson U, Nordfjall K, Baird D, Roger L, Osterman P, Hellenius ML, et al. Blood cell telomere length is a dynamic feature. *PLoS One*. 2011;6(6):e21485.
246. Tamayo M, Mosquera A, Rego JI, Fernandez-Sueiro JL, Blanco FJ, Fernandez JL. Differing patterns of peripheral blood leukocyte telomere length in rheumatologic diseases. *Mutat Res*. 2010;683(1-2):68-73.
247. Kordinas V, Ioannidis A, Chatzipanagiotou S. The Telomere/Telomerase System in Chronic Inflammatory Diseases. Cause or Effect? *Genes (Basel)*. 2016;7(9).
248. Abdisalaam S, Bhattacharya S, Mukherjee S, Sinha D, Srinivasan K, Zhu M, et al. Dysfunctional telomeres trigger cellular senescence mediated by cyclic GMP-AMP synthase. *J Biol Chem*. 2020;295(32):11144-60.
249. Lai TP, Wright WE, Shay JW. Comparison of telomere length measurement methods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018;373(1741).
250. Kamiya K, Kishimoto M, Sugai J, Komine M, Ohtsuki M. Risk Factors for the Development of Psoriasis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).
251. Lee EB, Wu KK, Lee MP, Bhutani T, Wu JJ. Psoriasis risk factors and triggers. *Cutis*. 2018;102(5S):18-20.
252. Schwartz BG, Kloner RA, Naghavi M. Acute and Subacute Triggers of Cardiovascular Events. *Am J Cardiol*. 2018;122(12):2157-65.
253. Tiffon C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11).
254. Kovacic JC, Moreno P, Hachinski V, Nabel EG, Fuster V. Cellular senescence, vascular disease, and aging: Part 1 of a 2-part review. *Circulation*. 2011;123(15):1650-60.
255. Costantino S, Paneni F, Cosentino F. Ageing, metabolism and cardiovascular disease. *J Physiol*. 2016;594(8):2061-73.

256. Fadini GP, Ceolotto G, Pagnin E, de Kreutzenberg S, Avogaro A. At the crossroads of longevity and metabolism: the metabolic syndrome and lifespan determinant pathways. *Aging Cell*. 2011;10(1):10-7.
257. Hosseini Z, Whiting SJ, Vatanparast H. Type 2 diabetes prevalence among Canadian adults - dietary habits and sociodemographic risk factors. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2019;44(10):1099-104.
258. Yang Y, Hu X, Zhang Q, Zou R. Diabetes mellitus and risk of falls in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Age Ageing*. 2016;45(6):761-7.
259. Goossens MC, De Greve J. Individual cancer risk as a function of current age and risk profile. *Eur J Cancer Prev*. 2010;19(6):485-95.
260. Wirtz PH, von Kanel R. Psychological Stress, Inflammation, and Coronary Heart Disease. *Curr Cardiol Rep*. 2017;19(11):111.
261. Salahadeen E, Torp-Pedersen C, Gislason G, Hansen PR, Ahlehoff O. Nationwide population-based study of cause-specific death rates in patients with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(5):1002-5.
262. Jung P, Lushniak BD. Preventive Medicine's Identity Crisis. *Am J Prev Med*. 2017;52(3):e85-e9.
263. Rojas KD, Perez ME, Marchetti MA, Nichols AJ, Penedo FJ, Jaimes N. Skin Cancer: Primary, Secondary, and Tertiary Prevention. Part II. *J Am Acad Dermatol*. 2022.
264. Perez M, Abisaad JA, Rojas KD, Marchetti MA, Jaimes N. Skin Cancer: Primary, Secondary, and Tertiary Prevention. Part I. *J Am Acad Dermatol*. 2022.