

UNIVERZITA KARLOVA, PRAHA

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



HABILITAČNÍ PRÁCE

Nové cíle antifibrotické léčby u systémové sklerodermie

Zpracoval: MUDr. Michal Tomčík, Ph.D.

E-mail: tomcik@revma.cz

Pracoviště: Revmatologický ústav

Revmatologická klinika 1. LF UK

Na Slupi 4

128 50 Praha 2

Tel. +420 234 075 101

Fax. +420 224 914 451

Praha 2017

OBSAH	Stránka
1. ÚVOD	3
1.1. Tkáňová fibróza u systémové sklerodermie	4
1.1.1. Patogeneze fibrózy	4
1.1.2. Současné možnosti ovlivnění tkáňové fibrózy u systémové sklerodermie	6
1.2. Zkoumané potenciální cíle antifibrotické terapie u systémové sklerodermie	9
1.2.1. Heat shock protein 90 (Hsp90)	9
1.2.2. S100A4	10
1.2.3. Tribbles homologue 3 (Trb3)	11
1.2.4. Interleukin (IL)-35	11
1.2.5. Adiponectin	12
1.3. Literatura	13
1.4. Přílohy	21
2. HYPOTÉZA	26
3. CÍLE PRÁCE	26
4. KOMENTÁŘE K PUBLIKACÍM ZAŘAZENÝM DO HABILITAČNÍ PRÁCE	28
5. ZÁVĚR	37
6. SEZNAM PŘILOŽENÝCH PUBLIKACÍ	38
7. KOMPLETNÍ SEZNAM PUBLIKACÍ	39
8. PODĚKOVÁNÍ	45

ÚVOD

Systémová sklerodermie (SSc) je vzácné, chronické systémové onemocnění pojiva postihující kůži, pohybové ústrojí a vnitřní orgány. Název tohoto onemocnění je odvozen z řeckých slov „scleros“ a „derma“ – tuhá kůže a byl prvně použit Gintracem v roce 1847. První zmínka o tuhé kůži, na které nelze vytvořit řasu, však pochází již od Hippokrata asi 400 let př. n. l (Gabrielli A et al. 2009). Pro SSc je typická heterogenita multisystémových klinických manifestací a variabilní, nepředvídatelný průběh. Dochází k postižení kůže, srdce, tepen, plic, gastrointestinálního traktu, ledvin a sexuálních funkcí. Mezi hlavní patologické procesy v patogenezi SSc patří autoimunita a zánět, vaskulopatie a fibróza (Abraham DJ, Varga J 2005). Všechny klíčové procesy jsou vzájemně propojeny, což odlišuje SSc od jiných systémových onemocnění pojiva a fibrotizujících onemocnění. Pacienty se SSc běžně klasifikujeme podle typu kožního postižení na dva základní podtypy - limitovanou (lcSSc, limited cutaneous SSc) a difúzní formu (dcSSc, diffuse cutaneous SSc). Pro difúzní formu je typická rapidní progresse fibrózy kůže, plic a dalších vnitřních orgánů, zatímco u limitované SSc dominují cévní manifestace a fibróza kůže a orgánů je obecně limitovaná a progreduje pomalu (LeRoy EC, Medsger TA, Jr. 2001). I když se kvalita života a délka přežití pacientů se SSc v posledních letech stále zlepšuje, hlavně díky pokroku v léčbě orgánových manifestací a komplikací, SSc pořád zůstává nevléčitelnou nemocí. Difúzní forma SSc sebou nese nejvyšší riziko úmrtí ze všech systémových onemocnění pojiva s délkou přežití 10 let v 49 % (Czirjak L et al. 2008). Mezi nejčastější příčiny úmrtí u pacientů se SSc v současné době patří plicní fibróza (35 %), plicní arteriální hypertenze (26 %), srdeční selhání a arytmie (26 %). Sklerodermická renální krize ztratila své dominantní postavení mezi příčinami mortality se začátkem používání ACE inhibitorů (Tyndall AJ et al. 2010).

Etiologie SSc je neznámá. Při vzniku tohoto onemocnění se mohou uplatnit genetické i vnější faktory a významnou roli zde mají humorální a imunologické děje. Bylo popsáno několik genů, které mohou být asociovány s predispozicí ke vzniku SSc, ale etiologii SSc nelze vysvětlit jen na základě genetických faktorů. Konkordance u dvojčat je jen 5%, ale prevalence SSc v rodinách (1,6 %) je několikrát vyšší než v běžné populaci (0,003 - 0,03 %) a pozitivní rodinná anamnéza pořád zůstává nejsilnějším rizikovým faktorem pro rozvoj SSc (Feghali-Bostwick C et al. 2003). Asociace mezi vnějšími vlivy (např. profesní expozice, viry a bakterie) a rozvojem SSc byly dostatečně zkoumány, ale role těchto faktorů není dosud uspokojivě objasněna. Nejsilnější důkazy existují pro sloučeniny křemíku a organická rozpouštědla, avšak jejich podíl na všech případech SSc je jen minimální (Mora GF 2009).

V patogenezi SSc dominují tři navzájem se prolínající patologické procesy: i) poškození endotelu a obliterující vaskulopatie cévních lůžek, ii) zánět a autoimunita a iii) progresivní fibróza (Varga J, Abraham D 2007). Vaskulární poškození je nejčasnějším a pravděpodobně i primárním procesem v patogenezi SSc a je histopatologicky prokazatelné před rozvojem fibrózy a objevením se prvního klinického příznaku, kterým obvykle bývá Raynaudův fenomén. K dalším manifestacím vaskulopatie u SSc patří teleangiektázie, typické změny na kapilárách nehtového lůžka, trofické defekty, plicní arteriální hypertenze, antrální vaskulární ektázie a renální krize s maligní hypertenzí (Kahaleh MB et al. 1979). V patogenezi SSc má význam jak vrozená tak získaná imunita. V postižených tkáních lze histopatologicky prokázat perivaskulární infiltráty (zejména T a B lymfocyty, makrofágy a žírné buňky), které přispívají k rozvoji SSc sekrecí různých profibrotických cytokinů a chemokinů a produkcí autoprotilátů (Artlett CM 2005). Fibróza bývá často dominantním rysem SSc a postihuje jak kůži, tak vnitřní orgány - zejména plíce, srdce a gastrointestinální trakt. Dochází k postupnému nahrazení funkční tkáně postižených orgánů kolagenními vlákny a dalšími složkami extracelulární matrix (ECM), což vede ke ztrátě jejich funkce a selhávání (Varga J, Abraham D 2007).

1.1. Tkáňová fibróza u systémové sklerodermie

Tkáňová fibróza obecně je konečným běžným patologickým důsledkem řady chronických zánětlivých onemocnění a představuje rostoucí globální problém ve zdravotní péči, jenž dle recentních statistik přispívá až k 45 % všech úmrtí celosvětově (Wynn TA, Ramalingam TR 2012). Ke zvýšené produkci ECM dochází za fyziologických podmínek při hojení ran. Na rozdíl od tohoto sebelimitujícího procesu dochází v hypertrofické jizevnaté tkáni, při chronické zánětlivé stimulaci a v lézích pacientů se SSc k perzistentní zesílené fibrogenezi s nadbytečnou perivaskulární a intersticiální akumulací ECM (Varga J, Abraham D 2007).

1.1.1. Patogeneze fibrózy

Fibroblasty jsou hlavním efektozem fibrogeneze. Fibroblasty izolované z postižené kůže nebo plic pacientů se SSc mají abnormální, aktivovaný fenotyp, který je signál-independentní a přetrvává po několik pasáží in vitro (LeRoy EC 1974). Pro aktivovaný fenotyp je typická nadměrná produkce složek ECM, konstitutivní sekrece cytokinů a chemokinů a zvýšená exprese membránových receptorů vážících profibrotické mediátory. ECM představuje komplexní směs proteinů uspořádaných do organizované struktury, mezi které patří hlavně kolageny, proteoglykany, fibriliny, fibronektin, malé proteoglykany bohaté

na leucin a adhezní molekuly (Pannu J, Trojanowska M 2004). SSc fibroblasty jsou rovněž relativně rezistentní vůči apoptóze a je u nich zvýšena exprese faktorů s antiapoptotickým účinkem Bcl2 (B-cell lymphoma 2) a Akt (PKB, proteinkináza B). U SSc fibroblastů také častěji dochází k transdiferenciaci v myofibroblasty (aktivované fibroblasty) obsahující α -smooth muscle actin (α -SMA) – centrální komponentu cytoplazmatického kontraktálního aparátu buněk podobných hladkému svalu. Za fyziologických podmínek hrají myofibroblasty hlavní roli v procesu hojení ran prostřednictvím její kontrakce, syntézy kolagenů a dalších složek EMC a sekrece profibrotických mediátorů. Zdrojem pro myofibroblasty jsou kromě rezidentních intersticiálních fibroblastů podléhajících procesu transdiferenciace také pericyty, progenitory z kostní dřeně a buňky epitelu, které podléhají za patologických podmínek, jakými jsou tumorigeneze a renální a plicní fibróza, epiteliálně-mezenchymální tranzici (EMT) (Varga J, Abraham D 2007). Většiny charakteristik aktivovaných SSc fibroblastů lze dosáhnout pomocí stimulace transformujícím růstovým faktorem beta (TGF- β). Zvýšená exprese receptorů pro TGF- β na povrchu SSc fibroblastů a alterovaný poměr receptorů I. a II. typu vede k robustní odpovědi na TGF- β ligand (Pannu J, Trojanowska M 2004). K dosažení kompletního fenotypu SSc fibroblastů však samotné TGF- β nestačí a předpokládá se účast epigenetických modifikací, alterace signálních cest integrinů z prostředí okolní ECM a mezibuněčné kontakty s dalšími buněčnými typy včetně destiček, buněk zánětlivého infiltrátu, endotelu a epitelu (Varga J, Abraham D 2007).

Mezi hlavní mediátory fibrózy u SSc patří TGF- β , jenž je produkován jako latentní komplex četnými buňkami včetně destiček, monocytů/makrofágů, T lymfocytů a fibroblastů. Proces aktivace TGF- β je regulován interakcí s fibrilinem a dalšími složkami ECM včetně integrinů, trombospondinů, THY-1 (CD 90, Cluster of Differentiation 90) a plasminu. V buňkách mezenchymu podporuje TGF- β syntézu kolagenu, proliferaci, migraci, adhezi a transdiferenciaci buněk v myofibroblasty (Varga J, Abraham D 2007). Po navázání aktivního TGF- β na TGF- β receptor II. typu (TGF β RII) dochází k heterodimerizaci a aktivaci transmembránové serin-treoninové kinázy TGF- β receptoru I. typu (TGF β RI). Ten následně aktivuje klasickou Smad-dependentní TGF- β signální transdukcí (obr. 1) i Smad-nedependentní signální cesty (obr. 2). Mezi cílové geny Smad-dependentní signální kaskády patří kolagen typu I, inhibitor aktivátoru plasminogenu-1 (PAI-1), α -SMA, CTGF a Smad7. U SSc fibroblastů byla prokázána deregulace procesů aktivace a inhibice Smad proteinů (Pannu J, Trojanowska M 2004; Massague J, Gomis RR 2006).

Mezi další mediátory fibrogenese u SSc patří CTGF (tkáňový pojivový růstový faktor) a PDGF (růstový faktor z destiček). CTGF je členem rodiny Cyr61/CTGF/NOV (CCN)

matricelulárních růstových faktorů, které spojují buněčný povrch s ECM, kontrolují mezibuněčná spojení a migraci buněk, modulují aktivitu TGF- β a dalších cytokinů a regulují buněčnou diferenciaci, proliferaci, apoptózu a syntézu ECM (Leask A, Abraham DJ 2006). TGF- β a ET-1 (endothelin-1) indukují expresi CTGF a ten je rovněž efektoem TGF- β v stimulaci produkce ECM (Krieg T et al. 2007).

Dalším mediátorem fibrózy u SSc je PDGF. PDGF je potentním mitogenem a chemoatraktantem fibroblastů, nepřímo indukuje produkci kolagenu, fibronektinu a proteoglykanů a zvyšuje sekreci profibrotických cytokinů TGF- β , MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) a IL-6 (Varga J, Abraham D 2007). PDGF je uvolňován aktivovanými destičkami, makrofágy a buňkami endotelu, jejichž alterované funkce a počet přispívají ke zvýšené expresi PDGF ve tkáních SSc pacientů. Dalším aktivátorem PDGF jsou stimulaující autoprotilátky proti PDGF receptorům, které přes aktivaci intracelulární kaskády Ha-Ras-ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases) a produkci kyslíkových radikálů vedou k aktivaci fibroblastů. Tento mechanismus je důkazem propojení procesů autoimunity a fibrózy v patogenezi SSc, které společně s vaskulopatií vedou k rozvoji a progresi této nemoci (Baroni SS et al. 2006).

1.1.2. Současné možnosti ovlivnění tkáňové fibrózy u systémové sklerodermie

Jelikož dosud neexistuje univerzální účinná léčba SSc, farmakologická terapie tohoto onemocnění je pouze orgánově specifická a symptomatická. Vzhledem ke skutečnosti, že mezi hlavní patogenetické mechanismy u SSc patří aktivace imunitního systému a abnormality buněčné i humorální imunity vedoucí k produkci autoprotilátek a profibrotických cytokinů, je u pacientů s aktivní dcSSc a/nebo zánětlivým postižením (jako např. artritida, myozitida, myokarditida a alveolitida v rámci intersticiálního plicního postižení) odborníky doporučována systémová léčba imunosupresivními preparáty. V časně fázi dcSSc je zvýšené riziko rychlého rozvoje orgánového postižení a cílem imunosupresivní léčby je snaha o zpomalení progresu a zmírnění závažnosti orgánového postižení a následných komplikací. Ze všech klinických projevů SSc má však kožní postižení historicky nejmenší odpověď na protizánětlivou anebo imunosupresivní léčbu v dosud prováděných kontrolovaných klinických hodnoceních (Kowal-Bielecka O et al. 2016).

I proto recentně aktualizovaná doporučení Evropské ligy proti revmatismu (EULAR) pro léčbu SSc vzhledem k obecnému nedostatku důkazů v podobě kvalitních randomizovaných kontrolovaných studií (RCT) odkazuje při ovlivnění kožní fibrózy u

pacientů s časnou dcSSc a s intersticiálním plicním postižením (ILD) pouze na tři léčebné modalitty:

- i) metotrexát (MTX), u kterého byl ve dvou RCT demonstrován trend ke zlepšení kožního skóre (hodnoceno pomocí modifikovaného Rodnanova kožního skóre (mRSS));
- ii) cyklofosfamid (CYC), u kterého byla ve dvou RCT demonstrována stabilizace plicních funkcí a zmírnění kožního postižení;
- iii) autologní transplantace kmenových buněk (HSCT), založena na důkazech ze dvou RCT, ve kterých bylo demonstrováno významné zlepšení mRSS a plicních funkcí (nikoliv však DLCO) ve srovnání s CYC a lepší dlouhodobé přežití bez nežádoucích událostí u HSCT (Kowal-Bielecka O et al. 2016).

K dalším v revmatologii běžně užívaným imunosupresivním preparátům, konvenčním syntetickým chorobu modifikujícím lékům (csDMARDs, jako např. mykofenolát mofetil (MMF) nebo azatioprin (AZA)) a biologickým DMARDs (bDMARDs, jako např. rituximab (RTX), tocilizumab (TCZ), abatacept (ABA) a TNF- α inhibitory) a jejich účinnosti u kožního postižení a ILD u dcSSc se panel expertů EULARu vzhledem k nedostatku kvalitních důkazů nevyjadřuje (Kowal-Bielecka O et al. 2016). V klinické praxi se však můžeme často setkat s použitím i těchto preparátů. U MMF prokázaly reanalýzy ze dvou RCT srovnatelné zmírnění mRSS a stabilizaci plicních funkcí jako u CYC (Namas R et al. 2017; Volkmann ER et al. 2017). U RTX byl v jedné malé RCT a v zatím největší observační studii případů a kontrol z registru EUSTAR (European Scleroderma Trials and Research group) prokázán významný pokles mRSS a stabilizace plicních funkcí u aktivní ILD (Jordan S et al. 2015; McQueen FM, Solanki K 2015). Právě probíhá velká RCT s RTX iniciovaná společností EUSTAR, jejíž výsledky nabídnou větší evidenci o účinnosti RTX. U inhibitorů TNF-alfa neexistuje dostatek důkazů o účinném ovlivnění kožního postižení u SSs a jejich podávání v této indikaci není odborníky doporučováno i vzhledem k možné progresi ILD (Nagaraja V et al. 2015). Inhibitor stimulační T lymfocytů ABA byl zkoumán v jedné malé RCT s výsledným trendem ke zlepšení mRSS a výsledky právě probíhající další RCT zatím nebyly uveřejněny (Chakravarty EF et al. 2015). Příznivé, klinicky významné, ale statisticky nevýznamné, zlepšení mRSS a plicních funkcí demonstrovala první RCT fáze II s TCZ (Khanna D et al. 2016), ale definitivní závěry a doporučení lze dělat až po potvrzení těchto výsledků v probíhající RCT fáze III. Další možností ovlivnění kožního postižení zejména u pacientů s aktivní rychle progredující dcSSc, neodpovídajících na konvenční imunosupresivní léčbu, je podávání intravenózních globulinů (IVIG). Mechanismus účinku IVIG je dosud neznámý, ale většina studií demonstrovala příznivé účinky na postižení kůže – data však pocházejí ze série případů,

otevřených hodnocení jednotlivých center anebo z jedné větší retrospektivní multicentrické studie (Sanges S et al. 2017).

V poslední dekádě jsme byli svědky exponenciálního růstu počtu publikací v oblasti bazálního, preklinického i klinického výzkumu u SSc, která byla ještě před nedávnem řazena mezi tzv. orphan diseases. Nové poznatky v patogenezi SSc přinesly i řadu potenciálních cílů terapie. Pro preklinické testování nových antifibrotických terapií jsou běžně používány in vitro experimenty na tkáňových nebo buněčných kulturách anebo in vivo experimenty za pomoci zvířecích experimentálních modelů SSc. Přehled nejčastěji používaných experimentálních modelů SSc, jejich výhody a nevýhody, strategii volby vhodného modelu a jejich přínos ke stavu poznání a možnostem léčby SSc nabízí první příložená publikace. Zde je však na místě uvést několik kandidátních molekul antifibrotické terapie, které úspěšně prošly zmíněným preklinickým testováním a vstoupily již do klinické fáze hodnocení u pacientů se SSc v tzv. proof-of-concept studies (Bruni C et al. 2017):

- i) imatinib mesylát (inhibitor tyrosinkináz PDGFR, c-Abl, c-Kit) – po prvních slibných výsledcích otevřeného klinického hodnocení se zlepšením mRSS a FVC přišly negativní výsledky u 2 RCT v podobě neúčinnosti a častých nežádoucích účinků;
- ii) dasatinib (inhibitor tyrosinkináz Bcr-Abl, Src) – byla již ukončena RCT u SSc-ILD a jsou očekávány její výsledky;
- iii) nilotinib (inhibitor tyrosinkinázy Bcr-Abl, 10-30x potentnější než imatinib) – v otevřeném nekontrolovaném hodnocení u časně dcSSc byl demonstrován pokles mRSS, ale i trend poklesu FVC a DLCO;
- iv) nintedanib (inhibitor tyrosinkináz FGFR, VEGFR, Src) – byl již schválen na základě 2 RCT pro léčbu idiopatické plicní fibrózy (IPF) a nyní je hodnocen u SSc-ILD ve velké RCT fáze III;
- v) antagonistu receptoru typu 1 pro kyselinu lysofosfatidovou (LPAR1) – byl hodnocen v malé RCT u časně dcSSc, kde byl demonstrován trend ke snížení mRSS;
- vi) fresolimumab (monoklonální protilátka inhibující všechny isoformy TGF- β) – byl hodnocen v malé otevřené studii u časně dcSSc, kde bylo demonstrováno snížení mRSS;
- vii) pirfenidon (inhibitor TGF- β s ne zcela objasněným mechanismem účinku) – byl již schválen pro léčbu IPF a byl hodnocen v malé otevřené randomizované studii fáze II u SSc-ILD jako bezpečný preparát s výhledem dalšího hodnocení ve fázi III;
- viii) pomalidomid (analog thalidomidu druhé generace) – kontrolovaná studie fáze II u SSc hodnotící jeho bezpečnost byla ukončena pro pomalý nábor pacientů;

- ix) rapamycin (makrolidové antibiotikum s imunosupresivními účinky) – studie fáze I-II u dcSSc prokázala srovnatelné snížení mRSS a stabilizaci FVC ve srovnání s MTX;
- x) pan-PPAR agonista (agonista Peroxisome proliferator activated receptor, jenž má antifibrotické účinky) – již bylo zahájena RCT fáze II u dcSSc hodnotící bezpečnost a účinnost;
- xi) riociguat (stimulátor solubilní guanylátcyklázy (sGC), která má vazodilatační a antifibrotické účinky) – byl již schválen pro léčbu idiopatické plicní arteriální hypertenze a v současnosti jsou zkoumány jeho antifibrotické účinky ve velké RCT u časné dcSSc;
- xii) tergurid (antagonista serotoninových receptorů 5-HT_{2A} a 5-HT_{2B}, které jsou mediátorem profibrotické osy serotoninu) – plánováno zahájení RCT u dcSSc (Bruni C et al. 2017).

1.2. Zkoumané potenciální cíle antifibrotické terapie u systémové sklerodermie

1.2.1. Heat shock protein 90 (Hsp90)

Proteiny tepelného šoku (Hsps) jsou rodinou molekulárních chaperonů, které byly objeveny v buňkách slinných žláz *Drosophily* a pojmenovány na základě skutečnosti, že jejich exprese po expozici vysoké teplotě vzrůstá. V eukaryotických buňkách však dochází k indukci jejich syntézy i vlivem jiných stresových situací, např. nízké teploty, přítomnosti virové infekce, změn pH, intracelulárního prostředí, expozici UV záření, hladovění, imobilitě, nadměrné fyzické zátěži, ale i během hojení a remodelace tkání (Hartl FU 1996). Hsps dělíme podle své molekulární hmotnosti na Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 a malé Hsp. Hsps selektivně rozpoznávají a vážou nesprávně sbalené proteinové klienty, které posléze stabilizují ve správné prostorové konformaci, čímž je chrání před degradací v proteozomech (Buchner J 1996). Předchozí práce prokázaly, že Hsp90 je nezbytný pro stabilizaci mnoha receptorů (např. EGFR, TGF- β receptor II. typu), protein-kináz (např. NF- κ B, ERK, PI3K, IKK, Bcr/Abl, Src) a transkripčních faktorů, které regulují řadu biologických procesů důležitých pro růst a přežití nádorových buněk, ale i pro regulaci tkáňové fibrózy (TGF- β receptor a Src kinázy) (Calderwood SK et al. 2006; Koga F et al. 2006; Wrighton KH et al. 2008). Četné práce demonstrovaly, že Hsp90 podporuje angiogenezi, invazivní růst nádorů, tvorbu metastáz a inhibuje apoptózu nádorových buněk. Zvýšená exprese Hsp90 byla detekována u řady solidních tumorů a lymfoproliferativních onemocnění a signalizuje špatnou prognózu, horší odpověď na terapii a zkrácené přežití (Calderwood SK et al. 2006). Recentnější práce demonstrovaly, že se Hsp90 podílí i na prezentaci antigenu a aktivaci vrozené imunitní odpovědi (Nardai G et al. 2006). Zvýšená exprese Hsp90 byla popsána i u některých

revmatických onemocnění, např. v mononukleárních buňkách periferní krve (PBMC) pacientů s vyšší aktivitou systémového lupus erythematoses (SLE) (Shukla HD, Pitha PM 2012), ve svalové tkáni pacientů s idiopatickými zánětlivými myopatiemi (IZM) (De Paepe B et al. 2009; De Paepe B, De Bleecker JL 2013) a v plazmě pacientů s IZM a se spondyloartritidou (SpA) (nepublikovaná data naší pracovní skupiny).

1.2.2. S100A4

S100A4 (znám také jako metastasin-1, calvasculin, pEL, p9Ka, FspI, CAPL) je kalcium vázící protein, který byl původně izolován u myši jako protein tvořený metastatickými buňkami adenokarcinomu mléčné žlázy (Ebraldze A et al. 1989). Vazba kalcia vede ke strukturálním změnám umožňujícím navázání cílové molekuly a regulaci různých biologických procesů. V intracelulárním prostředí se podílí na regulaci buněčné proliferace, apoptózy, motility a remodelace ECM (Donato R 2001). S100A4 uvolněný do extracelulárního prostředí má vlastnosti podobné cytokinům, které v určitých případech uplatňuje prostřednictvím receptoru RAGE (receptor for advanced glycation end-products) (Huttunen HJ et al. 2000). Četné studie prokázaly zvýšení exprese S100A4 u různých nádorových onemocnění a přímou souvislost s frekvencí tvorby metastáz a zvýšenou mortalitou pacientů (např. u nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu prostaty, močového měchýře, duktálního adenokarcinomu pankreatu, kolorektálního karcinomu) (Mishra SK et al. 2012). V posledních letech se objevuje mnoho prací, které dávají S100A4 do souvislosti s četnými nenádorovými onemocněními, např. tkáňová fibróza, regenerace poškozených neuronů a rohovky, psoriáza i zánětlivá revmatická onemocnění. Společným jmenovatelem většiny zmíněných onemocnění jsou fibrotické a zánětlivé procesy, tj. procesy závislé na remodelaci tkání, buněčné motilitě a epiteliálně-mezenchymální tranzici (EMT) (Schneider M et al. 2008). S100A4 byl popsán jako mediátor renální fibrózy, jaterní fibrózy a primární biliární cirhózy, idiopatické plicní fibrózy a fibrózy myokardu (Zeisberg M et al. 2003; Lawson WE et al. 2005; Schneider M et al. 2007; Zeisberg EM et al. 2007; Zeisberg M et al. 2007). U revmatoidní artritidy (RA) S100A4 podněcuje patologickou remodelaci artritických kloubů, zvyšuje expresi matrixmetaloproteináz a je zvýšeně produkován v místě zánětu synoviálními fibroblasty, zánětlivými buňkami i chondrocyty. Navíc byla prokázána jeho zvýšená exprese jak v synoviální tkáni a synoviální tekutině, tak i v plazmě pacientů s RA (Senolt L et al. 2006; Klingelhofer J et al. 2007). Zvýšená exprese S100A4 byla také prokázána v zánětem postižené svalové tkáni pacientů s IZM, kde působí pravděpodobně jako faktor podobný cytokinům, který podporuje postižení svalových vláken prostřednictvím

stimulace produkce prozánětlivých cytokinů mononukleárními buňkami (Cerezo LA et al. 2011).

1.2.3. Tribbles homologue 3 (Trb3)

Tribbles homologue 3 (Trb3, známý i jako TRIB3, NIPK a SKIP3) je nejmladším členem rodiny molekul Tribbles, které jsou savčími homology *Drosophila Tribbles*. Jedná se o skupinu pseudokináz, tj. proteinů, které sice obsahují doménu podobnou serin/treoninové proteinkináze, ale chybí jim vazebné místo pro ATP (adenosintrifosfát) a katalytická rezidua. Proto Trb3 nereguluje expresi cílových genů přímo, ale prostřednictvím protein-proteinových interakcí s několika klíčovými proteinkinázami (např. Akt, Smad3) a transkripčními faktory (např. ATF4, CHOP a NF- κ B). Tímto mechanismem je zapojen do regulace zásadních biologických procesů, jako jsou buněčná smrt a diferenciací, zánět a degradace proteinů, glukózový a lipidový metabolismus a diferenciací adipocytů (Ord T, Ord T 2017). Velká pozornost byla věnována Trb3 u nádorových onemocnění. Zvýšená exprese Trb3 byla nalezena u pacientů s kolorektálním karcinomem a jeho exprese korelovala s celkovou špatnou prognózou (Miyoshi N et al. 2009). Exprese Trb3 na mRNA úrovni (na rozdíl od proteinové úrovně) korelovala se špatnou prognózou u pacientů s karcinomem prsu a s nemalobuněčným karcinomem plic (Wennemers M et al. 2011; Zhou H et al. 2013). Další práce dokumentovala, že zvýšená exprese Trb3 potencuje angiogenezi u pacientů s karcinomem žaludku (Dong S et al. 2016). Recentnější práce demonstrovaly zvýšenou expresi Trb3 u renální a kardiální fibrózy u zvířecích experimentálních modelů diabetu 2. typu. U potkaního modelu s diabetickou kardiomyopatií bylo prokázáno, že inhibice Trb3 vedla k potlačení zánětu a kardiální fibrózy prostřednictvím úpravy úrovně fosforylace Akt a snížením fosforylace ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) (Ti Y et al. 2011). V podobné práci u inzulín-rezistentních potkanů byla detekována zvýšená exprese Trb3 a jeho utlumení pomocí siRNA redukovalo renální fibrózu současně se sníženou fosforylací ERK (Ding WY et al. 2014). Zvýšená exprese Trb3 byla rovněž nalezena v chondrocytech pacientů s osteoartrózou a vedla k utlumení fosforylace Akt a ke snížení přežívání chondrocytů a redukci syntézy proteoglykanů (Cravero JD et al. 2009).

1.2.4. Interleukin (IL)-35

Interleukin (IL)-35 je nejnovějším členem cytokinové rodiny IL-12, kam dále spadá IL-12, IL-23 a IL-27. Jedná se o heterodimery, které jsou produkovány antigen prezentujícími buňkami a tvořeny vzájemně sdílenými řetězci alfa (p19/IL-23a, p28/IL-27 a p35/IL-12a) a

beta (p40/IL-12b a EBI3/IL-27b) (Collison LW, Vignali DA 2008). IL-35 je tvořen konsistentně exprimovaným řetězcem alfa (p35/IL-12a) a inducibilním řetězcem beta (EBI3/IL-27b), který je selektivně exprimován. IL-35 se váže na receptor, jenž má dvě podjednotky, IL12Rb2 (součást receptoru pro IL-12) a gp130 (součást receptoru pro IL-27), a následně dochází k aktivaci signální dráhy STAT1 a STAT4 (Collison LW et al. 2012). Je důležité zde zmínit, že naše dřívější práce již popsala potentní profibrotické účinky transkripčního faktoru STAT4 prostřednictvím aktivace a proliferace T lymfocytů u experimentálních myších modelů SSc, konkrétně kožní fibrózy (Avouac J et al. 2011). Dřívější práce demonstrovaly zvýšenou expresi IL-35 u různých nádorových onemocnění (např. nemalobuněčný karcinom plic, ductální adenokarcinom pankreatu a kolorektální karcinom). IL-35 zde byl popsán jako mediátor nádorové progresy a biomarker progresy a špatné prognózy (Zeng JC et al. 2013; Gu X et al. 2014; Jin P et al. 2014). Recentnější studie popsaly jeho kontroverzní roli u zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Na rozdíl od ostatních členů rodiny IL-12, které se řadí mezi imunostimulační cytokiny, patří IL-35 dle většiny prací spíše mezi imunosupresivní cytokiny. Několik prací mu připsalo protizánětlivé účinky prostřednictvím indukce T-regulačních lymfocytů, regulačních B lymfocytů a potlačení proliferace a funkce efektorových T lymfocytů a produkce prozánětlivých cytokinů (např. u experimentálních modelů nespecifických střevních zánětů (IBD) a u kolagenem indukované artritidy, RA, SLE) (Collison LW et al. 2007; Niedbala W et al. 2007; Collison LW et al. 2010; Kochetkova I et al. 2010; Ouyang H et al. 2014; Wang RX et al. 2014). Novější práce demonstrovaly spíše jeho prozánětlivou roli u některých zánětlivých revmatických onemocnění (např. u Lymeské artritidy, RA, IZM - nepublikovaná data) (Kuo J et al. 2011; Thiolat A et al. 2014; Filkova M et al. 2015; Senolt L et al. 2015).

1.2.5. Adiponectin

Adiponectin (znám taky jako Acrp30, AdipoQ, GBP28 nebo apM1) je členem rodiny adipocytokinů a je řazen do tzv. C1q-TNF superrodiny. Jeho struktura sdílí podobnosti s kolageny typu VIII a X, komplementárním faktorem C1q a vykazuje rovněž silnou homologii s TNF α (Shapiro L, Scherer PE 1998). Adiponectin působí přes své membránové receptory AdipoR1, AdipoR2 a T-cadherin, které aktivují početné signální dráhy. Ty následně zvyšují oxidaci mastných kyselin ve svalech a redukují syntézu glukózy v játrech, snižují plazmatickou hladinu glukózy, triacylglycerolů a volných mastných kyselin (Haluzik M 2005). Na tvorbě adiponectinu se v lidském organismu kromě adipocytů podílejí zánětlivé buňky, zejména buňky monocyto-makrofágové linie. Adiponectinu se přisuzují spíše

protektivní vlastnosti, je snížen u obézních jedinců, zlepšuje inzulínovou senzitivitu a tlumí proces aterosklerózy (Koerner A et al. 2005). Vztah adiponektinu k nádorovým onemocněním byl bohatě zkoumán a přesahuje rámec tohoto přehledu. Na základě výsledků recentní metaanalýzy však lze zobecnit, že u většiny nádorových onemocnění můžeme detekovat nižší cirkulující koncentrace adiponektinu než u kontrolních zdravých jedinců (Wei T et al. 2016). Adiponectin má kromě vztahu k metabolismu význam i při aktivaci zánětu a imunitní odpovědi, ovlivňuje vrozený i získaný imunitní systém, tlumí fagocytární schopnost makrofágů a snižuje expresi prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF α (Tilg H, Moschen AR 2006). U zánětlivých revmatických onemocnění se adiponektinu přisuzuje spíše prozánětlivý účinek. Zvýšené cirkulující koncentrace i lokální exprese a prozánětlivé vlastnosti adiponektinu byly demonstrovány v četných studiích zejména u RA, OA a SLE (Abella V et al. 2014). Další výzkumné skupiny popsaly potentní antifibrotické účinky adiponektinu v experimentálních modelech tkáňové fibrózy. Několik prací prokázalo, že adiponectin tlumí proliferaci hepatálních stellátových buněk a jaterní fibrózu (Adachi M, Brenner DA 2008; Caligiuri A et al. 2008). Jiné skupiny demonstrovaly, že adiponectin zabránil hypertrofii kardiomyocytů a rozvoji myokardiální fibrózy (Shibata R et al. 2004; Essick EE et al. 2011).

1.3. Literatura

Abella V, Scotecce M, Conde J, Lopez V, Lazzaro V, Pino J, et al. Adipokines, metabolic syndrome and rheumatic diseases. *J Immunol Res*. 2014;2014:343746.

Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol*. 2005;26(11):587-595.

Abu-Elsaad NM, Serrya MS, El-Karef AM, Ibrahim TM. The heat shock protein 90 inhibitor, 17-AAG, attenuates thioacetamide induced liver fibrosis in mice. *Pharmacol Rep*. 2016;68(2):275-282.

Adachi M, Brenner DA. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology*. 2008;47(2):677-685.

Arakawa H, Jinnin M, Muchemwa FC, Makino T, Kajihara I, Makino K, et al. Adiponectin expression is decreased in the involved skin and sera of diffuse cutaneous scleroderma patients. *Exp Dermatol*. 2011;20(9):764-766.

Artlett CM. Immunology of systemic sclerosis. *Front Biosci*. 2005;10:1707-1719.

Asami Y, Yoshioka K, Nishina K, Nagata T, Yokota T. Drug delivery system of therapeutic oligonucleotides. *Drug Discov Ther*. 2016;10(5):256-262.

Avouac J, Furnrohr BG, Tomcik M, Palumbo K, Zerr P, Horn A, et al. Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(3):800-809.

Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354(25):2667-2676.

Bruni C, Praino E, Allanore Y, Distler O, Gabrielli A, Iannone F, et al. Use of biologics and other novel therapies for the treatment of systemic sclerosis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017;13(5):469-482.

Buchner J. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* 1996;10(1):10-19.

Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(3):164-172.

Caligiuri A, Bertolani C, Guerra CT, Aleffi S, Galastri S, Trappoliere M, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase modulates the activated phenotype of hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2008;47(2):668-676.

Cerezo LA, Kuncova K, Mann H, Tomcik M, Zamecnik J, Lukanidin E, et al. The metastasis promoting protein S100A4 is increased in idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50(10):1766-1772.

Collison LW, Delgoffe GM, Guy CS, Vignali KM, Chaturvedi V, Fairweather D, et al. The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol.* 2012;13(3):290-299.

Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol.* 2010;11(12):1093-1101.

Collison LW, Vignali DA. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol Rev.* 2008;226:248-262.

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007;450(7169):566-569.

Cravero JD, Carlson CS, Im HJ, Yammani RR, Long D, Loeser RF. Increased expression of the Akt/PKB inhibitor TRB3 in osteoarthritic chondrocytes inhibits insulin-like growth factor 1-mediated cell survival and proteoglycan synthesis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(2):492-500.

Czirjak L, Kumanovics G, Varju C, Nagy Z, Pakozdi A, Szekanecz Z, et al. Survival and causes of death in 366 Hungarian patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(1):59-63.

Dantas AT, Goncalves SM, Pereira MC, Goncalves RS, Marques CD, Rego MJ, et al. Increased IL-35 serum levels in systemic sclerosis and association with pulmonary interstitial involvement. *Clin Rheumatol.* 2015;34(9):1621-1625.

De Paepe B, Creus KK, Martin JJ, Weis J, De Bleecker JL. A dual role for HSP90 and HSP70 in the inflammatory myopathies: from muscle fiber protection to active invasion by macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1173:463-469.

De Paepe B, De Bleecker JL. The nonnecrotic invaded muscle fibers of polymyositis and sporadic inclusion body myositis: on the interplay of chemokines and stress proteins. *Neurosci Lett.* 2013;535:18-23.

Ding WY, Li WB, Ti Y, Bi XP, Sun H, Wang ZH, et al. Protection from renal fibrosis, putative role of TRIB3 gene silencing. *Exp Mol Pathol.* 2014;96(1):80-84.

Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(7):637-668.

Dong S, Xia J, Wang H, Sun L, Wu Z, Bin J, et al. Overexpression of TRIB3 promotes angiogenesis in human gastric cancer. *Oncol Rep.* 2016;36(4):2339-2348.

Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, Afanasyeva A, Senin V, Revazova E, et al. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev.* 1989;3(7):1086-1093.

Essick EE, Ouchi N, Wilson RM, Ohashi K, Ghobrial J, Shibata R, et al. Adiponectin mediates cardioprotection in oxidative stress-induced cardiac myocyte remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(3):H984-993.

Fang F, Liu L, Yang Y, Tamaki Z, Wei J, Marangoni RG, et al. The adipokine adiponectin has potent anti-fibrotic effects mediated via adenosine monophosphate-activated protein kinase: novel target for fibrosis therapy. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(5):R229.

Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Jr., Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003;48(7):1956-1963.

Filkova M, Vernerova Z, Hulejova H, Prajzlerova K, Veigl D, Pavelka K, et al. Pro-inflammatory effects of interleukin-35 in rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2015;73(1):36-43.

Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Mechanisms of Disease: Scleroderma. *New England Journal of Medicine.* 2009;360(19):1989-2003.

Garcia R, Merino D, Gomez JM, Nistal JF, Hurle MA, Cortajarena AL, et al. Extracellular heat shock protein 90 binding to TGFbeta receptor I participates in TGFbeta-mediated collagen production in myocardial fibroblasts. *Cell Signal.* 2016;28(10):1563-1579.

Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Beck M, Bonefeld CM, Hamerlik P, Guldborg P, et al. S100A4-neutralizing antibody suppresses spontaneous tumor progression, pre-metastatic niche formation and alters T-cell polarization balance. *BMC Cancer.* 2015;15:44.

Gu X, Tian T, Zhang B, Liu Y, Yuan C, Shao L, et al. Elevated plasma interleukin-35 levels predict poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Tumour Biol.* 2014.

- Guan SY, Leng RX, Khan MI, Qureshi H, Li XP, Ye DQ, et al. Interleukin-35: a Potential Therapeutic Agent for Autoimmune Diseases. *Inflammation*. 2017;40(1):303-310.
- Haluzik M. Adiponectin and its potential in the treatment of obesity, diabetes and insulin resistance. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005;6(10):988-993.
- Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 1996;381(6583):571-579.
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem*. 2000;275(51):40096-40105.
- Chakravarty EF, Martyanov V, Fiorentino D, Wood TA, Haddon DJ, Jarrell JA, et al. Gene expression changes reflect clinical response in a placebo-controlled randomized trial of abatacept in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:159.
- Jin P, Ren H, Sun W, Xin W, Zhang H, Hao J. Circulating IL-35 in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Hum Immunol*. 2014;75(1):29-33.
- Jordan S, Distler JH, Maurer B, Huscher D, van Laar JM, Allanore Y, et al. Effects and safety of rituximab in systemic sclerosis: an analysis from the European Scleroderma Trial and Research (EUSTAR) group. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(6):1188-1194.
- Kahaleh MB, Sherer GK, LeRoy EC. Endothelial injury in scleroderma. *J Exp Med*. 1979;149(6):1326-1335.
- Khanna D, Denton CP, Jahreis A, van Laar JM, Frech TM, Anderson ME, et al. Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in adults with systemic sclerosis (faSScinate): a phase 2, randomised, controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10038):2630-2640.
- Klingelhofer J, Senolt L, Baslund B, Nielsen GH, Skibshoj I, Pavelka K, et al. Up-regulation of metastasis-promoting S100A4 (Mts-1) in rheumatoid arthritis: putative involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(3):779-789.
- Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005;19(4):525-546.
- Koga F, Xu W, Karpova TS, McNally JG, Baron R, Neckers L. Hsp90 inhibition transiently activates Src kinase and promotes Src-dependent Akt and Erk activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(30):11318-11322.
- Kochetkova I, Golden S, Holderness K, Callis G, Pascual DW. IL-35 stimulation of CD39+ regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10. *J Immunol*. 2010;184(12):7144-7153.
- Komura K, Fujimoto M, Hasegawa M, Ogawa F, Hara T, Muroi E, et al. Increased serum interleukin 23 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2008;35(1):120-125.

Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y, et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2016. (Epub ahead of print)

Krieg T, Abraham D, Lafyatis R. Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 2:S4.

Kuo J, Nardelli DT, Warner TF, Callister SM, Schell RF. Interleukin-35 enhances Lyme arthritis in *Borrelia*-vaccinated and -infected mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(7):1125-1132.

Lakota K, Wei J, Carns M, Hinchcliff M, Lee J, Whitfield ML, et al. Levels of adiponectin, a marker for PPAR-gamma activity, correlate with skin fibrosis in systemic sclerosis: potential utility as biomarker? *Arthritis Res Ther*. 2012;14(3):R102.

Lawson WE, Polosukhin VV, Zoia O, Stathopoulos GT, Han W, Plieth D, et al. Characterization of fibroblast-specific protein 1 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(8):899-907.

Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 23):4803-4810.

LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest*. 1974;54(4):880-889.

LeRoy EC, Medsger TA, Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2001;28(7):1573-1576.

Massague J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett*. 2006;580(12):2811-2820.

Masui Y, Asano Y, Shibata S, Noda S, Aozasa N, Akamata K, et al. Serum adiponectin levels inversely correlate with the activity of progressive skin sclerosis in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(3):354-360.

McQueen FM, Solanki K. Rituximab in diffuse cutaneous systemic sclerosis: should we be using it today? *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(5):757-767.

Mishra SK, Siddique HR, Saleem M. S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor progression and metastasis: preclinical and clinical evidence. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(1-2):163-172.

Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Takatsuno Y, Kim H, Hirose H, et al. Abnormal expression of TRIB3 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis. *Br J Cancer*. 2009;101(10):1664-1670.

Mora GF. Systemic sclerosis: environmental factors. *J Rheumatol*. 2009;36(11):2383-2396.

Nagaraja V, Denton CP, Khanna D. Old medications and new targeted therapies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(11):1944-1953.

- Naiya G, Kaypee S, Kundu TK, Roy S. A Constrained Helical Peptide Against S100A4 Inhibits Cell Motility in Tumor Cells. *Chem Biol Drug Des.* 2015;86(4):945-950.
- Namas R, Tashkin DP, Furst DE, Wilhalme H, Tseng CH, Roth MD, et al. Efficacy of mycophenolate mofetil and oral cyclophosphamide on skin thickness: Post-hoc analyses from the Scleroderma Lung Study I and II. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2017. (Epub ahead of print)
- Nardai G, Vegh EM, Prohaszka Z, Csermely P. Chaperone-related immune dysfunction: an emergent property of distorted chaperone networks. *Trends Immunol.* 2006;27(2):74-79.
- Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(11):3021-3029.
- Ord T, Ord T. Mammalian Pseudokinase TRIB3 in Normal Physiology and Disease: Charting the Progress in Old and New Avenues. *Curr Protein Pept Sci.* 2017. (Epub ahead of print)
- Ouyang H, Shi YB, Liu ZC, Wang Z, Feng S, Kong SM, et al. Decreased interleukin 35 and CD4+EBI3+ T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci.* 2014;348(2):156-161.
- Pannu J, Trojanowska M. Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16(6):739-745.
- Ruzehaji N, Frantz C, Ponsoye M, Avouac J, Pezet S, Guilbert T, et al. Pan PPAR agonist IVA337 is effective in prevention and treatment of experimental skin fibrosis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(12):2175-2183.
- Sack U, Walther W, Scudiero D, Selby M, Aumann J, Lemos C, et al. S100A4-induced cell motility and metastasis is restricted by the Wnt/beta-catenin pathway inhibitor calcimycin in colon cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2011;22(18):3344-3354.
- Sanges S, Riviere S, Mekinian A, Martin T, Le Quellec A, Chatelus E, et al. Intravenous immunoglobulins in systemic sclerosis: Data from a French nationwide cohort of 46 patients and review of the literature. *Autoimmun Rev.* 2017. (Epub ahead of print)
- Sato S, Hanakawa H, Hasegawa M, Nagaoka T, Hamaguchi Y, Nishijima C, et al. Levels of interleukin 12, a cytokine of type 1 helper T cells, are elevated in sera from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2000;27(12):2838-2842.
- Senolt L, Grigorian M, Lukanidin E, Simmen B, Michel BA, Pavelka K, et al. S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(12):1645-1648.
- Senolt L, Sumova B, Jandova R, Hulejova H, Mann H, Pavelka K, et al. Interleukin 35 Synovial Fluid Levels Are Associated with Disease Activity of Rheumatoid Arthritis. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132674.
- Shapiro L, Scherer PE. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol.* 1998;8(6):335-338.

- Shibata R, Ouchi N, Ito M, Kihara S, Shiojima I, Pimentel DR, et al. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med*. 2004;10(12):1384-1389.
- Shukla HD, Pitha PM. Role of hsp90 in systemic lupus erythematosus and its clinical relevance. *Autoimmune Dis*. 2012;2012:728605.
- Schneider M, Hansen JL, Sheikh SP. S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? *J Mol Med (Berl)*. 2008;86(5):507-522.
- Schneider M, Kostin S, Strom CC, Aplin M, Lyngbaek S, Theilade J, et al. S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2007;75(1):40-50.
- Sibinska Z, Tian X, Korfei M, Kojonazarov B, Kolb JS, Klepetko W, et al. Amplified canonical transforming growth factor-beta signalling via heat shock protein 90 in pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2017;49(2).
- Sontake V, Wang Y, Kasam RK, Sinner D, Reddy GB, Naren AP, et al. Hsp90 regulation of fibroblast activation in pulmonary fibrosis. *JCI Insight*. 2017;2(4):e91454.
- Stewart RL, Carpenter BL, West DS, Knifley T, Liu L, Wang C, et al. S100A4 drives non-small cell lung cancer invasion, associates with poor prognosis, and is effectively targeted by the FDA-approved anti-helminthic agent niclosamide. *Oncotarget*. 2016;7(23):34630-34642.
- Thiolat A, Denys A, Petit M, Biton J, Lemeiter D, Herve R, et al. Interleukin-35 gene therapy exacerbates experimental rheumatoid arthritis in mice. *Cytokine*. 2014;69(1):87-93.
- Ti Y, Xie GL, Wang ZH, Bi XL, Ding WY, Wang J, et al. TRB3 gene silencing alleviates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetic rat model. *Diabetes*. 2011;60(11):2963-2974.
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):772-783.
- Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airo P, Cozzi F, Carreira PE, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(10):1809-1815.
- Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest*. 2007;117(3):557-567.
- Volkman ER, Tashkin DP, Li N, Roth MD, Khanna D, Hoffmann-Vold AM, et al. Mycophenolate Mofetil Versus Placebo for Systemic Sclerosis-Related Interstitial Lung Disease: An Analysis of Scleroderma Lung Studies I and II. *Arthritis Rheumatol*. 2017. (Epub ahead of print)
- Wang RX, Yu CR, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev YV, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med*. 2014;20(6):633-641.
- Wei T, Ye P, Peng X, Wu LL, Yu GY. Circulating adiponectin levels in various malignancies: an updated meta-analysis of 107 studies. *Oncotarget*. 2016;7(30):48671-48691.

Wennemers M, Bussink J, Grebenchtchikov N, Sweep FC, Span PN. TRIB3 protein denotes a good prognosis in breast cancer patients and is associated with hypoxia sensitivity. *Radiother Oncol.* 2011;101(1):198-202.

Wrighton KH, Lin X, Feng XH. Critical regulation of TGFbeta signaling by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(27):9244-9249.

Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18(7):1028-1040.

Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Muroi E, et al. Elevated serum interleukin-27 levels in patients with systemic sclerosis: association with T cell, B cell and fibroblast activation. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(1):194-200.

Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007;13(8):952-961.

Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med.* 2003;9(7):964-968.

Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2007;282(32):23337-23347.

Zeng JC, Zhang Z, Li TY, Liang YF, Wang HM, Bao JJ, et al. Assessing the role of IL-35 in colorectal cancer progression and prognosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(9):1806-1816.

Zhou H, Luo Y, Chen JH, Hu J, Luo YZ, Wang W, et al. Knockdown of TRB3 induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through regulation of Notch 1 expression. *Mol Med Rep.* 2013;8(1):47-52.

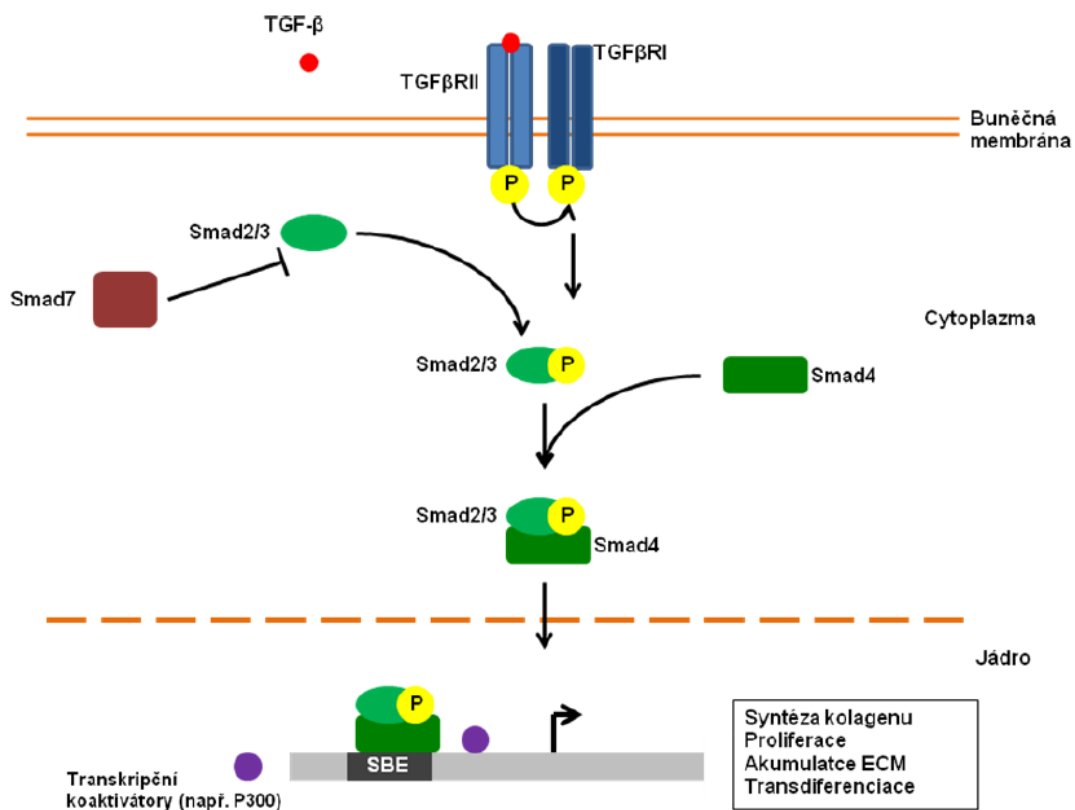
1.4. Přílohy

Obr. 1

Smad-dependentní TGF- β signální kaskáda (upraveno podle Varga J, Abraham D 2007).

Po navázání aktivního TGF- β na TGF- β receptor II. typu dochází k heterodimerizaci a aktivaci transmembránové serin-treoninové kinázy TGF- β receptoru I. typu, která fosforyluje v cytoplazmě přítomné proteiny Smad2 a Smad3. Ty tvoří komplex se Smad4, který je translokován do jádra fibroblastu, váže se na Smad Binding Element-sekvenci DNA a společně s transkripčními faktory a kofaktory (např. P300) reguluje expresi cílových genů (hlavně komponent ECM).

Vysvětlivky: TGF- β , transforming growth factor beta; TGF β RII, transforming growth factor beta type II receptor; TGF β RI, transforming growth factor beta type I receptor; SBE, Smad Binding Element; p300, E1A binding protein p300; ECM, extracelulární matrix

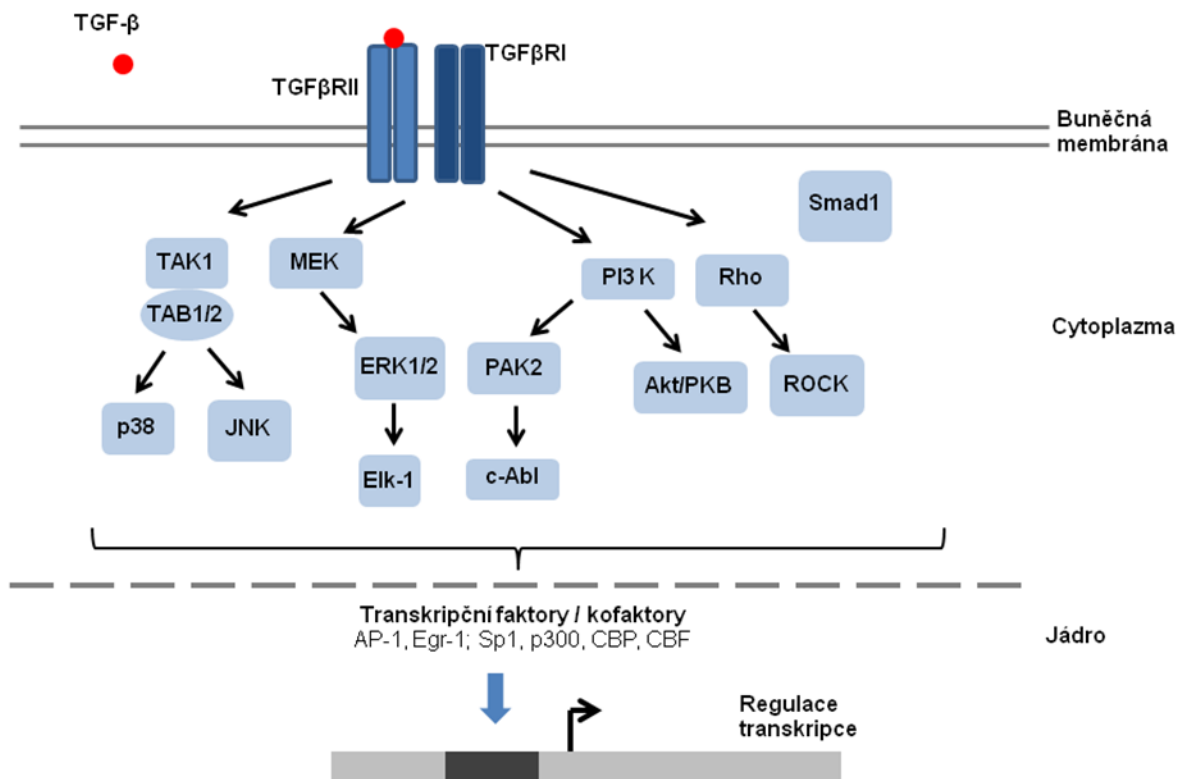


Obr. 2

Smad-nedependentní TGF- β signální kaskáda (upraveno podle Varga J, Abraham D 2007).

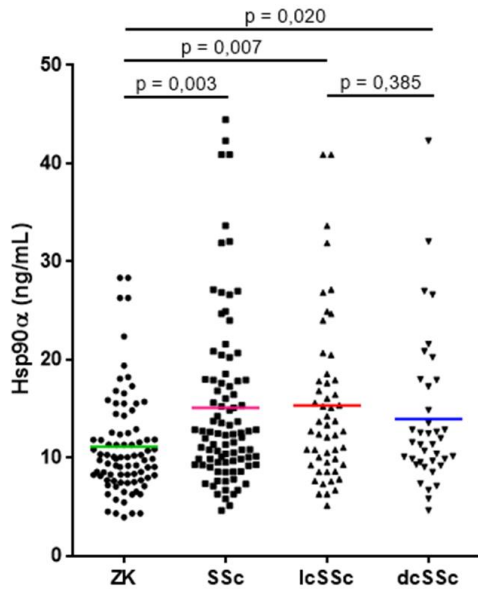
Po navázání aktivního TGF- β na TGF- β receptor II. typu dochází k heterodimerizaci a aktivaci transmembránové serin-treoninové kinázy TGF- β receptoru I. typu, která fosforyluje v cytoplazmě přítomné četné kaskády kináz, které společně s transkripčními faktory a kofaktory regulují expresi cílových genů (hlavně složek ECM) v jádře fibroblastu. Tyto signální cesty mohou interagovat se Smad-dependentní signální kaskádou i působit zcela nezávisle.

Vysvětlivky: TGF- β , transforming growth factor beta; TGF β RII, transforming growth factor beta type II receptor; TGF β RI, transforming growth factor beta type I receptor; TAK1, TGF- β activated kinase 1; TAB1/2, TAK1-binding protein 1/2; p38, p38 a JNK (c-Jun N-terminal kinase) jsou MAPKs (mitogen-activated protein kinases); MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; ERK1/2, extracellular-signal-regulated kinases; Elk-1, E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1; PI3K, fosfatidylinositol 3-kinases; PAK2, p21-activated kinase 2; c-Abl, cytoplasm-Abelson tyrosine kinase; Akt/PKB, protein kinase B; ROCK, Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1; AP-1, acivator protein 1; EGR-1, early growth response 1; SP1, specificity protein 1; p300, E1A binding protein p300; CBP, CREB-binding protein; CBF, Core binding factor



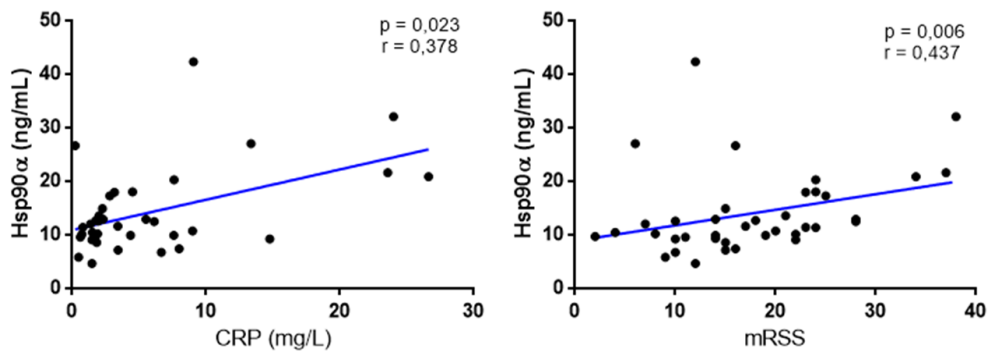
Obr.3

Koncentrace Hsp90 v plazmě zdravých jedinců (ZK, n=85), pacientů se systémovou sklerodermií (SSc, n=92), s kožně limitovanou formou (lcSSc, n=54) a s kožně difúzní formou SSc (dcSSc, n=38).



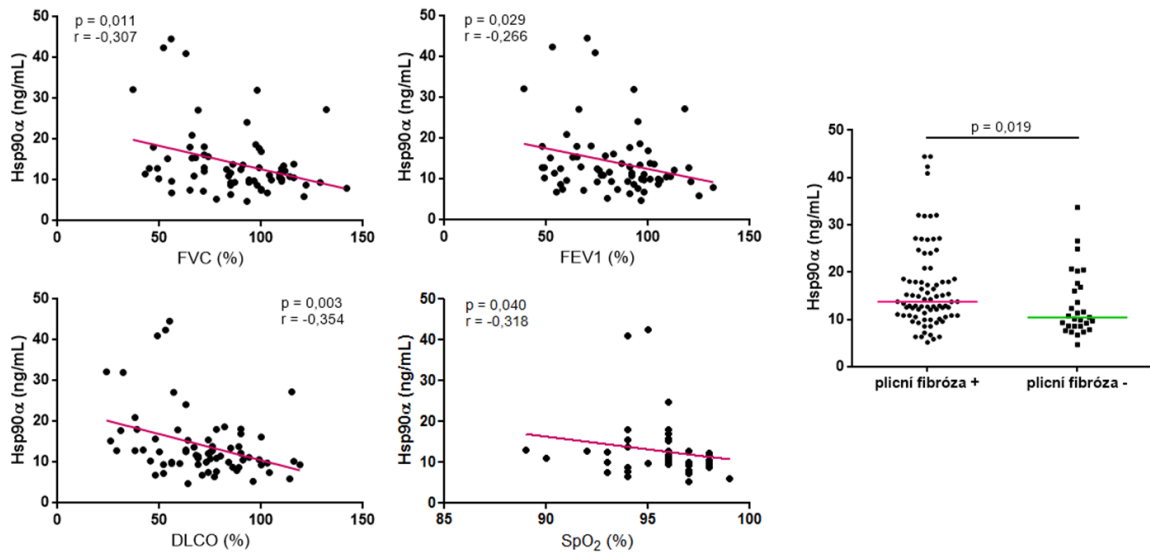
Obr. 4

Pozitivní korelace plazmatického Hsp90 s C-reaktivním proteinem (CRP) a s rozsahem a závažností kožního postižení (hodnoceno dle modifikovaného Rodnanova kožního skóre, mRSS) u pacientů s kožně difúzní formou SSc (dcSSc).



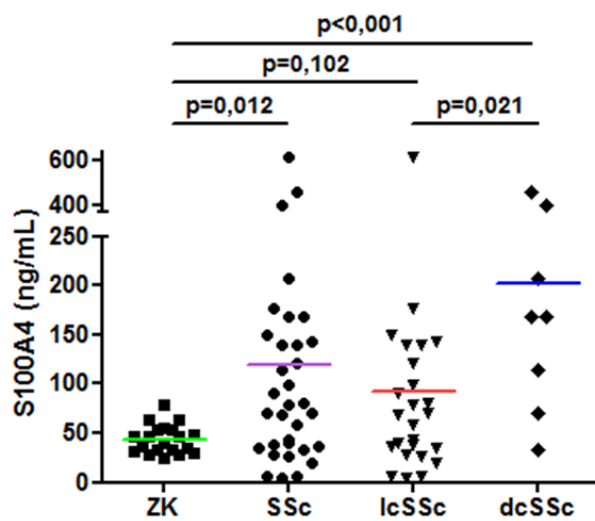
Obr. 5

Negativní korelace plazmatického Hsp90 s hodnotami plicních funkčních testů (FVC, FEV1, DLCO, SpO₂) a zvýšené koncentrace Hsp90 u pacientů se SSc s intersticiální plicní fibrózou.



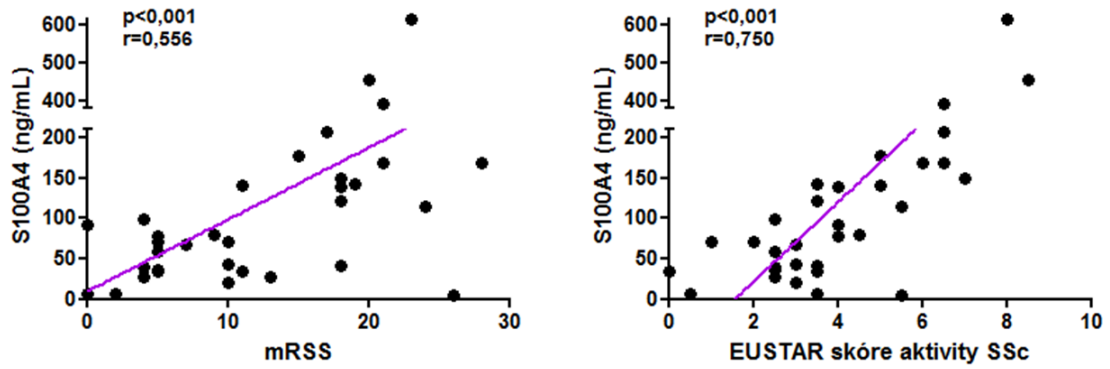
Obr. 6

Koncentrace S100A4 v séru zdravých jedinců (ZK, n=20), pacientů se systémovou sklerodermií (SSc, n=33), s kožně limitovanou formou (lcSSc, n=25) a s kožně difúzní formou SSc (dcSSc, n=8).



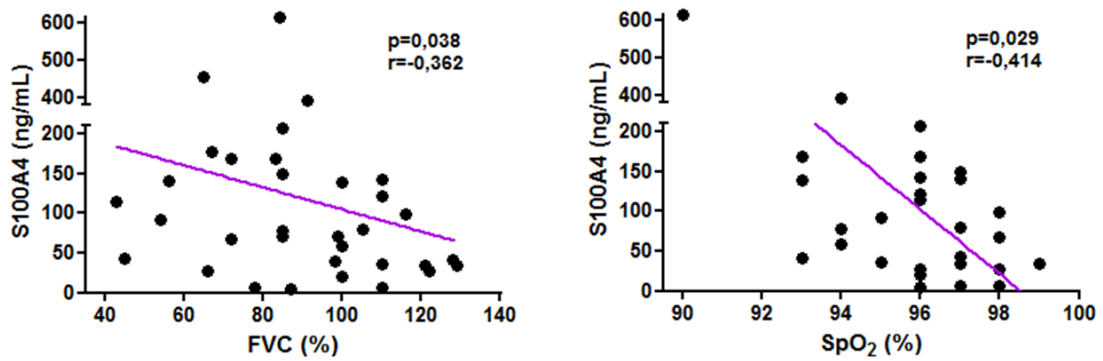
Obr. 7

Pozitivní korelace sérového S100A4 s rozsahem a závažností kožního postižení (hodnoceno dle modifikovaného Rodnanova kožního skóre, mRSS) a s aktivitou nemoci (hodnoceno pomocí EUSTAR skóre aktivity SSc).



Obr. 8

Negativní korelace sérového S100A4 s hodnotami plicních funkčních testů (FVC, SpO₂).



2. HYPOTÉZA

Hypotéza habilitační práce je rozdělena podle studovaných témat na pět hlavních částí. První část se opírá o studie zabývající se výzkumem Hsp90 u nádorových, zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Hsp90 je považován za molekulu regulující angiogenezi, invazivní růst, apoptózu a tvorbu metastáz u nádorových onemocnění a zánět u některých autoimunitních revmatických onemocnění. Druhá část hypotézy této práce vychází z prací zkoumajících roli S100A4 v progresi nádorového bujení a tvorbě nebo šíření metastáz u nádorových onemocnění, prozánětlivou roli u některých autoimunitních revmatických onemocnění a roli mediátora experimentální tkáňové fibrózy. Ve třetí části vychází hypotéza ze studií zabývajících se významem Trb3 jako regulátora buněčné proliferace, diferenciace, apoptózy a metabolismu kolagenu. Čtvrtá část hypotézy vychází z prací zkoumajících význam IL-35 jako mediátora nádorové progresy a prací, které mu připisují buď prozánětlivou nebo protizánětlivou roli u experimentálních modelů některých autoimunitních revmatických onemocnění. Poslední pátá část hypotézy se opírá o studie prokazující roli adiponectinu jako prozánětlivého mediátoru u zánětlivých revmatických onemocnění a antifibrotickou molekulu v experimentálních modelech tkáňové fibrózy.

Předpokládali jsme proto, že vybrané molekuly by mohly mít vztah k patogenezi a k aktivitě systémové sklerodermie, vzácného revmatického autoimunitního onemocnění, u kterého má dominantní roli vaskulopatie, aktivace imunitního systému, zánět a fibróza.

3. CÍLE PRÁCE

Cílem této habilitační práce je objasnit význam vybraných molekul (Hsp90, S100A4, Trb3, IL-35 a adiponectinu) u systémové sklerodermie.

Specifické cíle:

- A. Zjistit expresi těchto molekul v kůži a izolovaných dermálních fibroblastech od pacientů se systémovou sklerodermií a od kontrolních zdravých jedinců.
- B. Zjistit roli těchto molekul při aktivaci dermálních fibroblastů produkujících nadbytečné množství složek extracelulární matrix vedoucí ke tkáňové fibróze.
- C. Zhodnotit antifibrotický potenciál inhibice vybraných molekul pomocí in vitro experimentů.
- D. Potvrdit antifibrotické účinky utlumení vybraných molekul in vivo pomocí experimentálních myších modelů systémové sklerodermie.

- E. Analyzovat extracelulární koncentrace vybraných molekul v periferní krvi pacientů se systémovou sklerodermií a zdravých jedinců a hodnotit jejich vztah k aktivitě nemoci, k orgánovému poškození a k léčbě.

4. KOMENTÁŘE K PUBLIKACÍM ZAŘAZENÝM DO HABILITAČNÍ PRÁCE

Komentáře k jednotlivým publikacím jsou pro přehlednost rozděleny do jednotlivých tematických okruhů podle studované problematiky.

Tematické okruhy:

- 4.1. Význam experimentálních zvířecích modelů při studiu patogeneze systémové sklerodermie
- 4.2. Význam proteinu tepelného šoku 90 (Hsp90) v patogenezi systémové sklerodermie
- 4.3. Význam S100A4 v patogenezi systémové sklerodermie
- 4.4. Význam Tribbles homologue 3 (Trb3) v patogenezi systémové sklerodermie
- 4.5. Význam interleukinu (IL)-35 u pacientů se systémovou sklerodermií
- 4.6. Význam adiponectinu u pacientů se systémovou sklerodermií

4.1. Význam experimentálních zvířecích modelů při studiu patogeneze systémové sklerodermie

Souhrn:

Etiologie SSc je stále neobjasněna, přestože jsou již delší dobu známé asociace mezi některými vnějšími vlivy (např. sloučeniny křemíku, organická rozpouštědla) a rozvojem SSc. Možnost bioptického odebrání vzorků postižené tkáně, hlavně pomocí kožní biopsie, přispěla velkou mírou k objasnění patogeneze tohoto onemocnění. Materiál z kožních biopsií umožnil zhodnocení charakteristických histopatologických nálezů, analýzu genové a proteinové exprese, epigenetických modifikací a signálních drah zkoumaných molekul. Potenciální význam těchto kandidátních molekul musí však být vždy nejprve testován a následně potvrzen, než dojde k jejich léčebnému využití u SSc. Pro tyto účely lze použít in vitro experimenty na tkáňových anebo buněčných kulturách izolovaných z bioptovaných tkání pacientů se SSc a zdravých jedinců anebo in vivo experimenty za pomoci zvířecích experimentálních modelů SSc. V současnosti existuje celá řada zvířecích modelů SSc, nicméně žádný z nich nenapodobuje kompletní rozsah patologických procesů a klinických manifestací SSc. Experimentální zvířecí modely pomáhají objasnit určité patologické mechanismy a napodobují jen určité aspekty SSc. Každý model má však své výhody i nevýhody. Výběr vhodných zvířecích modelů musí být tedy pro analýzu cílových genů a kandidátních molekul terapie předem důkladně zváženo. V budoucnu může vést kombinace genetických a indukčních strategií k vytvoření experimentálních modelů, které přesněji a do větší míry napodobí SSc u lidí a mohou tak vést k objasnění podstatných patomechanizmů a v ideálním případě i k objevení univerzální účinné terapie SSc. Stávající modely však již nyní významně přispěly k preklinickému testování několika dostupných biologických preparátů (např. inhibitory TNF- α , IL-6, CD20) a malých molekul (např. imatinib mesylát, riociguat), z nichž některé dosáhly slibných výsledků v prvních klinických hodnoceních a mohly by přinést lepší vyhlídky pacientům s touto dosud neléčitelnou nemocí.

Seznam publikací k tématu:

1. STORKANOVA, Hana, Michal TOMCIK. Animal models of systemic sclerosis. In: RADIC, Mislav. *Systemic sclerosis*. Split: InTech, 2017. ISBN 978-953-51-5045-9. (kapitola přijata k tisku do monografie v angličtině v lednu 2017)

4.2. Význam proteinu tepelného šoku 90 (Hsp90) v patogenezi systémové sklerodermie

Souhrn výsledků:

Předchozí práce prokázaly, že chaperon Hsp90 je nezbytný pro stabilizaci mnoha receptorů, protein-kináz a transkripčních faktorů, které regulují řadu biologických procesů důležitých pro růst a přežití nádorových buněk, ale i pro regulaci tkáňové fibrózy (jako např. TGF- β receptor a Src kinázy). Recentnější práce demonstrovaly, že se Hsp90 podílí i na prezentaci antigenu a aktivaci vrozené imunitní odpovědi. Zvýšená exprese Hsp90 byla popsána u některých revmatických onemocnění, např. v PBMC pacientů s vyšší aktivitou SLE a ve svalové tkáni a v plazmě pacientů s IZM (naše nepublikovaná data). Naše práce měla za cíl prozkoumat roli Hsp90 u SSc pomocí analýzy exprese Hsp90 v kůži a dermálních fibroblastech od pacientů se SSc a od zdravých kontrol a v experimentálně navozené fibrotické kůži myších modelů SSc. Dalším cílem bylo zhodnotit antifibrotické účinky inhibitoru Hsp90 (17-DMAG, alvespimycinu) pomocí in vitro a in vivo experimentů. Poprvé jsme prokázali zvýšenou expresi Hsp90 na mRNA i proteinové úrovni jak v postižené dermis pacientů se SSc, tak i ve fibroblastech z ní izolovaných, tak i v experimentálně navozené fibrotické kůži 3 různých myších modelů SSc. Demonstrovali jsme, že inhibice Hsp90 pomocí 17-DMAG účinně tlumí stimulační efekt hlavního profibrotického cytokinu TGF- β a brání aktivaci fibroblastů a produkci kolagenu. Antifibrotické účinky inhibice Hsp90 z in vitro experimentů jsme následně potvrdili in vivo na třech různých experimentálních myších modelech SSc (i. AdTBR model s aktivovanou signální dráhou TGF- β ; ii. bleomycinem indukovaná kožní fibróza, iii. Tight skin-1 (Tsk-1) model), které napodobují různé aspekty patogeneze SSc u lidí: výraznou aktivaci profibrotické signální dráhy (i), časnou zánětlivou fázi (ii) a pozdnější fibrotickou fázi nezávislou na zánětu (iii). Na základě výsledků naší studie jsme se rozhodli zhodnotit roli Hsp90 coby potenciálního biomarkeru SSc, stanovit jeho koncentrace v plazmě pacientů se SSc a zdravých jedinců se srovnatelným věkem a pohlavím a zanalyzovat asociace naměřených hodnot s klinickými parametry a s aktivitou nemoci (nepublikovaná data). Nalezli jsme zvýšené plazmatické koncentrace Hsp90 u pacientů se SSc (obr. 3), zejména u pacientů s vyšší zánětlivou aktivitou a s větším rozsahem a závažností kožního postižení (obr. 4), ale i u pacientů s výraznějším intersticiálním plicním postižením (obr. 5). V současnosti probíhá analýza plazmatického Hsp90 u pacientů se SSc s intersticiálním plicním postižením léčených intravenózními pulzy cyklofosfamidu (nepublikovaná data). Práce jiných výzkumných skupin z posledních 3 let potvrdily

profibrotickou roli Hsp90 i u dalších tkáňových fibróz – např. u idiopatické plicní fibrózy (Sibinska Z et al. 2017; Sontake V et al. 2017), myokardiální fibrózy (Garcia R et al. 2016) a jaterní fibrózy (Abu-Elsaad NM et al. 2016). Vzhledem k pokrokům ve vývoji nových tříd a syntetických malých molekulových inhibitorů Hsp90 s vyšší účinností a nižší toxicitou používaných v 11 probíhajících studiích a desítkách již ukončených klinických hodnocení u solidních tumorů a v hematologických indikacích (www.clinicaltrials.gov) by mohly naše výsledky přispět k zahájení klinické studie s inhibitorem Hsp90 i u některého z fibrotických onemocnění, konkrétně i SSc.

Seznam publikací k tématu:

2. Tomcik M, Zerr P, Pitkowski J, Palumbo-Zerr K, Avouac J, Distler O, Becvar R, Senolt L, Schett G, Distler JH. Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition targets canonical TGF- β signalling to prevent fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2014 Jun;73(6):1215-22.

Publikace o roli Hsp90 jako nového potenciálního biomarkeru u systémové sklerodermie je ve stadiu přípravy.

4.3. Význam S100A4 v patogenezi systémové sklerodermie

Souhrn výsledků:

Četné dřívější práce prokázaly zvýšenou expresi S100A4 u různých nádorových onemocnění a přímou souvislost s frekvencí tvorby metastáz a se zvýšenou mortalitou. Mezi popsané mechanismy metastatické progresy indukované proteinem S100A4 patří regulace buněčné motility, invaze, adheze, angiogeneze, buněčné smrti a epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT). V poslední dekádě se objevilo mnoho prací, které dávají S100A4 do souvislosti s četnými nenádorovými onemocněními, např. fibrózou plic, jater, retroperitonea a ledvin, hypertrofií a fibrózou myokardu, psoriázou, ale i se zánětlivými revmatickými onemocněními jako RA a IZM. Jejich společným jmenovatelem jsou fibróza a zánět, tj. procesy závislé na remodelaci tkání, buněčné motilitě a EMT. Cílem naší studie bylo prozkoumat roli S100A4 při patologické aktivaci fibroblastů u SSc a v modelech experimentální kožní fibrózy. Poprvé jsme demonstrovali zvýšenou expresi S100A4 v kůži pacientů se SSc, v SSc fibroblastech i v myších modelech experimentální kožní fibrózy způsobem závislým na TGF- β / Smad signální dráze. Endogenní zvýšení exprese S100A4 (pomocí plasmidu) anebo exogenní stimulace (pomocí rekombinantního S100A4 proteinu) indukovaly v klidových normálních fibroblastech aktivovaný fenotyp a produkci kolagenu. Snížení exprese S100A4 (pomocí

siRNA) nebo jeho kompletní deficit (ve fibroblastech z knock-out myši) naopak utlumili profibrotické účinky TGF- β a potlačili tvorbu kolagenu. S100A4 knock-out myši byly uchráněny před rozvojem experimentální kožní fibrózy indukované bleomycinem (napodobující časnou zánětlivou fázi SSc) i u Tsk-1 myšního modelu (imitujícího pozdní fibrotickou fázi SSc nezávislou na zánětu). Antifibrotické účinky inaktivace S100A4 v obou experimentálních modelech byly zprostředkované inhibicí TGF- β / Smad signální kaskády. Dle výsledků naší práce jsme následně měli za cíl zhodnotit potenciální využití S100A4 jako biomarkeru SSc. Stanovili jsme jeho koncentrace v séru pacientů se SSc a zdravých jedinců se srovnatelným věkem a pohlavím a zhodnotili asociace naměřených hodnot s klinickými parametry a s aktivitou nemoci (nepublikovaná data). Nalezli jsme zvýšené sérové koncentrace S100A4 u pacientů se SSc (obr. 6), zejména u pacientů s vyšší aktivitou nemoci a s větším rozsahem a závažností kožního postižení (obr. 7), ale i u pacientů se zhoršenými funkčními parametry při výraznějším intersticiálním plicním postižení (obr. 8). V současnosti rovněž probíhá analýza sérového S100A4 u pacientů se SSc s intersticiálním plicním postižením léčených intravenózními pulzy cyklofosfamidu (nepublikovaná data). Vzhledem k tomu, že možnosti inhibice S100A4 jsou v posledních letech aktivně zkoumány na preklinické úrovni u nádorových onemocnění (např. anti-S100A4 monoklonální protilátky, anti-S100A4 peptidy, nespecifické inhibitory S100A4 – např. niclosamid, calcimycin) (Sack U et al. 2011; Grum-Schwensen B et al. 2015; Naiya G et al. 2015; Stewart RL et al. 2016) a hodnoceny i naší skupinou u experimentálního modelu RA (anti-S100A4 monoklonální protilátky - nepublikovaná data), mohl by se S100A4 protein stát kandidátní molekulou nové antifibrotické terapie.

Seznam publikací k tématu:

3. Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Zerr P, Avouac J, Dees C, Sumova B, Distler A, Beyer C, Cerezo LA, Becvar R, Distler O, Grigorian M, Schett G, Senolt L, Distler JH. S100A4 amplifies TGF- β -induced fibroblast activation in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2015 Sep;74(9):1748-55.

Publikace o roli S100A4 jako nového potenciálního biomarkeru u systémové sklerodermie je ve stadiu přípravy.

4.4. Význam Tribbles homologue 3 (Trb3) v patogenezi systémové sklerodermie

Souhrn výsledků:

Dřívější práce popsaly, že Trb3 je pseudokináza, která reguluje prostřednictvím protein-proteinových interakcí několik klíčových proteinkináz (např. Akt, Smad3) a transkripčních faktorů (např. ATF4, CHOP a NF- κ B), čímž reguluje zásadní biologické procesy jako buněčnou smrt a diferenciaci, zánět a degradaci proteinů. Zvýšená exprese Trb3 byla popsána u několika nádorových onemocnění, u kterých koreluje s horší prognózou. Novější studie demonstrovaly zvýšenou expresi Trb3 u renální a kardiální fibrózy u zvířecích experimentálních modelů diabetes mellitus. Zvýšená exprese Trb3 byla rovněž nalezena v chondrocytech pacientů s osteoartrózou. Cílem naší studie bylo prozkoumat roli Trb3 v aktivaci fibroblastů a v produkci kolagenu, analyzovat expresi Trb3 v SSc kůži, v dermálních fibroblastech a ve fibrotické kůži u myších experimentálních modelů a zhodnotit antifibrotické účinky inhibice Trb3 in vitro a in vivo. Poprvé jsme detekovali zvýšenou expresi Trb3 v SSc kůži, konkrétně v aktivovaných fibroblastech, a potvrdili zvýšenou expresi Trb3 i v experimentálně navozené fibrotické myší kůži. Zjistili jsme, že hlavní profibrotický cytokin TGF- β indukuje expresi Trb3 způsobem závislým na Smad3 a že zvýšení Trb3 (navazeno pomocí plasmidu) pak dále potencuje aktivaci signální dráhy TGF- β / Smad, aktivaci fibroblastů a produkci kolagenu. Patologickou aktivaci signální kaskády TGF- β / Smad jsme utlumili pomocí inhibice Trb3 (prostřednictvím siRNA), což vedlo k potlačení aktivace fibroblastů a produkce kolagenu in vitro a k redukci experimentálně navozené kožní fibrózy u dvou myších modelů in vivo (i. bleomycinem indukovaná fibróza reprezentující časnou zánětlivou fázi SSc; ii. AdTBR model reprezentující perzistentní aktivaci signální dráhy TGF- β nezávislou na zánětu). Inhibice Trb3, která měla významné antifibrotické účinky jak in vitro, tak in vivo, bylo dosaženo pomocí siRNA. Použití siRNA k selektivnímu utlumení klíčových genů, které hrají zásadní roli např. v rozvoji a progresi tumorů, je atraktivním terapeutickým cílem nejen u nádorových onemocnění. Zásadní limitací tohoto konceptu v podmínkách in vivo obecně je však jejich vysoká degradabilita, velikost molekuly a negativní náboj. V naší studii jsme vzhledem k nedostupnosti knock-out myší nebo specifického inhibitoru použili systém navázané anti-Trb3-siRNA s atelokolagenem, který redukuje zmíněné limitace. Vzhledem k recentnímu velkému pokroku v oblasti vývoje aplikačních systémů siRNA in vivo (jako např. konjugáty siRNA s cholesterolem, N-acetylgalaktosaminem nebo tokoferolem) a nanočástic, které mohou sloužit jako tzv. nanonosiče siRNA (Asami Y et al. 2016), by se inhibice Trb3 mohla stát atraktivním cílem antifibrotické terapie.

Seznam publikací k tématu:

4. Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Zerr P, Sumova B, Avouac J, Dees C, Distler A, Becvar R, Distler O, Schett G, Senolt L, Distler JH. Tribbles homologue 3 stimulates canonical TGF- β signalling to regulate fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2016 Mar;75(3):609-16.

4.5. Význam interleukinu (IL)-35 u pacientů se systémovou sklerodermií

Souhrn výsledků:

IL-35 je nejnovějším členem cytokinové rodiny IL-12, kam dále patří IL-12, IL-23 a IL-27. Dřívější práce demonstrovaly zvýšenou expresi IL-35 u různých nádorových onemocnění a byl popsán jako mediátor nádorové progresy a biomarker progresy a špatné prognózy. Novější studie popsaly jeho ambivalentní roli u zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Několik prací mu připsalo protizánětlivé účinky prostřednictvím indukce T-regulačních lymfocytů a inhibice efektorových T lymfocytů (např. u experimentálních modelů IBD a kolagenem indukované artritidy, RA, SLE) a novější práce spíše prozánětlivou roli (např. u Lymeské artritidy, RA, IZM). Další studie popsaly, že receptor pro IL-35 aktivuje signální dráhu STAT1 a STAT4. Naše dřívější práce již popsala potentní profibrotické účinky transkripčního faktoru STAT4 prostřednictvím aktivace a proliferace T lymfocytů. Cílem naší studie bylo zhodnotit expresi IL-35 v SSc kůži a dermálních fibroblastech, analyzovat jeho roli v aktivaci fibroblastů, stanovit jeho koncentrace v séru pacientů se SSc a kontrolních zdravých jedinců se srovnatelným věkem a pohlavím a charakterizovat asociace naměřených hodnot s klinickými parametry specifickými pro SSc. Poprvé jsme demonstrovali zvýšenou expresi obou podjednotek IL-35 (EBI-3 i p35) v SSc kůži i v dermálních fibroblastech, jak na mRNA, tak na proteinové úrovni. IL-35 byl v SSc kůži zvýšeně exprimován zejména fibroblasty, aktivovanými fibroblasty a buňkami perivaskulárního zánětlivého infiltrátu v dermis. Dále jsme zjistili, že hlavní profibrotický cytokin TGF- β indukuje expresi IL-35 a jeho zvýšení (exogenně pomocí rekombinantního proteinu IL-35) posléze vede k aktivaci fibroblastů a k produkci kolagenu v závislosti na dávce rekombinantního IL-35. Detekovali jsme rovněž zvýšenou expresi IL-35 v séru pacientů se SSc, zejména v časně fázi nemoci a u pacientů s kapilaroskopickým nálezem charakteristickým pro časnou fázi mikrovaskulopatie u SSc. V současnosti rovněž probíhá analýza sérového IL-35 u pacientů se SSc s intersticiálním plicním postižením léčených intravenózními pulzy cyklofosfamidu (nepublikovaná data). Ve stejném roce byla publikována práce brazilských autorů, kteří rovněž demonstrovali zvýšené sérové koncentrace IL-35 u SSc a navíc i jejich asociaci s plicní fibrózou (Dantas AT et al.

2015). Práce jiných výzkumných skupin potvrdily zvýšenou expresi všech dalších cytokinů rodiny IL-12 v séru pacientů se SSc a jejich asociaci s renální vaskulopatií (u IL-12), s trváním nemoci (u IL-23), plicní fibrózou (u IL-23, IL-27) a rozsahem kožní fibrózy (u IL-27) (Sato S et al. 2000; Komura K et al. 2008; Yoshizaki A et al. 2011). Vzhledem ke kontroverzním nálezům (protizánětlivá versus prozánětlivá role) z dosavadních studií zkoumajících roli IL-35 u zánětlivých a u autoimunitních onemocnění a současným limitovaným možnostem terapeutického ovlivnění IL-35 v podmínkách in vivo (Guan SY et al. 2017) bude zapotřebí ještě mnoho studií k objasnění významu IL-35 u těchto onemocnění, včetně SSc, a významného pokroku ve vývoji anti-IL-35 terapie.

Seznam publikací k tématu:

5. Tomčík M, Zerr P, Palumbo-Zerr K, Storkanova H, Hulejova H, Spiritovic M, Kodet O, Stork J, Becvar R, Vencovsky J, Pavelka K, Filkova M, Distler JH, Senolt L. Interleukin-35 is upregulated in systemic sclerosis and its serum levels are associated with early disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Dec;54(12):2273-82.

4.6. Význam adiponektinu u pacientů se systémovou sklerodermií

Souhrn výsledků:

Několik prací popsal protektivní roli adiponektinu u změn spojených s obezitou a metabolickým syndromem a jeho protizánětlivé vlastnosti v patogenezi aterosklerózy. Pozdější práce naopak prokázaly jeho zvýšenou lokální a systémovou expresi u RA a SLE a charakterizovaly adiponektin jako mediátor aktivace zánětu a imunitní odpovědi. Další výzkumné skupiny popsaly potentní antifibrotické účinky adiponektinu v modelech jaterní a myokardiální fibrózy. Cílem naší práce bylo stanovit koncentrace adiponektinu v séru pacientů se SSc a kontrolních zdravých jedinců se srovnatelným věkem a pohlavím a charakterizovat asociace naměřených hodnot s klinickými parametry specifickými pro SSc. Detekovali jsme numericky nižší, ale statisticky srovnatelné, sérové koncentrace adiponektinu u SSc a u zdravých jedinců a jejich negativní korelaci s rozsahem a se závažností kožního postižení (hodnoceno podle modifikovaného Rodnanova kožního skóre, mRSS). Pomocí regresní analýzy jsme zjistili, že variabilitu naměřených hodnot adiponektinu vysvětlují proměnné HDL, mRSS, trvání nemoci a věk (model 1) a CRP, mRSS a věk (model 2). Ve stejném období publikovaly další tři výzkumné týmy podobné výsledky – převážně nižší exprese ve fibrotické kůži anebo v séru pacientů se SSc, která korelovala s mRSS, s aktivitou, závažností a trváním nemoci (Arakawa H et al. 2011; Lakota K et al. 2012; Masui Y et al.

2012). Výzkumný tým profesora Johna Vargy pak ve stejném roce demonstroval, že adiponectin, který je přímo řízen hlavním regulátorem adipogeneze - PPAR- γ (Peroxisome proliferator activated receptor gamma), má potentní antifibrotické účinky zprostředkované AMP (adenosinmonofosfátem) a útlumem kanonické Smad signální dráhy (Fang F et al. 2012). V rámci spolupráce s výzkumným týmem prof. Vargy se následně naše skupina podílela na hodnocení terapeutického ovlivnění dráhy PPAR- γ -adiponectin-Smad a jejího antifibrotického potenciálu pomocí in vitro experimentů na dvourozměrných kulturách dermálních fibroblastů a trojrozměrných tkáňových kožních kulturách a pomocí in vivo experimentálních myších modelů SSc. Demonstrovali jsme, že triterpenoid – agonista PPAR- γ má potentní antifibrotické účinky, jak in vitro, tak in vivo, u obou použitých experimentálních modelů kožní fibrózy (i. bleomycinem indukovaná fibróza reprezentující časnou zánětlivou fázi SSc; ii. AdTBR model reprezentující perzistentní aktivaci signální dráhy TGF- β , nezávislou na zánětu) prostřednictvím utlumení Smad signální kaskády. Naše výsledky byly o dva roky později potvrzeny skupinou profesora Yannicka Allanora, která prokázala potentní antifibrotické účinky pan-PPAR agonisty (IVA337) na modelu bleomycinem indukované kožní fibrózy, aniž by negativně ovlivnil hojení ran. Antifibrotický efekt pan-PPAR agonisty byl srovnatelný s účinky selektivního agonisty PPAR- γ v naší práci, navíc však byl demonstrován i protizánětlivý účinek (Ruzehaji N et al. 2016). Účinnost IVA337 je v současnosti zkoumána u pacientů s kožně difúzní SSc (dcSSc) v multicentrickém, randomizovaném, placebem kontrolovaném, dvojitě zaslepeném klinickém hodnocení fáze II (tzv. proof-of-concept study), jehož spoluřešitelem bude letos i náš ústav. Primárním cílem hodnocení je změna mRSS a sekundárními cíli jsou zejména hodnocení plicních funkcí a kvality života.

Seznam publikací k tématu:

6. Tomčík M, Arima K, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Braun M, Beláček J, Novák M, Bečvář R, Vencovský J, Haluzík M, Gay S, Müller-Ladner U, Distler O, Senolt L. Adiponectin relation to skin changes and dyslipidemia in systemic sclerosis. *Cytokine*. 2012 May;58(2):165-8.
7. Wei J, Zhu H, Komura K, Lord G, Tomčík M, Wang W, Doniparthi S, Tamaki Z, Hinchcliff M, Distler JH, Varga J. A synthetic PPAR- γ agonist triterpenoid ameliorates experimental fibrosis: PPAR- γ -independent suppression of fibrotic responses. *Ann Rheum Dis*. 2014 Feb;73(2):446-54.

5. ZÁVĚR

Výsledky našich vybraných prací objasňují význam několika nových molekul, které dosud nebyly u systémové sklerodermie zkoumány, ale u kterých již dřívější práce naznačovaly, že by mohly mít vztah k zásadním patologickým procesům v patogenezi SSc – vaskulopatii, zánětu a fibróze. Vzhledem k výzkumnému zaměření naší pracovní skupiny a zahraničních spolupracovníků je těžištěm našeho výzkumu kožní fibróza u SSc, která má však řadu společných charakteristik s tkáňovou fibrózou postihující jiné orgány u SSc (např. plíce, srdce a trávicí trakt) anebo u idiopatických orgánových fibróz (Wynn TA, Ramalingam TR 2012). Námi demonstrovaná profibrotická role většiny zmíněných molekul (s výjimkou adiponectinu) a antifibrotický potenciál jejich inhibice (naopak potenciace u adiponectinu) však nelze generalizovat a bude zapotřebí dalších podrobných studií k potvrzení našich výsledků na globální úrovni SSc a fibrotických onemocnění obecně. I přes tyto limitace věříme, že naše výsledky významně přispěly k obohacení znalostí patogeneze SSc a doufáme, že některé ze zmíněných molekul se brzy stanou cílem antifibrotické terapie v klinických hodnoceních u pacientů se SSc, jako v případě osy PPAR- γ -adiponectin.

6. SEZNAM PŘILOŽENÝCH PUBLIKACÍ

1. STORKANOVA, Hana, Michal TOMCIK. Animal models of systemic sclerosis. In: RADIC, Mislav. *Systemic sclerosis*. Split: InTech, 2017. ISBN 978-953-51-5045-9. (kapitola přijata k tisku do monografie v angličtině v lednu 2017)
2. Tomcik M, Zerr P, Pitkowski J, Palumbo-Zerr K, Avouac J, Distler O, Becvar R, Senolt L, Schett G, Distler JH. Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition targets canonical TGF- β signalling to prevent fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2014 Jun;73(6):1215-22.
3. Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Zerr P, Avouac J, Dees C, Sumova B, Distler A, Beyer C, Cerezo LA, Becvar R, Distler O, Grigorian M, Schett G, Senolt L, Distler JH. S100A4 amplifies TGF- β -induced fibroblast activation in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2015 Sep;74(9):1748-55.
4. Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Zerr P, Sumova B, Avouac J, Dees C, Distler A, Becvar R, Distler O, Schett G, Senolt L, Distler JH. Tribbles homologue 3 stimulates canonical TGF- β signalling to regulate fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2016 Mar;75(3):609-16.
5. Tomcik M, Zerr P, Palumbo-Zerr K, Storkanova H, Hulejova H, Spiritovic M, Kodet O, Stork J, Becvar R, Vencovsky J, Pavelka K, Filkova M, Distler JH, Senolt L. Interleukin-35 is upregulated in systemic sclerosis and its serum levels are associated with early disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Dec;54(12):2273-82.
6. Tomčík M, Arima K, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Braun M, Beláček J, Novák M, Bečvář R, Vencovský J, Haluzík M, Gay S, Müller-Ladner U, Distler O, Senolt L. Adiponectin relation to skin changes and dyslipidemia in systemic sclerosis. *Cytokine*. 2012 May;58(2):165-8.
7. Wei J, Zhu H, Komura K, Lord G, Tomcik M, Wang W, Doniparthi S, Tamaki Z, Hinchcliff M, Distler JH, Varga J. A synthetic PPAR- γ agonist triterpenoid ameliorates experimental fibrosis: PPAR- γ -independent suppression of fibrotic responses. *Ann Rheum Dis*. 2014 Feb;73(2):446-54.

7. KOMPLETNÍ SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace anglicky v časopisech s IF (citace bez autocitací dle Web of Science)

1. Marquart S, Zerr P, Akhmetshina A, Palumbo K, Reich N, Tomcik M, Horn A, Dees C, Engel M, Zwerina J, Distler O, Schett G, Distler JH. Inactivation of the cannabinoid receptor CB1 prevents leukocyte infiltration and experimental fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2010 Nov;62(11):3467-76. IF: 8,435 (citováno: 22x)
2. Dees C, Zerr P, Tomcik M, Beyer C, Horn A, Akhmetshina A, Palumbo K, Reich N, Zwerina J, Sticherling M, Mattson MP, Distler O, Schett G, Distler JH. Inhibition of Notch signaling prevents experimental fibrosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2011 May;63(5):1396-404. IF: 7,866 (citováno: 40x)
3. Avouac J, Fürnrohr BG, Tomcik M, Palumbo K, Zerr P, Horn A, Dees C, Akhmetshina A, Beyer C, Distler O, Schett G, Allanore Y, Distler JH. Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2011 Mar;63(3):800-9. IF: 7,866 (citováno: 38x)
4. Dees C, Tomcik M, Zerr P, Akhmetshina A, Horn A, Palumbo K, Beyer C, Zwerina J, Distler O, Schett G, Distler JH. Notch signalling regulates fibroblast activation and collagen release in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jul;70(7):1304-10. IF: 8,727 (citováno: 30x)
5. Palumbo K, Zerr P, Tomcik M, Vollath S, Dees C, Akhmetshina A, Avouac J, Yaniv M, Distler O, Schett G, Distler JH. The transcription factor JunD mediates transforming growth factor beta-induced fibroblast activation and fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Jul;70(7):1320-6. IF: 8,727 (citováno: 22x)
6. Cerezo LA, Kuncová K, Mann H, Tomčík M, Zámecník J, Lukanidin E, Neidhart M, Gay S, Grigorian M, Vencovsky J, Senolt L. The metastasis promoting protein S100A4 is increased in idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Oct;50(10):1766-72. IF: 4,058 (citováno: 14x)
7. Jansa P, Becvar R, Ambroz D, Palecek T, Tomcik M, Skacelova S, Aschermann M, Linhart A. Pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis in the Czech Republic. *Clin Rheumatol.* 2012 Mar;31(3):557-61. IF: 2,037 (citováno: 8x)
8. Avouac J, Palumbo K, Tomcik M, Zerr P, Dees C, Horn A, Maurer B, Akhmetshina A, Beyer C, Sadowski A, Schneider H, Shiozawa S, Distler O, Schett G, Allanore Y, Distler JH. Inhibition of activator protein 1 signaling abrogates transforming growth factor β -mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2012 May;64(5):1642-52. IF: 7,477 (citováno: 33x)
9. Reich N, Tomcik M, Zerr P, Lang V, Dees C, Avouac J, Palumbo K, Horn A, Akhmetshina A, Beyer C, Xie W, Bennett BL, Distler O, Schett G, Distler JH. Jun N-terminal kinase as a potential molecular target for prevention and treatment of dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis.* 2012 May;71(5):737-45. IF: 9,111 (citováno: 20x)

10. Beyer C, Reich N, Schindler SC, Akhmetshina A, Dees C, Tomcik M, Hirth-Dietrich C, von Degenfeld G, Sandner P, Distler O, Schett G, Distler JH. Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jun;71(6):1019-26. IF: 9,111 (citováno: 33x)
11. Horn A, Palumbo K, Cordazzo C, Dees C, Akhmetshina A, Tomcik M, Zerr P, Avouac J, Gusinde J, Zwerina J, Roudaut H, Traiffort E, Ruat M, Distler O, Schett G, Distler JH. Hedgehog signaling controls fibroblast activation and tissue fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2012 Aug;64(8):2724-33. IF: 7,477 (citováno: 42x)
12. Tomčik M, Arima K, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Braun M, Beláček J, Novák M, Bečvář R, Vencovský J, Haluzík M, Gay S, Müller-Ladner U, Distler O, Senolt L. Adiponectin relation to skin changes and dyslipidemia in systemic sclerosis. *Cytokine*. 2012 May;58(2):165-8. IF: 2,518 (citováno: 7x)
13. Horn A, Kireva T, Palumbo-Zerr K, Dees C, Tomcik M, Cordazzo C, Zerr P, Akhmetshina A, Ruat M, Distler O, Beyer C, Schett G, Distler JH. Inhibition of hedgehog signalling prevents experimental fibrosis and induces regression of established fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2012 May;71(5):785-9. IF: 9,111 (citováno: 40x)
14. Dees C, Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Distler A, Beyer C, Lang V, Horn A, Zerr P, Zwerina J, Gelse K, Distler O, Schett G, Distler JH. JAK-2 as a novel mediator of the profibrotic effects of transforming growth factor β in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2012 Sep;64(9):3006-15. IF: 7,477 (citováno: 21x)
15. Weingärtner S, Zerr P, Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Distler A, Dees C, Beyer C, Shankar SL, Cedzik D, Schafer PH, Distler O, Schett G, Distler JH. Pomalidomide is effective for prevention and treatment of experimental skin fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2012 Nov;71(11):1895-9. IF: 9,111 (citováno: 12x)
16. Zerr P, Palumbo-Zerr K, Distler A, Tomcik M, Vollath S, Munoz LE, Beyer C, Dees C, Egberts F, Tinazzi I, Del Galdo F, Distler O, Schett G, Spriewald BM, Distler JH. Inhibition of hedgehog signaling for the treatment of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2012 Oct 4;120(14):2909-17. IF: 9,060 (citováno: 15x)
17. Zerr P, Distler A, Palumbo-Zerr K, Tomcik M, Vollath S, Dees C, Egberts F, Tinazzi I, Del Galdo F, Distler O, Schett G, Spriewald BM, Distler JH. Combined inhibition of c-Abl and PDGF receptors for prevention and treatment of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Am J Pathol*. 2012 Nov;181(5):1672-80. IF: 4,522 (citováno: 10x)
18. Avouac J, Elhai M, Tomcik M, Ruiz B, Friese M, Piedavent M, Colonna M, Bernhardt G, Kahan A, Chiochia G, Distler JH, Allanore Y. Critical role of the adhesion receptor DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of inflammation-driven dermal fibrosis in a mouse model of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2013 Jun;72(6):1089-98. IF: 9,270 (citováno: 12x)

19. Wei J, Zhu H, Komura K, Lord G, Tomcik M, Wang W, Doniparthi S, Tamaki Z, Hinchcliff M, Distler JH, Varga J. A synthetic PPAR- γ agonist triterpenoid ameliorates experimental fibrosis: PPAR- γ -independent suppression of fibrotic responses. *Ann Rheum Dis*. 2014 Feb;73(2):446-54. IF: 10,377 (citováno: 19x)
20. Tomcik M, Zerr P, Pitkowski J, Palumbo-Zerr K, Avouac J, Distler O, Becvar R, Senolt L, Schett G, Distler JH. Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition targets canonical TGF- β signalling to prevent fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2014 Jun;73(6):1215-22. IF: 10,377 (citováno: 20x)
21. Zerr P, Vollath S, Palumbo-Zerr K, Tomcik M, Huang J, Distler A, Beyer C, Dees C, Gela K, Distler O, Schett G, Distler JH. Vitamin D receptor regulates TGF- β signalling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2015 Mar;74(3):e20. IF: 12,384 (citováno: 28x)
22. Kuncova K, Sedlackova M, Vencovsky J, Mann H, Tomcik M, Wenchich L, Zamecnik J. Inflammatory myopathy associated with statins: report of three cases. *Mod Rheumatol*. 2014 Mar;24(2):366-71. IF: 2,397 (citováno: 2x)
23. Cerezo LA, Remáková M, Tomčik M, Gay S, Neidhart M, Lukanidin E, Pavelka K, Grigorian M, Vencovský J, Šenolt L. The metastasis-associated protein S100A4 promotes the inflammatory response of mononuclear cells via the TLR4 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Aug;53(8):1520-6. IF: 4,475 (citováno: 15x)
24. Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Zerr P, Avouac J, Dees C, Sumova B, Distler A, Beyer C, Cerezo LA, Becvar R, Distler O, Grigorian M, Schett G, Senolt L, Distler JH. S100A4 amplifies TGF- β -induced fibroblast activation in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2015 Sep;74(9):1748-55. IF: 12,384 (citováno: 4x)
25. Avouac J, Palumbo-Zerr K, Ruzehaji N, Tomcik M, Zerr P, Dees C, Distler A, Beyer C, Schneider H, Distler O, Schett G, Allanore Y, Distler JH. The nuclear receptor constitutive androstane receptor/NR1I3 enhances the profibrotic effects of transforming growth factor β and contributes to the development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheumatol*. 2014 Nov;66(11):3140-50. IF: 6,009 (citováno: 6x)
26. Zerr P, Palumbo-Zerr K, Huang J, Tomcik M, Sumova B, Distler O, Schett G, Distler JH. Sirt1 regulates canonical TGF- β signalling to control fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jan;75(1):226-33. IF: 12,384 (citováno: 17x)
27. Palumbo-Zerr K, Zerr P, Distler A, Fliehr J, Mancuso R, Huang J, Mielenz D, Tomcik M, Fürrohr BG, Scholtyssek C, Dees C, Beyer C, Krönke G, Metzger D, Distler O, Schett G, Distler JH. Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor- β signaling and fibrosis. *Nat Med*. 2015 Feb;21(2):150-8. IF: 30,357 (citováno: 19x)
28. Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Zerr P, Sumova B, Avouac J, Dees C, Distler A, Becvar R, Distler O, Schett G, Senolt L, Distler JH. Tribbles homologue 3 stimulates

canonical TGF- β signalling to regulate fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2016 Mar;75(3):609-16. IF: 12,384 (citováno: 2x)

29. Tomčík M, Zerr P, Palumbo-Zerr K, Storkanova H, Hulejova H, Spiritovic M, Kodet O, Stork J, Becvar R, Vencovsky J, Pavelka K, Filkova M, Distler JH, Senolt L. Interleukin-35 is upregulated in systemic sclerosis and its serum levels are associated with early disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Dec;54(12):2273-82. IF: 4,524 (citováno: 2x)
30. Stiburkova B, Miyata H, Závada J, Tomčík M, Pavelka K, Storkanova G, Toyoda Y, Takada T, Suzuki H. Novel dysfunctional variant in ABCG2 as a cause of severe tophaceous gout: biochemical, molecular genetics and functional analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2016 Jan;55(1):191-4. IF: 4,524 (citováno: 6x)
31. Závada J, Uher M, Svobodová R, Olejárová M, Hušáková M, Ciferská H, Hulejová H, Tomčík M, Šenolt L, Vencovský J. Serum tenascin-C discriminates patients with active SLE from inactive patients and healthy controls and predicts the need to escalate immunosuppressive therapy: a cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2015 Nov 25;17:341. IF: 3,979 (citováno: 1x)
32. Lin NY, Distler A, Beyer C, Philippi-Schöbinger A, Breda S, Dees C, Stock M, Tomčík M, Niemeier A, Dell'Accio F, Gelse K, Mattson MP, Schett G, Distler JH. Inhibition of Notch1 promotes hedgehog signalling in a HES1-dependent manner in chondrocytes and exacerbates experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2016 Nov;75(11):2037-2044. IF: 12,384 (citováno: 1x)
33. Palumbo-Zerr K, Soare A, Zerr P, Liebl A, Mancuso R, Tomčík M, Sumova B, Dees C, Chen CW, Wohlfahrt T, Mallano T, Distler A, Ramming A, Gelse K, Mihai C, Distler O, Schett G, Distler JH. Composition of TWIST1 dimers regulates fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jan;76(1):244-251. IF: 12,384 (citováno: 0x)
34. Kowal-Bielecka et al (EUSTAR coauthors včetně Tomčík M). Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2016 Nov 9. [Epub ahead of print] IF: 12,384 (citováno: 0x)
35. Mišunová M, Svitálková T, Pleštilová L, Kryštufková O, Tegzová D, Svobodová R, Hušáková M, Tomčík M, Bečvář R, Závada J, Mann H, Kolesár L, Slavčev A, Vencovský J, Novota P. Molecular markers of systemic autoimmune disorders: the expression of MHC-located HSP70 genes is significantly associated with autoimmunity development. *Clin Exp Rheumatol*. 2016 Dec 28. [Epub ahead of print] IF: 2,495 (citováno: 0x)

Publikace v recenzovaných časopisech bez IF, anglicky

1. Avouac J, Tomčík M, Beyer C. Reports from the 2015 American College of Rheumatology congress. *J scleroderma relat disord*. 2016;1(1):16–20.

Publikace v recenzovaných časopisech bez IF, česky

1. Tomčík M, Hulejová H, Filková M, Braun M, Bečvář R, Haluzík M, et al. Adiponectin may be related to skin remodelling in patients with systemic sclerosis. *Ceska Revmatol* 2008;16(4):148-152.
2. Olejárová M, Bečvář R, Forejtová Š, Hurňáková J, Jarošová K, Klein M, Kryštůfková O, Mann H, Svobodová R, Šedová L, Šenolt L, Štolfa J, Tegzová D, Tomčík M, Votavová M, Závada J. Souhrnná zpráva z kongresu EULAR 2013. *Ceska Revmatol* 2013;21(4):190-199.
3. Tomčík M. Systemic sclerosis. *Kardiol Rev* 2014;16(5):414-419.
4. Tomčík M. The role of new pro-inflammatory and/or pro-fibrotic molecules in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ceska Revmatol* 2014;22(3):127-142.
5. Olejárová M, Bečvář R, Forejtová Š, Hurňáková J, Jarošová K, Klein M, Kryštůfková O, Mann H, Svobodová R, Šedová L, Šenolt L, Štolfa J, Tegzová D, Tomčík M, Votavová M, Závada J. Zpráva z kongresu EULAR. *Ceska Revmatol* 2014;22(3):117-126.
6. Štorkánová H, Tomčík M. Experimental models of systemic sclerosis - A tool to understand and treat an incurable disease? *Ceska Revmatol* 2015;23(2):59-68.
7. Tomčík M, Olejárová M, Bečvář R, Šedová L. Zprávy z kongresu EULAR 2015. *Ceska Revmatol* 2016;24(1):32-37.
8. Tegzová D, Hulejová H, Hrušková V, Stibůrková B, Filková M, Forejtová Š, Ciferská H, Bečvář R, Tomčík M, Mann H, Závada J, Růžičková O, Šléglová O, Hurňáková J, Olejárová M. Novinky a poznatky z kongresu ACR 2015. *Ceska Revmatol* 2016;24(1):38-47.
9. Oreská S, Tomčík M. Cardiovascular risk in rheumatic diseases. *Cas Lek Cesk.* 2016 Fall;155(6):324-332.
10. Tomčík M. Raynaud's phenomenon. *Cas Lek Cesk.* 2016 Fall;155(6):310-318.
11. Grobelná K, Tomčík M, Pavelka K. Hodnocení magnetické rezonance u non-radiografické axiální spondyloartritidy. *Acta medicae* 2016(7):50-52.
12. Olejárová M, Filková M, Šenolt L, Tomčík M, Bečvář R, Forejtová Š, Šléglová O, Petřů L. Zpráva z výročního kongresu American College of Rheumatology 2016. *Ceska Revmatol* 2016;24(4):168-173.
13. Oreská S, Štorkánová H, Špiritović M, Tomčík M. Atherosclerosis and its complications in rheumatology. *Postgraduální medicína.* 2017;19(1):101-110.
14. Bečvář R, Soukup T, Tomčík M, Jansa P. Doporučení České reumatologické společnosti pro léčbu systémové sklerodermie. *Ceska Revmatol* 2017;26(2). (přijato k tisku v dubnu 2017)

15. Oreská S, Štorkánová H, Špiritović M, Tomčík M. Ateroskleróza a kardiovaskulární riziko u pacientů se systémovou sklerodermií. Ceska revmatol (v recenzním řízení v červnu 2017)
16. Špiritović M, Štorkánová H, Oreská S, Šmucrová H, Heřmánková B, Romanowski MW, Pavlů D, Tomčík M. Nefarmakologická terapie u systémové sklerodermie. Ceska revmatol (v recenzním řízení v červnu 2017)

8. PODĚKOVÁNÍ

Poděkování za odbornou spolupráci a konzultace při řešení projektů patří kolegům v Revmatologickém ústavu - vedoucímu Oddělení experimentální revmatologie prof. MUDr. Ladislavu Šenoltovi, Ph.D., vedoucímu ambulantního oddělení a výzkumu v oblasti systémové sklerodermie doc. MUDr. Radimu Bečvářovi, CSc., řediteli Revmatologického ústavu a přednostovi Revmatologické kliniky 1. LF UK prof. MUDr. Karlu Pavelkovi, DrSc. a zástupci ředitele a vědeckému sekretáři prof. MUDr. Jiřímu Vencovskému, DrSc. V rámci zahraniční spolupráce za vedení a pomoc při bazálních výzkumu v oblasti systémové sklerodermie patří poděkování prof. Dr. med. Joergovi Distlerovi z Department for Internal Medicine 3 v Erlangenu a zejména třem kolegům z jeho výzkumné skupiny – Dr. rer. nat. Pawel Zerr, PhD, Dr. rer. nat. Katrin Palumbo-Zerr, PhD a prof. MD Jérôme Avouac, PhD. Poděkování za spolupráci patří rovněž kolegům z Oddělení experimentální revmatologie Mgr. Lucii Andrés Cerezo, MUDr. Márii Filkové, Ph.D., Ing. Barboře Šumové, mým postgraduálním studentům Mgr. Haně Štokánové, Mgr. Maji Špiritović, MUDr. Sabíně Oreské a všem lékařům a vědeckým pracovníkům Revmatologického ústavu. Řešení projektů, ze kterých vychází habilitační práce, by se neobešlo bez finanční podpory následujících institucí: Výzkumné záměry MZČR (00023728), EULAR Research Training Bursary, Fond Mobility Univerzity Karlovy v Praze, OPFA European Social Fund Prague & EU: Supporting Your Future (CZ.2.17/1.1.00/32698), SVV: 262512, NT12440, NT13698, AZV16-33574A a AZV16-33542A.

Rád bych na závěr poděkoval své manželce MDDr. Alise Tomčíkové za trpělivé čtení a korekturu habilitační práce a neocenitelnou podporu. Moje hlavní poděkování patří mým rodičům a mé sestře Katce. Bez podpory a pomoci své rodiny bych neměl tak jedinečné podmínky pro studium, práci a výzkumnou činnost.