

MUDr. Marta Hájková, CSc., MPH. Prednostka: Klinika pneumológie a fizeológie LF UK a UNB,  
Nemocnica Ružinov, Ružinovská 6, 826 06 Bratislava, Slovensko

---

1.lékařská fakulta Univerzity Karlovy

Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky

Kateřinská 32

128 01 Praha 2

Bratislava, 02.04.2022

**Vec: Habilitačná práca – oponentský posudok**

**MUDr. Martina Šterclová, Ph.D.**

**Pracoviště: Pneumologická klinika 1.LF a FTN**

**Pneumologická klinika 2. LF UK a FN Motol**

**Odbor: vnitřní nemoci**

Autorka predložila habilitačnú prácu v rozsahu 204 strán. V úvode práce sú definované granty, za podpory ktorých táto práca vznikla, konštatuje kde bola realizovaná klinická časť projektu (Pneumologická klinika 1.LF UK a Thomayerovy nemocnice) a laboratórna časť projektu (pracovisko Klinické a transplantační imunologie IKEM, Oddelení patologie a molekulárních metod Thomayerovy nemocnice a Comprehensive Pneumology Center v Mnichově). Štatistické vyhodnotenie bolo realizované v spolupráci s Oddelením biostatistiky IKEM.

Autorka poďakovala prof. MUDr. Martine Vašákovéj, Ph.D, spolupracovníkom a pacientom.

Autorka si ako tému svojej habilitačnej práce zvolila patogenézu chorobnej jednotky exogénna alergická alveolitída (EAA). Do EAA patrí heterogénna skupina ochorení s rôznymi zdrojmi expozície, rôznou manifestáciou a prognózou. Dlhodobým problémom diagnostiky v klinickej praxi je absencia celosvetovo prijímaných diagnostických kritérií, ktorá by umožnila lepšie charakterizovať celú skupinu, a tak zlepšiť výsledky liečby tohto ochorenia.

Práca je rozdelená do 9 kapitol, ktoré majú logické a na seba nadväzujúce členenie.

Prvé dve kapitoly sú **Abstrakty v češtine a v angličtine**. Autorka stručne zhrňuje všetky poznatky, ktoré sú výsledkom výskumnej činnosti pri objasňovaní patogenézy exogénnej alergickej alveolitídy (EAA). Fakty sú podporené 14 citáciami. V desiatich je prvou autorkou MUDr. Martina Šterclová, Ph.D., v ostatných je spoluautorkou.

Tretou kapitolou je **Úvod do problematiky exogénnej alergickej alveolitídy**. Predstavuje EAA ako skupinu intersticiálnych pľúcnych procesov, rozvíjajúcich sa v príčinnej súvislosti s opakovanou expozíciou inhalačnými antigénmi, pravdepodobne u geneticky predisponovaných jedincov.

Presné epidemiologické dáta, sledujúce incidenciu a prevalenciu EAA nie sú k dispozícii. Autorka cituje dáta z Dánska, z Veľkej Británie, z Nového Mexika, USA, Francúzska a Fínska. Konštatuje, že aktuálne údaje pre Českú republiku chýbajú. Dostupné sú iba informácie týkajúce sa nahlásených a uznaných prípadov EAA ako ochorení z povolania. V práci sa venuje tradičným a novým inhalačným antigénom, genetickej predispozícii a ďalším spúšťačom tohto ochorenia, ktorými sú hlavne respiračné vírusy. Podrobne popisuje molekulárne mechanizmy prebiehajúce v organizme, popisuje úlohu dobre stanoviteľných najdôležitejších cytokínov, chemokínov a ich receptorov v rozvoji EAA a ich potenciálne využitie ako prognostických faktorov alebo terapeutických cieľov: interleukín - 4 (IL-4) a receptor pre interleukín - 4, proteázami aktivovaný receptor 2 (PAR-2), tumor nekrotizujúci faktor- $\alpha$ , transformujúci rastový faktor- $\beta$ , interleukín - 8 (IL-8), epiteliálne neutrofilny aktivujúci proteín-78, vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF), chemokíny IP-10 (CXCL10), ITAC (CXCL11), CXCR3, eotaxin a CCR3, signalizačné kaskády Wingless/intergrase-1 (Wnt-1, Wnt-3) a enzýmy, ktoré sa podieľajú na štepení extracelulárnej matrix a ďalších substancií tzv. matrixová metaloproteináza-7 (MMP-7).

Autorka podrobne popisuje klinický obraz EAA, zdôrazňuje význam anamnézy, popisuje jednotlivé laboratórne vyšetrenia, ktoré slúžia k vylúčeniu iných príčin intersticiálneho pľúcneho postihnutia v rámci diferenciálnej diagnostiky, overenie, že anamnesticky udávaná expozícia je skutočným vyvolávajúcim faktorom ochorenia a pomocné vyšetrenia, pokiaľ zdroj expozície nie je známy. Veľmi podrobne a prehľadne uvádza diagnostické kritériá EAA, definuje všetky terapeutické možnosti, ktoré v súčasnosti máme k dispozícii a nakoniec sa venuje prognóze EAA, ktorá je veľmi variabilná a uvádza aj prediktory mortality pacientov s EAA.

V štvrtej kapitole **Jednotlivé ciele výskumu: spôsob riešenia** definuje každý cieľ zvlášť, s uvedením počtu zaradených pacientov, veľmi dobre zvolenými metódami sledovania a postupov spracovania výsledkov, so záverom a s referenciami. Autorka riešila tieto ciele:

- otázku vzťahu radiologického obrazu ochorenia s klinickými parametrami /1 referencia, 1x hlavná

autorka/,

- porovnávala chemokínové prostredie v BAL /bronchoalveolárna laváž/ pacientov s EAA a pacientov so sarkoidózou a idiopatickou pľúcnou fibrózou (IPF) /3 referencie 2x hlavná autorka, 1x spoluautorka/,
- dokázala vplyv solubilných faktorov v BAL na bunky, ktoré sa podieľajú na procese fibrogenézy /3 referencie, 3x hlavná autorka/,
- analyzovala, či bunky získané v BAL u pacientov s EAA si môžu zachovať vlastnosti odpovedajúce forme ochorenia /2 referencie, 2x hlavná autorka/,
- vysvetlila úlohu IL-4R $\alpha$  v patogenéze EAA /5 referencií,, 2x hlavná autorka, 3x spoluautorka/,
- odpovedala na otázku, či môže sérová koncentrácia proteínu A (SP-A) napomôcť pri odlíšení medzi chronickou EAA a IPF /1 referencia, 1x hlavná autorka/,
- definovala možné zdroje expozície a manifestácie EAA /5 referencií, 5x hlavná autorka/,
- upozornila na endogénne a exogénne faktory, ovplyvňujúce manifestáciu EAA /3 referencie, 1x hlavná autorka, 2x spoluautorka/.

## **Kapitola 5. Zhrnutie výsledkov realizovaného výskumu a diskusia**

Väčšina autorov sa zhoduje v rozdelení pacientov do skupiny s akútnou/subakútnou manifestáciou a do skupiny a chronickým priebehom ochorenia. Výsledky práce autorky a jej spolupracovníkov ukazujú, že tieto skupiny možno rozlíšiť aj podľa radiologických nálezov, percentuálneho zastúpenia lymfocytov v BAL a pomeru CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytov v BAL. Pacienti s chronickou formou EAA nemusia mať lymfocytárnu alveolitídu, ktorá bola dlho považovaná za podmienku diagnózy EAA. Taktiež tzv. imunoregulačný index, pomer CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T lymfocytov v BAL, nie je spoľahlivým diagnostickým markerom, ktorý by u pacientov s EAA, podľa starších publikácií, mal byť nízky. Tento pomer má rôzne hodnoty podľa klinickej manifestácie EAA a u chronických foriem môže byť dokonca v norme.

Prognosticky najzávažnejšou je chronická forma EAA, najmä keď jej súčasťou je radiologický a histopatologický vzorec, ktorý zodpovedá UIP (obvyklá intersticiálna pneumonia) alebo fibrotickej NSIP (idiopatická nešpecifická intersticiálna pneumonia). V praxi nie je ľahké odlíšiť túto formu od IPF, nakoľko expozičné testy sa v ČR v praxi bežne nepoužívajú. Autorka konštatuje, že podľa výsledkov ich štúdií nebol dokázaný signifikantný rozdiel medzi EAA a IPF ani v koncentráciách angiogénnych a angiostatických chemokínov v BAL, ani v expresii ich receptorov na CD4<sup>+</sup> T

lymfocytoch v BAL. Úloha chemokínov sa ale môže u oboch chorobných jednotiek odlišovať. Pri EAA možno IL-8 považovať za pravdepodobný marker kontinuálnej expozície vyvolávajúcim agens, ENA-78 môže byť považovaná za marker reverzibility pľúcneho postihnutia a VEGF má skôr angiogenný než profibrotický efekt a hlavnú úlohu má pravdepodobne vo včasných fázach EAA. Expresia CXCR3 na CD4<sup>+</sup> lymfocytoch v BAL koreluje s rozsahom zápalových zmien na HRCT hrudníka. Tento fakt podporuje myšlienku, že v rôznych fázach ochorenia sa na pľúcnom postihnutí podieľajú rôzne mechanizmy. V texte cituje autorov, ktorí publikovali podobné pozorovania.

Autorka ďalej popisuje situáciu, kedy postihnutie pľúc pri EAA nemá radiologický charakter UIP. Určité aktívne pôsobky v BAL pacientov s EAA ovplyvňujú proliferčné línie (vrátane primárnych) v závislosti na manifestácii ochorenia. Keďže BAL pacientov s vysokým alveolárnym HRCT skóre tlmila proliferčné schopnosti primárnych ľudských fibroblastov, je otázkou, či prozápalové prostredie nemá protektívny vplyv, a teda „chráni“ pacienta s EAA pred rozvojom fibrózy.

Vzťahom medzi zápalom a fibrózou je téma publikácií mnohých autorov, ktorých práce sú v texte citované. Všeobecne sa predpokladá, že chronický zápal je predispozíciou k následnému rozvoju pľúcnej fibrózy. Táto hypotéza v súčasnosti platí aj u pacientov s chronickou EAA. Autorka cituje práce, ktoré podporujú hypotézu že chronický zápal predstavuje predispozíciu k rozvoju malignít a naopak, cituje štúdie, ktoré tento fakt spochybňujú a poukazujú na skutočnosť, že zápalový proces nie je vždy „škodlivý“. To znamená, že stimulácia imunitnej odpovede môže viesť k aktivácii antigén prezentujúcich buniek alebo môžu byť produkované cytokíny, ktoré stimulujú protinádorovú imunitu. Pokiaľ teda klinik hodnotí akékoľvek biologické vzorky od pacientov s EAA, mal by pri interpretácii výsledkov vziať do úvahy manifestáciu ochorenia, radiologického obrazu a BAL bunkového profilu.

V diskusii ďalej autorka analyzuje význam genetickej predispozície. V citovaných štúdiách sa analyzoval polymorfný gén pre TNF- $\alpha$ , PCD1, LMP-7, TIMP-3, TAP-1 a gény pre prozápalové a protizápalové cytokíny. Rozsiahlejšia multicentrická štúdia s dostatočným množstvom pacientov s rôznymi zdrojmi expozície však nikdy nebola realizovaná. V texte autorka uvádza, že bol v jej práci pozorovaný vplyv polymorfizmu génu pre IL-6 na koncentráciu ENA-78 v BAL. Vzťah medzi IL-6 a ENA-78 je mediovaný solubilným receptorom pre IL-6, ktorý atrahuje neutrofile do miesta zápalu a zvyšuje expresiu ENA-78, ktorý môže regulovať ďalšie vlastnosti neutrofilov.

Manifestáciu EAA by mohol ovplyvňovať aj inhalačný agens, s ktorým sú pacienti opakovane v kontakte. Väčšinou sa nejedná o izolovaný agens ale o ich zmes. V texte cituje práce s jednotlivými príkladmi zmesí expozičných antigénov (napr. holubie perie, trus, sérum, roztoče, atď.). Súčasne dodáva, že v tejto práci nedokázali, že by sa cytokínové spektrum v BAL líšilo u pacientov s EAA v závislosti na anamnesticky uvedenom zdroji expozície.

Asi u 20% pacientov sa zdroj expozície nezistí. Nápomocné môže byť vyšetrenie špecifických IgG v sére, ale interpretácia výsledkov musí byť veľmi opatrná. Autorka vo svojej práci dokázala, že koncentrácia sérových protilátok proti komerčne dostupným antigénom *Saccharopolyspora rectivirgula* a *Thermoactinomyces vulgaris* sú v českej populácii s anamnézou expozície v poľnohospodárstve veľmi nízke. Pre porovnanie popisuje situáciu v Nemecku a vo východnom Francúzku. Poukazuje na absenciu referenčného rozmedzia pre českú populáciu. Českí pacienti sú pravdepodobne najviac senzitivizovaní voči hexametylen diisocyanátu a difenylmetan diisocyanátu, ktoré sa používajú k výrobe penového polyuretánu. Identifikácia zdroja expozície (a následné zamedzenie ďalšej expozície), vedie k zlepšeniu prognózy pacientov s EAA.

Autorka vo svojej práci ďalej cituje štúdie, v ktorých sa skúmal vplyv cigaretového dymu. Staršie práce uvádzajú, že EAA trpia častejšie nefajčiari. Nové klinické štúdie ukazujú, že klinická prax je iná. Krátkodobá expozícia cigaretovému dymu viedla k potlačeniu zápalu, dlhodobá viedla k fibrotizácii pľúcneho tkaniva. Zaujímavá je citovaná štúdia, ktorá analyzovala mikrobiálnu kontamináciu cigariet. Preukázaná bola prítomnosť druhu rodu *Bacillus*, ktorý je spojovaný s ochorením EAA. Expozícia cigaretovému dymu zvyšuje produkciu kyslíkových radikálov a zaťažuje bunky vyššou mierou oxidačného stresu. Dôležitým enzýmom, chrániacim bunky pred týmto oxidačným stresom je GPX3, extracelulárny antioxidantný proteín. Autorka cituje štúdiu, kde sa dokázalo, že vplyvom expozície tabakovému dymu môže dôjsť vďaka epigenetickým modifikáciám k „umlčaniu“ génu pre GPX-3, čo môže ďalej stupňovať nežiadúci dopad oxidačného stresu u fajčiara. Týmto spôsobom sa na manifestácii EAA môže podieľať aj expozícia cigaretovému dymu a autorka v práci dokázala že táto expozícia pravdepodobne ovplyvňuje koncentráciu GPX 3 v BAL pacientov s EAA.

V ďalších citáciách autorka dokumentuje význam veku na vplyv imunitnej odpovede jedinca na expozíciu inhalačnými antigénmi. Stúpajúcim vekom dochádza k poklesu špecifickej imunity, klesá zastúpenie naivných lymfocytov, dominujú pamäťové lymfocyty, ktoré ale nie sú funkčne kompetentné, sú dokázané vyššie koncentrácie prozápalových cytokínov a pokles schopnosti neutrofilov fagocytovať. Podľa záverov práce autorky sa zdá, že vek môže ovplyvňovať aj klinickú prezentáciu EAA, t.zn. starší pacienti mali v BAL vyššie percentuálne zastúpenie neutrofilov a eozinofilov než mladší pacienti, čo môže byť okrem iného spôsobené posunom hematopoézy smerom k myelopoéze.

**Kapitola 6. Využití a možné využití získaných poznatku** Autorka konštatuje, že potenciálnou sľubnou molekulou, ktorá by mohla nájsť uplatnenie v klinickej praxi sa zdá byť IL-4T $\alpha$ . Jeho koncentrácia v BAL v čase stanovenia diagnózy koreluje s prognózou pacientov a najmä s odpoveďou na systémovú kortikoterapiu. V budúcnosti, pokiaľ by sa táto hypotéza potvrdila na väčšom súbore pacientov, by klinickí pracovníci získali jednoduchý marker, ktorí im umožní ľahšie rozhodovanie

o indikácii systémovej kortikoterapie. V praxi to znamená nepodať neindikovanú kortikoterapiu u pacientov s EAA.

Pacienti, ktorí nereagujú na liečbu systémovými kortikoidmi a aj napriek vylúčeniu definovanej expozície u nich dochádza k progresii fibrotického pľúcneho postihnutia v čase, môžu profitovať z terapie azatioprinom, eventálne off label mykofenolátom mofetilom. V literatúre sú dohľadateľné kazuistiky, v ktorých sa uvádza použitie rituximabu u pacientov s chronickou progresujúcou EAA, ale nie sú k dispozícii zatiaľ klinické štúdie, ktoré by dokázali efektivitu tohto postupu. Máme veľa dôkazov o úlohe IL-4 a IL-13 v patogenéze ochorení ako astma bronchiale a idiopatická pľúcna fibróza. Receptory pre oba interleukíny majú spoločné niektoré podjednotky (hlavne IL4R $\alpha$ ). Z tohto dôvodu boli vytvorené bišpecifické protilátky proti IL-4 a IL-13 a výsledky výskumu autorky naznačujú, že podobné mechanizmy môžu mať úlohu aj v patogenéze niektorých foriem chronickej EAA, a teda že niektorí pacienti by mohli z podobných liečebných postupov profitovať.

V BAL pacientov s EAA bola dokázaná prítomnosť určitých proteínov, cytokínov, chemokínov a rastových faktorov, ktoré v ľudskom organizme pôsobia vždy paralelne. Autorka si kladie otázku, či naše predstavy o úlohe zápalu ako spúšťača fibrotizujúceho procesu pľúcneho tkaniva u chorých s EAA nevychádzajú z nevhodných modelov. Cituje práce s opakovanou intranazálnou alebo intratracheálnou aplikáciou *S.rectivirgula* myšiam C57BL/6, s inštaláciou *Mycobacterium immunogenum* alebo extraktu holubieho trusu. Výsledkom týchto aplikácií je rozvoj patologických zmien pripomínajúcich zmeny u chorých ľudí so subakútnou EAA, resp. chronickou EAA. Experimentálne myši (C57BL/6) sú presne definované kedy sú „dospelé“ (4 mesiace) a kedy „geriatrické“ (20-24 mesiacov). Teda okrem veku sa od ľudskej populácie líšia charakterom expozície, komorbiditami a expozíciou ďalšími inhalačnými antigénmi, vrátane tabakového dymu.

Autorka na záver konštatuje, že realizované štúdie dokázali, že k výskumu mechanizmov, ktoré vedú k EAA je výhodnejšie použiť komplexný ľudský biologický materiál, t. z.n BAL alebo priamo bunky získané alveolárnou lavážou chorého s EAA. Hodnotenie výsledkov je potrebné vždy korelovať s klinickým stavom pacienta.

## **Kapitola 7. Literatúra**

V tejto kapitole je správne odcitovaných 124 citácií, každý zásadný fakt v texte je podložený citáciou. Okrem toho na konci každej podkapitoly jednotlivých cieľov sú citácie, ktorých autorkou, resp. spoluautorkou je MUDr. Martina Šterclová, Ph.D. Citácie v Kapitole 7 sú od zahraničných a českých autorov a 27 z nich je publikovaných po roku 2015.

## **Kapitola 8. Príloha**

V tejto kapitole je 7 obrázkov, 4x HRCT obrazy a 3x obrázky kultúr – všetko z vlastného súboru a pozorovaní autorky.

#### **Kapitola 9. Výsledky uvedené v kapitole 4**

Všetky referencie sú odpublikované v renomovaných zahraničných časopisoch s vysokým impakt faktorom a v celom znení odfotené v tejto kapitole. Výsledky sú excelentne štatisticky spracované, v textoch sú grafy a tabuľky, dokumentujúce závery, ktoré vyplynuli zo skúmania jednotlivých cieľov.

#### **Potvrdenie originality od prof. MUDr. Roberta Lischke, Ph.D., predsedu habilitačnej komisie**

Habilitačná práca MUDr. Martiny Šterclovej, Ph.D. bola skontrolovaná systémom Turnitin, výstup bol z formálneho hľadiska vyhodnotený Ústavom vedeckých informácií 1. LF UK. Celková zhoda so zdrojmi, sledovanými zmieneným systémom, vrátane citácií a bibliografie je 29%. Zhodu tvoria predovšetkým bibliografické citácie, odborovo používané formulácie, odborné termíny a označenie génov. Po vylúčení bibliografie sa index podobnosti znížil na 2%. Pán profesor potvrdil, že sa jedná o originálnu prácu.

#### **Záver:**

**Práca potvrdzuje a rozširuje pozorovania iných autorov a súčasne prináša nové významné vedecké poznatky tak, ako je to uvedené v oponentskom posudku. Táto práca je obrovským prínosom pre klinickú prax lekárov, ktorí diagnostikujú a snažia sa liečiť a vyliečiť pacientov s EAA. Lepšie a presnejšie skúmanie a pochopenie procesov, ktoré vznikajú pri tejto chorobnej jednotke nám ukazuje nové možnosti vo včasnej správnej diagnostike a liečbe týchto pacientov, v predĺžení ich života a v zlepšení kvality života, bez pridružených komplikácií z liečby používanej v súčasnosti.**

**Odporúčam prácu prijať v predloženej forme a na jej základe odporúčam MUDr.**

**Martine Šterclovej Ph.D.**

**udeliť titul docent pre odbor: vnútorné lekárstvo**