

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Új szerepkörben a humán epididymis protein 4: a  
cisztás fibrózis új prognosztikai biomarkere és  
patofiziológiai mediátora**

Pócsi Marianna

Témavezető: Dr. Nagy Béla



DEBRECENI EGYETEM  
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2026

## **Új szerepkörben a humán epididymis protein 4: a cisztás fibrózis új prognosztikai biomarkere és patofiziológiai mediátora**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a Klinikai orvostudományok tudományágban\*

Írta: Pócsi Marianna okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája  
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Nagy Béla, MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Horváth Ildikó, MTA doktora  
Dr. Nagy Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Németh Norbert, MTA doktora  
tagok: Dr. Horváth Ildikó, MTA doktora  
Dr. Nagy Tamás, PhD  
Dr. Papp Gábor, PhD  
Dr. Nagy Gergely, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, A épület előadóterem  
2026. október 21., 13:00

# 1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

## A cisztás fibrózis patomechanizmusa

A cisztás fibrózis (CF) egy autoszomális recesszív módon öröklődő genetikai anyagcserebetegség, amelynek hátterében a Cisztás Fibrózis Transzmembrán Konduktancia Regulátor (CFTR) fehérjét kódoló gén mutációja áll. A *CFTR* génben több mint 2000 variánst azonosítottak, amelyek közül a leggyakoribb az *p.Phe508del*-CFTR allél. A CFTR fehérje egy ioncsatorna, amely  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  és  $\text{HCO}_3^-$  ionokat szállít és szabályozza az ion- és folyadékáramlást, ezáltal fenntartja a légutak, az emésztőrendszer, a hasnyálmirigy, a verejtékmirigyek és a reproduktív szervek megfelelő működését. A genetikai mutációk eredményeképpen a CFTR ioncsatorna nem működik, vagy nem expresszálódik megfelelően. Mindez a külső elválasztású mirigyek besűrűsödött váladéktermelését eredményezi, ez pedig az érintett szervek progresszív károsodását okozza. A betegek korai halálozását elsősorban a fokozatosan beszűkülő légzésfunkció és a krónikus gyulladás talaján kialakuló tüdőfibrózis okozza. A tüdőfibrózist megelőzi az ún. epiteliális-mezenchimális tranzíció (EMT), CF-ben ugyanakkor ezen folyamatok patomechanizmusa még nem kellően ismert.

A CF kimenetelét, a betegek életminőségét és a mortalitási kockázatot elsősorban a légúti érintettség mértéke befolyásolja, amelynek patológiai folyamatai már a csecsemőkor korai szakaszában megindulnak. A sűrű nyák kedvez a krónikus bakteriális kolonizációnak, a fertőzések pedig krónikus gyulladásos választ váltanak ki, amely pro-inflammatorikus citokinek fokozott felszabadulásával jár együtt, ennek hatására pedig a neutrophil granulocyták fokozott infiltrációja következik be. Ezek a folyamatok proteázokat és reaktív oxigén gyököket szabadítanak fel, amelyek károsítják a légutak felszínét. A NF- $\kappa$ B útvonal krónikusan aktivált állapotban van a CF-es légúti epithelsejtekben, amely serkenti a gyulladásos mediátorok termelődését. A folyamat végül bronchiectasishoz, légúti obstrukcióhoz és légzési elégtelenséghez vezethet.

## A CFTR modulátorok szerepe a CF terápiájában

A CF kezelése az utóbbi évtizedben forradalmi változáson ment keresztül. Korábban a terápia fő célja a tüneti kezelés volt – a légúti fertőzések kontrollja, a nyák oldása, a gyulladás mérséklése, a tápanyag- és enzim-pótlás, valamint súlyos esetben a tüdőtranszplantáció. Mindezek mellett ma már rendelkezésre állnak olyan új gyógyszermolekulák, ún. CFTR-modulátorok, amelyek közvetlenül a betegség molekuláris okát célozzák. A CFTR modulátorok a hibás CFTR fehérje funkciót állítják helyre, melyek mechanizmusukat tekintve lehetnek a

csatorna nyitási valószínűségét növelő potenciátorok (pl. *ivacaftor*), vagy a hibás hajtogatást a javító és a fehérje sejtmembránba történő kikerülését segítő korrektorok (pl. *lumacaftor*, *tezacaftor*, *elexacaftor*), illetve ezen molekulák kombinációját alkalmazó készítmények, amelyek a két mechanizmust egyesítik. Az első áttörést a Kalydeco® (*ivacaftor*) jelentette, amelyet potenciátorként a III. csoportba tartozó *Gly551Asp* és hasonló gating mutációk esetén alkalmaztak eredményesen. Az Orkambi® (*lumacaftor/ivacaftor*) volt az első kombinációs CFTR modulátor, amelyet kifejezetten a homozigóta *p.Phe508del* mutációt hordozó betegek kezelésére fejlesztettek ki. A Kaftrio® (az USA-ban Trikafta®) egy hármas kombinációs terápia, amely a CFTR modulátorok új generációját képviseli: két korrektort (*elexacaftor* és *tezacaftor*) és egy potenciátort (*ivacaftor*) tartalmaz. Az Orkambi® a *p.Phe508del* homozigóta betegekben, míg a Kaftrio® már a CF-es betegek jelentős részét kitevő *p.Phe508del* összetett heterozigóta genotípus esetén is hatásosnak bizonyult. A CFTR modulátor terápia korai, még a kifejezett strukturális tüdőkárosodás kialakulása előtti bevezetése nagy mértékben lassítja a tüdőbetegség progresszióját, csökkenti a légúti akut exacerbációk, a kórházi kezelések és az antibiotikumok szükségességének gyakoriságát, továbbá mérsékli az extrapulmonális szövödményeket, többek között javítva a betegek tápláltsági és általános metabolikus állapotát.

### **A légúti gyulladással és szövetkárosodással összefüggő biomarkerek CF-ben**

Mivel CF-ben az életminőséget és a mortalitást legfőképp a tüdő állapota határozza meg, ezért ennek nyomon követése kulcsfontosságú a betegek gondozása során. A monitorozás multidiszciplináris megközelítést igényel, amelyben kombinálják a klinikai, funkcionális, mikrobiológiai, képalkotó és biomarker alapú módszereket. Az utóbbi években a biomarkerek szerepe egyre fontosabbá vált, mivel lehetővé teszik a korai, szubklinikai változások kimutatását, amikor a hagyományos paraméterek (pl. FEV1) még nem mutatnak jelentős eltérést. Ugyanakkor a légutak érintettségének detektálása korlátozott, különösen gyermekek esetén. Mindezek alapján napjainkban jelentős igény van olyan vérben vagy légúti váladékban könnyen mérhető, jól reprodukálható biomarkerek kutatására, amelyek jól reprezentálják a tüdő állapotát CF-es betegekben. A biomarkerek segíthetnek a betegség aktivitásának, progressziójának korai felismerésében, terápiás válasz nyomon követésében, valamint új gyógyszerek (pl. CFTR modulátorok) hatásának értékelésében.

A köpet és bronchoalveoláris mosófolyadék (BAL) a légúti gyulladás és fertőzés lokális környezetének tükröi, így ezekben a mintákban számos gyulladásos marker megtalálható (pl. IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , antiproteázok, NE, TGF $\beta$ 1, MMP9), amelyek alkalmas biomarkerek lehetnek a légzésfunkció romlásának jelzésére, illetve a terápiás hatékonyság követésére. Azonban a

mérési eljárások standardizálásának hiányában, illetve a megfelelő minőségű minta biztosításának nehézsége (köpet) és a BAL mintavételezés invazivitása miatt ezek nem kerültek bevezetésre a rutin klinikai gyakorlatba.

A légúti gyulladás nyomon követésének egyik legkézenfekvőbb, analitikailag jól standardizálható és reprodukálható megközelítése a biomarkerek vérmintából – plazmából vagy szérumból – történő meghatározása. A vérvétel rutinszerű, minimálisan invazív beavatkozás, amely életkortól és betegségcsoporttól függetlenül biztonságosan és könnyen kivitelezhető. A szisztémás biomarkerek előnye, hogy tükrözhetik a tüdőben zajló gyulladásos és immunológiai folyamatokat, valamint korrelálhatnak a klinikai állapottal, a tüdőfunkcióval (FEV1), és a CFTR modulátor terápia hatékonyságával. Ugyanakkor jelenleg nincsenek olyan egyértelműen bizonyított és megfelelően érzékeny plazma/szérum alapú biomarkerek, amelyek alkalmasak a kezelés hatékonyságának követésére. Mindezek alapján jelentős igény van az erre a célra alkalmas új, jól reprodukálható, könnyen mérhető biomarkerek kutatására és bevezetésére a CF-es betegek gondozása során.

#### **A Human Epididymis Protein 4 (HE4), mint potenciális biomarker CF-ben**

A HE4, más néven Whey Acidic Protein Four-Disulfide Core Domain Protein 2 (WFDC2), egy kis molekulatömegű glikoprotein, amely a whey acidic protein (WAP) fehérjecsalád tagja. A WFDC proteincsalád kis méretű fehérjéket foglal magában, amelyek különböző, rendszerint protektív funkciót látnak el, például antiproteáz, antibakteriális, vagy gyulladáscsökkentő tulajdonsággal bírnak. A fehérjét eredetileg az epididymis epiteliális sejtjeiben azonosították, de később kimutatták, hogy széles körben expresszálódik a légúti, endometrium, vese- és hasnyálmirigy hámsejtekben is. Mindemellett gyulladásos és immunmodulációs funkcióval is rendelkezik: gátolja a neutrophil eredetű proteázokat, például a neutrophil elasztázt (NE), így a légúti szövetek proteolitikus károsodásának egyik endogén ellensúlyozó tényezője lehet. A HE4 fehérje expresszióját számos egészséges és malignus szövetben kimutatták. Legismertebb klinikai alkalmazása az ovárium carcinoma diagnosztikájához és követéséhez kapcsolódik, de endometrium carcinomában és tüdőtumorban vizsgálták új tumormarkerként.

#### **Az epitheliális-mezenchimális átmenet (EMT) folyamata cisztás fibrózisban**

Az EMT egy olyan transzkripciós újraprogramozási folyamat, amelynek során az epitheliális sejtek elveszítik epitheliális jellegüket, ezáltal meg bomlik az epithelium integritása

és megváltozik a sejtek morfológiája. Ezzel párhuzamosan aktiválódnak a mezenchimális fenotípusra jellemző gének, például a citoszkeletális komponensekhez (vimentin,  $\alpha$ SMA), a sejt-kapcsolatokhoz (N-cadherin) és az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjéihez (kollagén I, fibronectin) kapcsolódó gének. Jelenleg három különböző típusa írható le a folyamatnak. Az embrionális szakaszra jellemző EMT (I. típus) alapvető szerepet játszik a szöveti fejlődésben és az organogenezisben, mely lecsendesített állapotban van normál, egészséges szövetekben. Ugyanakkor az EMT bizonyos patológiás állapotokban is megjelenik, például gyulladásos betegségeknél (II. típus) vagy daganatokban (III. típus). A II. típusú EMT a szöveti remodelling és fibrózis egyik fő hajtóereje a gyulladásos betegségeknél. Ez a folyamat számos krónikus tüdőbetegségben, köztük a cisztás fibrózisban (CF) is kimutatható. Az EMT CF-ben gyakran hibrid vagy részleges formában van jelen, vagyis a sejtek köztes epitheliális/mezenchimális állapotot mutatnak. Ennek megfelelően az EMT-t egy dinamikus, mégis stabil állapotokat magában foglaló spektrumként kell értelmezni. A TGF $\beta$ 1 szintje - mint az EMT egyik legfontosabb mediátora - jelentősen megemelkedett CF-ben, ami elősegíti a tüdőfibrózis kialakulását, amely a fő halálok a betegségben. Ugyanakkor továbbra sem teljesen tisztázott, hogy az EMT aktivációját kizárólag a kóros CFTR funkció váltja-e ki, vagy ebben másodlagos tényezők, például bakteriális fertőzés és krónikus gyulladás is szerepet játszanak.

A CF-ben kórosan működő CFTR ioncsatorna normál körülmények között szerepet játszik az epitheliális transzportfolyamatok szabályozásában, továbbá számos sejt-funkcióban is szerepet kapott, beleértve az epitheliális sejtek differenciálódását, polarizációját és proliferációját, elősegíti a légúti epithelium hatékony regenerációját sérülést követően. Ezzel szemben cisztás fibrózisban a légúti regeneráció késleltetett, amit fokozott proinflammatorikus válasz és megváltozott MMP expresszió kísér (pl.: megnövekedett IL-8 és MMP9 termelés). Emellett leírták, hogy a betegségben megnő a malignitások, különösen a gastrointesztinális daganatok kockázata. Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy a CFTR potenciálisan tumorsuppresszor szerepet tölthet be, és felvetik annak lehetőségét, hogy a CFTR működés zavara összefüggésben állhat az EMT kialakulásával és az onkogenezis folyamataival.

A disszertációban a HE4, mint potenciális biomarker szerepét vizsgáltuk CF-ben a specifikus CFTR modulátor terápia hatékonyságának monitorozásában. Emellett célunk volt a HE4 expresszió szabályozásában résztvevő komplex EMT-s celluláris folyamatok jobb megértése, aminek érdekében *in vitro* légúti epithelsejtekben a HE4 fehérje expressziójának változását és funkcionális kapcsolatát vizsgáltuk az MMP9-cel.

## 2. Célkitűzések

Kísérletes munkámban célul tűztük ki a HE4 fehérje vizsgálatát, mint új prognosztikai biomarker, valamint patofiziológiai mediátor CF-ben. Ennek érdekében vizsgáltuk a CF-es betegek szérum, illetve plazma mintáiban a fehérje koncentráció változását különböző CFTR modulátor kezelések hatására a betegség súlyosságának megállapítása, illetve a terápiás lehetőségek hatékonyságának összehasonlítása céljából. Továbbá a CF-ben emelkedett HE4 expresszió szabályozásában résztvevő komplex celluláris folyamatok jobb megértése érdekében *in vitro* körülmények között légúti epithelsejteken vizsgáltuk a CF-hez társuló EMT folyamatában a HE4 fehérje expressziójának változását, valamint annak funkcionális kapcsolatát az MMP9-cel. Mindezek érdekében az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Kimutatható-e szoros összefüggés a plazma/szérum HE4 szint és a légzésfunkciós paraméter (ppFEV1) értéke között, illetve alkalmas lehet-e a HE4 mérése a CFTR modulátor (Orkambi<sup>®</sup>, Kaftrio<sup>®</sup>) kezelések hatékonyságának nyomon követésére?
- Milyen mértékben tér el a plazma/szérum HE4 koncentráció a CF-es betegekben a kétféle CFTR modulátor (Orkambi<sup>®</sup> és Kaftrio<sup>®</sup>) kezelés hatására?
- A CF-hez társuló EMT-ben hogyan változik a HE4 expressziója és hozzájárul-e az emelkedett MMP9 expressziójához bronchiális epithelsejt kultúrákban *in vitro*?
- Vajon a megváltozott HE4 expresszió elősegíti-e az EMT fenotípus kialakulását a bronchiális epithelsejtekben?

### 3. Anyagok és módszerek

A PhD értekezés alapját képező három eredeti tudományos közleményben számos kísérletes és analitikai módszert alkalmaztunk az *ex vivo* klinikai minták vizsgálatához, valamint az *in vitro* sejtes kísérletek elvégzéséhez. Mivel az egyes vizsgálatok során alkalmazott eljárások között metodikai átfedések vannak, a kísérletekben és laboratóriumi mérésekben használt módszereket nem közleményenként elkülönítve, hanem összevontan, egységesítve mutatom be ebben a fejezetben.

#### A betegek kiválasztása és a klinikai tanulmányok felépítése

A klinikai vizsgálatainkba bevont betegeket összesen 4 főcsoportba soroltuk. Első klinikai vizsgálatunkba 68 Orkambi® kezelt (PROSPECT study-ból kiválogatva), második klinikai vizsgálatunkba pedig összesen 123 Orkambi® (n = 43, 3. kohorsz) és Kaftrio® (n = 51, 1. kohorsz; n = 29, 2. kohorsz) kezelt *p.Phe508del* mutációra homozigóta CF-es beteget válogattunk be plazma és szérum HE4 szintek összehasonlítása céljából. A betegeket két külföldi (Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA U.S. centrumból, Department of Pulmonology, Charles University, Prága, Csehország) és négy hazai CF centrumból (Pécsi Tudományegyetem, Gyermekgyógyászati Intézet, Pécs; Országos Korányi Pulmonológiai Intézet, Budapest; Törökbálinti Tüdőgyógyintézet, Törökbálint; Szent-Györgyi Albert Tudományegyetem, Gyermekgyógyászati Intézet, Szeged) válogattuk be. A CF diagnózisának felállítása az aktuális CF konszenzuson alapuló diagnosztikai kritériumok alapján történt. A beválogatott személyek mindegyike a betegség klasszikus formáját mutatta. A PROSPECT study-ból retrospektív módon 38 gyermek (18 év alatt) és 30 felnőtt CF-es beteg került beválogatásra. A Kaftrio®-kezelésben részesülő CF-es betegek az 1. kohorszban (n = 51) kizárólag felnőttek voltak, ahol a nemek megoszlása 28 nő, valamint 23 férfi. A betegek életkorának mediánja 27 év volt (minimum: 20 év, maximum: 47 év). A 2. kohorsz gyermek- és fiatal felnőttkori betegekből (n = 29) állt. A nemek megoszlása alapján 17 nő és 12 férfi, a medián életkor 12 év volt (minimum: 6 év, maximum: 50 év). Ebben a betegcsoportban a mintavételek a kezelés megkezdése előtt, valamint annak 1–2. és 3–6. hónapjában történtek, lehetővé téve a terápiás válasz időbeli nyomon követését. A két CFTR modulátor hatásának összehasonlítása céljából beválogattunk (n = 43) életkor és nem szerint illesztett Orkambi® kezelt CF-es beteget kontrollként (3. kohorsz), akiknek a medián életkora 14 év volt (minimum: 11 év, maximum: 53 év). A vérmintavétel három időpontban történt, hasonlóan a Kaftrio®-val kezelt 2. kohorsz mintavételi

protokolljához. A vérminták a fent említett időpontokban a járóbeteg kontrollvizsgálatok alkalmával kerültek összegyűjtésre, amikor általában enyhe vagy közép súlyos állapotban voltak a betegek.

A ppFEV1 szerinti alcsoportok Sagel és munkatársai közleménye alapján kerültek meghatározásra, és ennek megfelelően az első vizsgálatba (Orkambi®, n = 68) bevont CF-es betegeket három alcsoportba soroltuk: <50% ppFEV1 (n = 9), 50–89% ppFEV1 (n = 45), ≥ 90% ppFEV1 (n = 14). Mindkét klinikai vizsgálat résztvevői a terápiás válasz alapján két alcsoportba kerültek: „responder” azokat a betegeket, akiknél a ppFEV1 értéke legalább 2,6%-kal (első klinikai vizsgálat, 1. táblázat) vagy 5%-kal (második klinikai vizsgálat) emelkedett a 6 hónapos (Orkambi®, Kaftrio® 2. kohorsz) vagy 3 hónapos (Kaftrio® 1. kohorsz) követési időszak során. Ezzel szemben a „nem responder” csoportba azok a betegek kerültek, akiknél a ppFEV1 növekedése 2,6% vagy 5% alatti volt. Fontos megjegyezni, hogy a vizsgálati időszak alatt egyik CF-es beteg sem tapasztalt akut pulmonális exacerbációt.

A légzésfunkció vizsgálatát spirometriás módszerrel, a ppFEV1 érték alapján, a jelenlegi irányelveknek megfelelően végezték. A verejtékklorid koncentráció analízisét verejték vezetőképesség méréssel végezték az egyeztetett vizsgálati látogatások alkalmával. Fontos megjegyezni, hogy ezek az elemzések azon a napon történtek, amikor a vérmintavétel is történt.

Egy amerikai centrumból 72 CF-es betegtől származó köpetmintákban szintén lemértük a HE4 szintjét és rendelkezésre álltak különböző klinikai paraméterek is. Megvizsgáltuk, hogy köpet HE4 koncentráció korrelál-e a pulmonális exacerbáció súlyosságával, illetve vajon mutat-e összefüggést olyan klasszikus köpetben mért gyulladásos paraméterekkel, mint a NE, IL1-β, MPO és MMP9.

Összegyűjtöttünk továbbá 13 CF-es beteg BAL mintáját azért, hogy meghatározzuk a HE4 szinteket, illetve *in vitro* megvizsgáljuk a CF-es légutakra jellemző megváltozott körülmények komplex hatását a bronchiális epithelsejtekre. A BAL mintákból készítettünk egy mintapoolt, majd a sejtekhez adtuk 20%-os arányban és 48 órán keresztül inkubáltuk. A kezelést követően a sejtekből totál RNS-t izoláltunk, majd az EMT markerek expressziós változásának vizsgálata céljából RT-qPCR analízist végeztük.

### **Plazma, szérum, köpet- és BAL minták HE4 koncentráció mérése**

A vérmintákat vénás punkcióval nyerték, centrifugálták plazmára és szérumra, ezt követően –70 °C-on tárolták, majd szárazjégen futárszolgálattal szállították a Debreceni

Egyetemre további feldolgozás céljából. A köpet és BAL minták tárolása és szállítása is ugyanígy történt. A betegek plazma, szérum, köpet-, illetve BAL mintáiban, továbbá a CFBE sejtek felülúszójában a HE4 koncentrációkat kemilumineszcens mikropartikuláris immunoassay módszerrel mértük meg Architect® i2000SR, illetve i1000SR automatákon (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Németország).

A CFBE sejtek felülúszóját a kezelési idő eltelte után leszívtuk, majd szobahőmérsékleten centrifugáltuk 10000 g-n 1 percig annak érdekében, hogy megszabaduljunk az esetleges sejtektől, sejtörmelékektől. Ugyanígy jártunk el a plazma, szérum, köpet és BAL minták esetén is kiolvasztás után.

### **Sejtkultúrák és kezelési körülményeik**

A CF-es légutakra jellemző sejtes körülményeket biztosító *p.Phe508del*-CFTR mutációt, illetve a vad típusú CFTR-t (wt-CFTR) expresszáló CFBE 41o<sup>+</sup> sejtek Dr. J. P. Clancy laboratóriumából származnak (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA). A sejtek tenyésztéséhez Earl's BSS-t (EBSS) és 1% L-glutamint tartalmazó Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) (Lonza Inc., Morristown, NJ, USA) médiumot használtunk, 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich) és 5 µg/ml Puromycin (Sigma-Aldrich) hozzáadásával. A sejteket 37°C fokon, 5% CO<sub>2</sub> koncentráció mellett inkubáltuk.

A CFBE sejteket immunfluoreszcens (IF) mikroszkópos méréshez 8-well chamber-be (PEZGS0816, Merck Group) ( $2,5 \times 10^4$  sejt/well), RNS izolálás és felülúszóból történő mérésekhez pedig 6-well plate-ekbe passzáltuk ( $2,5 \times 10^5$  sejt/well) 24 órával a kezelés előtt azért, hogy a sejtek letapadjanak, majd az EMT indukálása céljából 37°C fokon 24 óráig TGFβ1-gyel kezeltük, kontrollként pedig 40 mM ecetsav és 0,1 % BSA kombinációját adtuk, valamint a CFTR modulátorok kombinációjával: *lumacaftor* (3 µM) és *ivacaftor* (10 µM) (LUM/IVA) vagy *elexacaftor* (3 µM), *tezacaftor* (5 µM) és *ivacaftor* (10 µM) (ELX/TEZ/IVA) együttes adásával. Utóbbi esetekben a negatív kontrollként DMSO-t használtunk.

A CFTR-csatorna aktivitást FSK (10 µM) és IBMX (100 µM) kombinációjával (FSK/IBMX) fokoztuk mindkét sejtvonal esetén (a CFTR modulátorral kezelt vagy nem kezelt sejteknél is), míg a CFTR gátlás céljából CFTR<sub>inh172</sub>-t (20 µM) adtunk a wt-CFTR-t expresszáló CFBE sejtekhez. A kontroll mintákhoz ebben az esetben is DMSO-t adtunk. A CFTR modulátorok általunk alkalmazott kísérleti körülményei összhangban vannak a korábbi *in vitro* tanulmányokban alkalmazott módszerekkel.

A *p.Phe508del*-CFTR mutációt hordozó CFBE sejteket 24 órával a transzfekció előtt plateltük ( $2,5 \times 10^4$  sejt/well) IF mikroszkópos méréshez 8-well chamber-be (PEZGS0816, Merck Group), illetve RNS izolálás és felülúszóból történő mérésekhez pedig 24-well plate-be ( $5 \times 10^4$  sejt/well), majd 37°C fokon 24 óráig a HE4 expresszióját egy specifikus siRNS (WFDC2 siRNS) segítségével 48 óráig. Kontrollként negatív kontroll siRNS-t (NEG01 siRNA) alkalmaztunk.

A CF-es légúti környezet komplexebb modellezése céljából CF-es betegek BAL mintáiból mintapoolt készítettünk és 48 óráig kezeltük a *p.Phe508del*-CFTR mutációt expresszáló CFBE sejteket 20%-os minta koncentrációban.

### **Sejt-életképesség vizsgálat MTT assay-vel**

A sejtek életképességének vizsgálatára MTT alapú assay-t végeztünk TGF $\beta$ 1 kezelést követően. A sárga színű MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) festéket az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzimjei redukálják és formazán kristályokká alakítják, mely dimetil-szulfoxidban (DMSO, Sigma-Aldrich) feloldva élénk lila színt ad. Az elhalt sejtek nem rendelkeznek aktív mitokondriummal, így nem képesek ezt az átalakítást elvégezni, és nem színeződnek el. A CFBE sejteket (25 000 sejt/well) PLL-lel előkezelt 24-well plate-ben (SPL Life Sciences, Naechon-Myeon, Korea) növesztettük, majd 0-120 órán keresztül TGF $\beta$ 1-nek tettük ki. A kezelést követően a felülúszót eltávolítottuk és minden wellbe 300  $\mu$ L HBSS-ben (Sigma-Aldrich) feloldott MTT oldatot adtunk. Három órás inkubáció után (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, párásított légkörben) az MTT oldatot eltávolítottuk, majd a lila formazán kristályokat 300  $\mu$ L DMSO-ban oldottuk fel. A szín detektálását spektrofotométerrel végeztük (550 nm) és a kapott optikai denzitásból (OD) számoltuk a százalékos értékeket a nem kezelt sejtek OD értékeinek átlagát véve 100%-nak. Pozitív kontrollként H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel (50  $\mu$ M), negatív kontrollként pedig TNF $\alpha$ -val (100 ng/mL) kezeltük a sejteket 48 órán keresztül.

### **A CFTR-csatornán keresztül folyó kloridáram vizsgálata patch clamp módszerrel**

A CFBE sejtekben a kloridáramot ún. „egész sejt” patch-clamp technikával analizáltuk, hasonlóan korábban publikált vizsgálatokhoz. Minden órában friss Mg-ATP oldat került hozzáadásra az intracelluláris oldathoz. Az intracelluláris oldatot jégén tároltuk felhasználás előtt. A FSK/IBMX-et és a CFTR<sub>inh172</sub>-t közvetlenül a mérés előtt adagoltuk az extracelluláris oldathoz. Az elektrofiziológiai mérésekhez használt mikropipetták boroszilikát üvegkapillárisokból (GC150-TF10, Harvard Apparatus Co., Holliston, MA, USA) kerültek felhúzásra 4 fázisban egy Flaming Brown típusú automata pipetta húzóval (Sutter Instruments,

San Rafael, CA, USA). A pipetták hegyátmérője 0,5 - 1  $\mu\text{m}$  volt, ellenállásuk pedig az alkalmazott oldatok esetén 3-10 M $\Omega$ . A mérésekhez Axopatch 200B patch-clamp erősítőt (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) használtunk feszültség-zár üzemmódban, ezáltal a vizsgált sejt membránpotenciálja konstans értéken tartható, miközben a sejtmembránon átfolyó áram nagysága meghatározható. A mérések során Burleigh PCS5000 (Thorlabs Inc., Newton, New Jersey, USA) mikromanipulátort használtunk. Az ingerlő feszültség-impulzusokat és az adatgyűjtést IBM kompatibilis személyi számítógép vezérelte Axon Digidata 1440 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) illesztőegységen keresztül a pCLAMP10 programcsomag (Molecular Devices Inc.) segítségével. Az áramgörbéket 3 pólusú Boxcar szűrővel szűrtük. A rögzített áram -40 mV-ra volt állítva, és kétféle feszültség-clamp protokollt alkalmaztunk a CFTR ionáram mérésére. Elsőként 5 másodpercig tartó, -40 mV-ról 0 mV-ra változó egyszeri depolarizációt alkalmaztunk 4-5 percen keresztül az ionáram monitorizálására, és annak igazolására, hogy számottevő elfolyó ionárammal nem kell számolnunk. Az áram-feszültség (I-V) kapcsolat követésére a sejteket -40 mV-os rögzített feszültségen tartottuk és -80 mV-tól +80 mV-ig terjedő feszültség tartományban depolarizáltuk különböző potenciálokkal, 10 másodpercenként történő 20 mV-os lépésekben. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten végeztük. A vizsgálatok kivitelezésében Dr. Szántó G. Tibor, Dr. Arnódi-Mészáros Beáta és Prof. Panyi György (Debreceni Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet) nyújtottak segítséget.

### **Totál RNS izolálás**

Az CFBE sejtkultúrákból, valamint pulmonális mezenchimális őssejtekből (MSC) és CF-ből származó tüdő eredetű fibroblasztokból (DHLF-CF) kinyerhető össz RNS-t TRI reagens segítségével (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) izoláltuk a gyártó ajánlása szerint. Az RNS minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) ellenőrizzük. Az RNS-mintákat -80°C-on tároltuk további analízis előtt.

### **A HE4 expresszió gátlása siRNS transzfekcióval CFBE sejtekben**

A *p.Phe508del*-CFTR mutációt hordozó CFBE sejteket 24 órával a transzfekció előtt (25 000 sejt/well) plateltük 24-well plate-re. A mutáns CFBE sejtekben a HE4 (WFDC2) expresszióját egy specifikus siRNS segítségével csökkentettük (20 pmol, ID: 4392420, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a gyártó utasításai szerint, 48 órás inkubációs idővel. Kontrollmintaként negatív kontroll siRNS-t (NEG01 siRNA) alkalmaztunk (Silencer Select

Negative Control No.1, 20 pmol, ID: 4390846, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), illetve a sejtekbe történő bejutáshoz szükséges lipofectaminnal (13778100; Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) előzetesen 5 percig inkubáltuk az siRNS-eket. A transzfekció hatékonyságát a HE4 expresszió fehérjeszintű (immunfluoreszcens mikroszkópiával, IF) és mRNS-szintű (RT-qPCR) kimutatásával ellenőriztük.

### **Valós idejű kvantitatív PCR analízisek**

Az izolált RNS mintákból az RT-qPCR-hoz szükséges komplementer DNS szintézist High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Vilnius, Litvánia) segítségével végeztük. A DNS készítéshez használt RNS mennyisége 1000 ng volt a CFBE sejtek esetén. Az RT-qPCR elvégzése céljából egy LightCycler 480 qPCR készüléket (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) használtunk. A HE4 expresszió, illetve EMT markerek és egyéb gyulladásos markerek (pl.: E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, IL1B mRNS-ek) kvantálása során a LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics) reagenst, valamint minden RNS-re specifikus oligonukleotid primert (10 µM, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) használtunk (5. táblázat). A PCR reakció lefuttatásához az alábbi protokollt állítottuk be a készüléken: 10 percig 95°C-on, majd 40 cikluson át 95°C-on 10 mp-ig, illetve 60°C-on 1 percig. Az összes mérést triplikátumban végeztük. Referenciagénként az *RPLP0* (36B4) gént, illetve a transzfekció specificitásának igazolására emellett még a *GAPDH* gént is alkalmaztuk. A transzfekció hatékonyságát részben a HE4 expresszió mRNS-szintű kimutatásával ellenőriztük. Ezen túlmenően értékeltük az EMT markerek és az MMP9 expresszióját is. Az RNS expressziós szinteket az alábbi formulával határoztuk meg, példaként a HE4 RNS-t véve:  $\Delta Cq = Cq_{36B4} - Cq_{HE4}$ , míg a célgénben bekövetkezett változás mértéke a referenciagénhez viszonyítva a következőképpen lett konvertálva:  $F = 2^{\Delta Cq}$ .

### **Az MMP9 és N-cadherin fehérjék detektálása ELISA módszerrel**

A sejtfehérjék mintákban az MMP9 fehérje (DMP900; Human MMP-9 ELISA Kit – Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), illetve az N-cadherin fehérje (EH0050; Human CDH2 (Neural Cadherin) ELISA kit, Finetest, Wuhan, Hubei, China) koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg azért, hogy megerősítsük a HE4 expresszió megváltozásának közvetlen hatását az MMP9 termelésre, valamint az EMT folyamatának az elindulását/fokozódását különböző *in vitro* végzett kezelések hatására.

## Immunfluoreszcens (IF) mikroszkópos vizsgálatok

Az EMT-re jellemző fenotípus kimutatását CFBE sejtkultúrákban immunfluoreszcens festéssel (IF) végeztük az EMT specifikus markerek (E-cadherin, N-cadherin, Vimentin) fehérje szintű vizsgálatának céljából. Ehhez a vad típusú (wt-CFTR) és a *p.Phe508del*-CFTR mutációt hordozó CFBE sejteket speciálisan erre a célra gyártott 8-well chamber-ben tenyésztettük ( $2,5 \times 10^4$  sejt/well), majd kezeltük két napon keresztül. Az EMT-re jellemző markerek pozitívítását a sejtmembránban mindkét sejtvonal esetében először a genotípus alapján figyeltük meg. Az EMT folyamatát ezt követően *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben TGF $\beta$ 1 (15 ng/mL) hozzáadásával 48 órán keresztül indukáltuk, míg a kontrollminták csak a kezelőanyag oldószerét kapták. A CFTR-modulátor kezelés EMT-re gyakorolt hatásának vizsgálatokor a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejteket *elixacaftorral* (3  $\mu$ M), *tezacaftorral* (5  $\mu$ M) és *ivacaftorral* (10  $\mu$ M), illetve kontrollként DMSO-val inkubáltuk 24 órán át. A sejteket ezt követően jéghideg metanol–aceton (50 v/v%) oldattal fixáltuk 10 percig. A nem specifikus antitestkötődési helyeket FBS-sel (Merck Group) blokkoltuk 15 percig.

Az EMT markerek primer jelöléséhez az alábbi antitesteket alkalmaztuk 1 órás inkubálással: monoklonális egér anti-humán E-cadherin (610181) és N-cadherin (610920) (250  $\mu$ g/mL, BD Biosciences), poliklonális nyúl anti-HE4 (AB273130) és anti-MMP9 (AB73734) (100  $\mu$ g/mL, Abcam). A szekunder jelölést FITC-cel konjugált kecske anti-egér (A11029) és anti-nyúl (A11034), illetve rhodaminnal konjugált kecske anti-egér IgG (2 mg/mL, hígítás: 1:400, Thermo Fisher Scientific Inc.) antitestekkel végeztük 1 órán keresztül. A Ki67-fehérje festését (AB15580, 100  $\mu$ g/mL, Abcam) azon sejtek azonosítására használtuk, amelyek aktívan osztódtak, és a sejtciklus növekedési fázisában voltak, HE4 expresszióval rendelkező és siRNS transzfektált sejtek esetében is. A sejtmagokat 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI, 283 nM) festettük meg, és a mintákat Zeiss Axio Scope.A1 fluoreszcens mikroszkóppal (HBO 100 lámpa; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Németország) vizsgáltuk. A képeket ZEN 2012 v.1.1.0.0 szoftverrel (Carl Zeiss Microimaging GmbH) elemeztük, és minden marker esetében átlagos fluoreszcenciaintenzitást (MFI) számítottunk a pozitívítás mértékének kvantifikálására. Az immunfestés specificitását szekunder antitesttel történő inkubálással ellenőriztük, és háttérfestődést nem tapasztaltunk. A vizsgálatok kivitelezésében Dr. Fenyvesi Ferenc és Dr. Rusznyák Ágnes (Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai Tanszék) nyújtottak segítséget.

## **Etika engedélyek**

A kutatást a Debreceni Egyetem Regionális Etikai Bizottsága (engedélyszám: 4813–2017) és a Magyar Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKEB) (engedélyszám: IV/10417–3/2020/EKU, engedély kelte: 2020. december 29.) hagyta jóvá a World Medical Association Helsinki Nyilatkozatának – az emberi alanyokat érintő orvosi kutatások etikai elveinek – megfelelően.

## **Statisztikai elemzések**

Az adatokat átlag  $\pm$  95%-os konfidencia intervallumban (95% CI) illetve ahol jeleztük, mediánként (1. és 3. kvartilis, IQR), vagy mediánként (min-max) formában adtuk meg. Az adatok normalitásának vizsgálatára a Shapiro–Wilk és Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztuk. A normál eloszlású adatok két csoport közötti összehasonlítását párosított t-próbával végeztük, míg a nem normál eloszlású változók esetében a Mann–Whitney U-próbát használtuk két csoport adatainak összehasonlítására. Amikor a kiindulási és az után követéses minták eredményeit hasonlítottuk össze, a Wilcoxon-féle párosított tesztet alkalmaztuk. Több csoport összevetésekor a parametrikus ANOVA vagy a nem parametrikus Friedman tesztet alkalmaztuk Dunn-féle *post-hoc* analízissel. A Spearman-féle rangkorrelációs együtthatót ( $r$ ) használtuk a plazma HE4 és a ppFEV1, valamint a verejtékklorid koncentráció és a BMI abszolút vagy delta értékei közötti összefüggések vizsgálatára. A többszörös logisztikus regressziós elemzést annak értékelésére alkalmaztuk, hogy mely kovariánsok befolyásolják leginkább a „responder” státusz valószínűségét a LUM/IVA kezelés megkezdését követő 6. hónapban. A ROC-görbe (receiver operating characteristic) alatti terület AUC (area under the curve) értékét mind az abszolút, mind a delta HE4 esetében meghatároztuk annak vizsgálatára, hogy a tüdőfunkció javulása kimutatható-e ezekkel a paraméterekkel Kaftrio® vagy Orkambi® kezelés mellett a 3. vagy 6. hónapban (az alcsoporttól függően). A ppFEV1 átlagos változásának 2,6%-át (LUM/IVA) és 5%-át (Kaftrio® vagy Orkambi®) határoztuk meg a bináris változó határértékeként. A delta HE4 esetében az AUC értéket külön is elemeztük, amikor a 5%-os delta ppFEV1-t választottuk határértéknek, mivel ez a mértékű tüdőfunkció javulás várható egy a kezelésre jól reagáló („responder”) betegről. A cut-off vagy küszöb értéket a Youden-index maximuma alapján határoztuk meg (szenzitivitás, specificitás, PPV, NPV). A  $p < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az adatfeldolgozást és statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) és az SPSS Statistics 26.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) szoftverekkel végeztük.

## 4. Eredmények

### A plazma HE4 koncentráció vizsgálata *p.Phe508del*-CFTR mutációra homozigóta CF-es betegekben Orkambi® kezelés hatására

Az irodalmi adatok alapján munkacsoportunk elsőként kezdte el vizsgálni a HE4 fehérje plazma/szérum koncentrációját a CF-es betegek laboratóriumi vizsgálata érdekében nem tumormarkerként, mint ahogyan korábban alkalmazták malignus kórképekben, hanem mint egy új típusú gyulladásos paraméter. Kíváncsiak voltunk, hogy vajon a plazma HE4 alkalmas lehet-e az Orkambi® kezelés hatékonyságának a monitorozására CF-es betegekben. Vizsgálataink elején még csak az Orkambi® volt elérhető, mint CFTR modulátor, majd idő közben vált elérhetővé a Kaftrio®. Így elsőként az Orkambi® kezelésben részesült betegekre vonatkozó eredményeket mutatom be.

### Különböző klinikai paraméterek és a plazma HE4 szint változásai LUM/IVA (Orkambi®) kezelés hatására

A verejtékklorid koncentráció átlagosan  $-18,1$  mmol/L-rel csökkent (95% CI:  $-22,3 - -15,0$ ) a LUM/IVA kezelés megkezdését követő 1 hónapon belül, és ez a csökkent érték a 6. hónapban is fennállt (átlagos változás:  $-18,9$  mmol/L; 95% CI:  $-24,5 - -14,8$ ) a kezelés előtti adatokhoz képest. A ppFEV1 érték tekintetében mérsékelt, statisztikailag nem szignifikáns változás volt megfigyelhető az 1–6 hónapos követési időszak alatt: az 1 hónapos átlagos változás 1,6% (95% CI:  $-0,4 - 3,6$ ), míg a 6 hónapos 2,6% (95% CI:  $0,6 - 4,5$ ) volt ebben az alcsoportban, ellentétben a teljes vizsgálati populációban korábban kimutatott eredményekkel. A tápláltsági állapot ugyanakkor jelentősen javult, amit a testtömegindex (BMI) folyamatos emelkedése is jelzett a vizsgálat során,  $0,73$  kg/m<sup>2</sup> átlagos növekedéssel (95% CI:  $0,42 - 0,98$ ) a 6. hónap végére.

A plazma HE4 koncentráció a LUM/IVA kezelés megkezdése előtt hasonló volt más, IVA kezelés előtti CF-es esetekhez — medián (IQR):  $68,5$  ( $56,6-87,3$ ) pmol/L, míg egy korábbi vizsgálatunkban  $63,1$  ( $47,9-97,5$ ) pmol/L értéket mértünk. A plazma HE4 szint a kezelés megkezdését követően minden vizsgált időpontban csökkent, a legnagyobb változás (delta érték) a 6. hónapban volt megfigyelhető:  $-10,7$  pmol/L (95% CI:  $-15,4 - -5,9$ ) a kezelés előtti szinthez képest. Érdekes módon a HE4 átlagos változása a 12. hónapra kisebb mértékű volt ( $-6,5$  pmol/L, 95% CI:  $-12,4 - -0,5$ ), ami mérsékeltebb tüdőfunkció-javulással járt együtt (delta ppFEV1: 1,0%, 95% CI:  $-1,7 - 3,8$ ) a vizsgálati időszak végére.

A Spearman-féle korrelációs vizsgálat alapján a ppFEV1 változása az 1. és 6. hónapban nem mutatott szignifikáns összefüggést a verejtékklorid koncentráció változásával sem az 1. ( $r = 0,0595$ ;  $P = 0,6403$ ), sem a 6. hónapban ( $r = 0,0148$ ;  $P = 0,9117$ ). Mindezek alapján az volt a célunk, hogy felmérjük a plazma HE4, mint potenciális biomarker használhatóságát a LUM/IVA CFTR modulátor terápia hatásának nyomon követésében a vizsgálati időpontok során.

### **A plazma HE4 szint változás korrelációjának vizsgálata légzésfunkció javulásával (ppFEV1) LUM/IVA kezelés hatására**

Elsőként megvizsgáltuk a plazma HE4 koncentráció és a ppFEV1 értékek közötti összefüggést a LUM/IVA kezelés megkezdésekor és a 6. hónapban, amikor a legnagyobb tüdőfunkció javulás volt kimutatható. A ppFEV1 értékek ugyanazon a napon kerültek meghatározásra, amikor a vérmintavétel történt. A vizsgálat eredményei alapján szignifikáns, fordított korreláció áll fenn a kezelés előtti HE4 szintek és a ppFEV1 értékek között ( $r = -0,5661$ ;  $P < 0,0001$ ). Hasonlóképpen, negatív összefüggés volt kimutatható a plazma HE4 koncentrációk és a ppFEV1 értékek között a LUM/IVA kezelés 6. hónapjában is ( $r = -0,5294$ ;  $P < 0,0001$ ).

Ezzel párhuzamosan a HE4 szintjének változása a kiindulási értékhez képest (azaz a delta HE4) szintén szoros negatív korrelációt mutatott a delta ppFEV1 értékével ( $r = -0,5297$ ;  $P < 0,0001$ ) az összes vizsgálati résztvevő esetében. Amikor pedig az összefüggést külön elemeztük a 18 év alatti betegek alcsoportjában, a korreláció még erőteljesebbnek bizonyult gyermekkorban ( $r = -0,7053$ ;  $P < 0,0001$ ).

Amikor az abszolút HE4 koncentrációt a kezelés előtti és a 6 hónapos időpontban értékeltük a kiindulási ppFEV1 alapján ( $< 50\%$ ,  $50-89\%$  és  $\geq 90\%$ ), a kezelés előtti és 6 hónapos HE4 szintek szignifikánsan magasabbak voltak azokban a betegekben, akiknek kiindulási ppFEV1 értéke  $< 50\%$  volt, összehasonlítva a másik két alcsoporttal. Fontos kiemelni, hogy a legnagyobb és statisztikailag szignifikáns átlagos HE4 változást azokban a (többségében felnőtt) cisztás fibrózisos betegekben figyeltük meg, akiknek a kezelés megkezdése előtt súlyosan károsodott volt a tüdőfunkciója ( $< 50\%$  ppFEV1). Ezzel szemben a legkisebb, statisztikailag nem szignifikáns változások azoknál a betegekben jelentkeztek, akiknek kiindulási ppFEV1 értéke  $\geq 90\%$  volt.

## **A plazma HE4 szint változás vizsgálata a CF-es tüdőbetegség javulásának előre jelzésében LUM/IVA terápia alatt.**

Elsőként azt vizsgáltuk, hogy a LUM/IVA kezelés hatására bekövetkező HE4 szint csökkenés előre jelzi-e a tüdőfunkció javulását, amelyet a delta ppFEV1 értékek alapján határoztunk meg. Ennek érdekében megvizsgáltuk a delta HE4 diszkriminatív képességét, amikor a 6 hónap alatti ppFEV1 változás 2,6%-os értékét – vagyis a vizsgált betegcsoport átlagát – használtuk bináris határértékként. A delta HE4 esetében jelentős AUC-érték adódott (0,7898 [95% CI: 0,6823–0,8972],  $P < 0,0001$ ), a  $-10,7$  pmol/L-es cut-off pedig 62%-os szenzitivitást és 79%-os specificitást mutatott az összes vizsgált beteg körében.

Gyermekek esetében a delta HE4 még nagyobb prediktív erővel bírt (AUC: 0,9139 [95% CI: 0,8268–1,0000],  $P < 0,0001$ ), és ugyanezen cut-off érték mellett a szenzitivitás 80%-ra, a specificitás pedig 83%-ra emelkedett. Amikor a „jó terápiás válasz” elvárt javulását jelentő 5%-os delta ppFEV1 értéket alkalmaztuk határértékként, a teljes betegcsoportban a HE4 AUC-értéke 0,6786 volt (9 % CI: 0,5523–0,8048;  $P = 0,0139$ ),  $-11,8$  pmol/L-es cut-off mellett 73% szenzitivitással és 74% specificitással. Gyermekek körében az AUC magasabb volt (0,7913 [95% CI: 0,6481–0,9345],  $P = 0,0027$ ), azonban ugyanazon cut-off érték mellett a szenzitivitás 50%, míg a specificitás 74% volt.

Amikor a CF-ben szenvedő betegeket a terápiás válasz alapján két alcsoportra osztottuk — vagyis „reszponder” csoportba soroltuk azokat, akiknél a ppFEV1 legalább 5%-os átlagos javulást mutatott 6 hónap LUM/IVA kezelés után, míg a „nem rezponder” csoportba azokat, akiknél a delta ppFEV1 ennél kisebb volt — azt találtuk, hogy szignifikáns plazma HE4 csökkenés kizárólag a „reszponder” betegekben volt megfigyelhető, akiknél a 6 hónap alatt a vártnak megfelelő tüdőfunkció javulás következett be. Ezzel szemben a verejtékklorid koncentráció és a BMI mindkét alcsoportban szignifikánsan változott. Ez arra utal, hogy míg a verejtékklorid és a BMI jól tükrözi a LUM/IVA kombináció általános hatását, nem alkalmasak a terápiás válasz mértékének megítélésére, és nem különítik el a „reszponder” és „nem rezponder” betegeket egymástól.

Végül többváltozós logisztikus regressziós analízist végeztünk annak vizsgálatára, hogy mely tényezők befolyásolják leginkább a rezponder státusz valószínűségét. A vizsgált kovariánsok a következők voltak: delta HE4, életkor, nem, kiindulási ppFEV1, verejtékklorid koncentráció, BMI, valamint a *P. aeruginosa* pozitivitás a kezelés indítását követő 6. hónapban. Az eredmények szerint a delta HE4 (OR: 0,89; 95% CI: 0,82–0,95;  $P = 0,001$ ) és a kiindulási

ppFEV1 (OR: 1,09; 95% CI: 1,02–1,16; P = 0,005) független prediktor tényezőknek bizonyultak a reszponder státusz szempontjából a nem reszponder csoporthoz viszonyítva.

### **A szérums HE4 koncentráció vizsgálata *p.Phe508del*-CFTR mutációra homozigóta CF-betegekben Kaftrio® kezelés hatására**

Második klinikai vizsgálatunkban az Orkambi®-ra irányuló méréseink ideje alatt forgalomba került Kaftrio® kezelésben részesült CF-es betegek szérums HE4 szintjét analizáltuk. Ebben a vizsgálatban a Orkambi® kezelt CF-es betegeket egyfajta kontroll csoportként kezeltük a két CFTR modulátor kezelés hatékonyságának összehasonlítása érdekében. Kíváncsiak voltunk, hogy a HE4 alkalmas biomarker lehet-e a Kaftrio® kezelés hatékonyságának a monitorozására CF-es betegek esetén, illetve *in vitro* körülmények között is vizsgáltuk a két CFTR modulátor CFTR korrigáló hatásának összehasonlítását.

### **A LUM/IVA (Orkambi®) és ETI (Kaftrio®) kezelés hatásának összehasonlítása a szérums HE4 szintek változásán keresztül**

Mivel a plazma HE4 szint jelentős változást mutatott a LUM/IVA kezelés hatására, kíváncsiak voltunk, hogy vajon hogyan alakul ETI kezelés hatására a fehérje koncentrációja a CF-es betegek szérumában. Elsőként meghatároztuk a szérums HE4 szintet két Kaftrio® kezelésben részesülő, *p.Phe508del*-CFTR mutációra homozigóta CF-es betegcsoportban. Az 1. kohorsz felnőtt betegeiben a tüdőfunkció jelentős javulása mellett (ppFEV1: 17,5 [14,5–20,5] %) a szérums HE4 koncentráció szignifikánsan csökkent ( $p < 0,0001$ ) a kezelés 3. hónapjára, függetlenül a kiindulási értéktől. Ez az időpont volt az egyetlen után követéses vizsgálat ebben a betegcsoportban, mivel a COVID-19 pandémia kitörése miatt további mintavételekre nem volt lehetőség. A 2. kohorszban a legtöbb CF-es beteg esetében szintén javult a tüdőfunkció, az átlagos ppFEV1-változás 4,0 [–3,9–12,1] % volt. A szérums HE4 szint már a Kaftrio®-kezelés 1–2. hónapjában fokozatos csökkent ( $p = 0,0076$ ), amely a 3–6. hónapra tovább erősödött ( $p < 0,0001$  a kiindulási értékhez képest). Ezzel párhuzamosan az Orkambi®-val kezelt betegek (itt egyfajta kontroll csoportként a Kaftrio® kezelt betegek vizsgálata során) körében is szignifikánsan alacsonyabb szérums HE4 értékeket figyeltünk meg a követéses vizsgálatok során ( $p = 0,0010$  az 1–2. hónapban, illetve  $p < 0,0001$  a 3–6. hónapban a kezelés előtti értékekhez viszonyítva). Fontos megjegyezni, hogy a Kaftrio®-val és Orkambi®-val kezelt betegek között a kiindulási HE4 szintben nem volt különbség ( $p = 0,3422$ ). Ugyanakkor az ETI kezelésben (Kaftrio®) részesülőkben a HE4 koncentrációk minden követéses időpontban szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a LUM/IVA (Orkambi®) csoportban ( $p = 0,0158$  az

1–2. hónapban, illetve  $p = 0,0474$  a 3–6. hónapban), ami összefüggést mutatott a tüdőfunkció javulásának mértékével.

Az egyéneken belüli HE4 szint változásokat külön elemeztük és azt találtuk, hogy a legtöbb betegnél a szérums HE4 koncentráció csökkent a kezelés előtti és az utolsó követés időpont között. Az 1. kohorszban a szérums HE4 szint a 3 hónapos ETI kezelést követően jelentősen csökkent a kiindulási értékhez képest, az átlagos delta HE4  $-45,7$  pmol/L volt, miközben a ppFEV1 átlagos javulása 17,5%-ot ért el. A 2. kohorszban az ETI-kezelt CF-es betegek esetében a 3–6 hónapos kezelés alatt a ppFEV1 átlagosan 4,0%-kal nőtt, a HE4 átlagos változása pedig  $-20,7$  pmol/L volt. Ezzel szemben az Orkambi® kezelésben részesülő betegek esetében mindössze 1,6%-os ppFEV1 növekedést tapasztaltunk, a HE4 átlagos csökkenése pedig  $-18,5$  pmol/L volt a 3–6. hónapra. Ezek a klinikai eredmények alátámasztják, hogy a CFTR modulátor terápia hatékonyan járulnak hozzá a szérums HE4 koncentráció csökkenéséhez CF-ben. Továbbá, a Kaftrio® kedvezőbb terápiás hatása az Orkambi®-val szemben a tüdőfunkció javulásának tekintetében sikeresen nyomon követhető volt a szérums HE4 szintek változásán keresztül.

#### **A szérums HE4 szint változás korrelációjának vizsgálata légzésfunkció (ppFEV1) javulásával LUM/IVA és ETI kezelés hatására**

A szérums HE4 szinteket összevetettük a ppFEV1 értékekkel az ETI kezelt vizsgálati alcsoportokban is, ahol kontroll csoportnak tekintettük a LUM/IVA kezelés alatt álló betegcsoportot.

Minden kohorszban szignifikáns, fordított korrelációt találtunk a HE4 és ppFEV1 értékek között: az 1. kohorszban (Kaftrio®)  $r = -0,422$ ;  $p = 0,0020$ , a 2. kohorszban (Kaftrio®)  $r = -0,537$ ;  $p < 0,0001$ , míg az Orkambi®-val kezelt csoportban  $r = -0,575$ ;  $p < 0,0001$  értékeket mértünk. Ezzel párhuzamosan a HE4 szintjének változása a kiindulási értékhez képest (azaz a delta HE4) szintén jelentős negatív korrelációt mutatott a delta ppFEV1 értékével az összes vizsgálati résztvevő esetében: az 1. kohorszban  $r = -0,559$ ;  $p = 0,0001$ , a 2. kohorszban  $r = -0,591$ ;  $p = 0,0048$ , míg a LUM/IVA kezelést kapó csoportban  $r = -0,511$ ;  $p = 0,0017$  értékeket kaptunk. A szérums HE4 szint tehát erősen korrelált a ppFEV1 értékekkel, ami arra utal, hogy az összefüggés a CFTR modulátorok által kiváltott tüdőfunkció javulással állhat kapcsolatban. Különösen figyelemre méltó, hogy a delta HE4 értékek még jobban tükrözték a ppFEV1 változásait, különösen a 2. kohorszban, amelybe viszonylag fiatal, ETI kezelésben részesülő CF-es betegek tartoznak.

## **A szérum HE4 koncentráció változás vizsgálata a CF-es tüdőbetegség javulásának előre jelzésében LUM/IVA és ETI kezelés alatt**

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy vajon a HE4 szint csökkenés összefügg-e a tüdőfunkció javulásával a Kaftrio® kezelés hatására – csakúgy, mint az Orkambi® kezelés esetén –, amelyet szintén a ppFEV1 változásával határoztunk meg. Ennek érdekében meghatároztuk a delta HE4 megkülönböztető képességét akkor, amikor a ppFEV1 3 vagy 6 hónap alatt bekövetkező 4,0%-os változását vettük bináris határértékként mindkét Kaftrio® kohorszban, valamint a Kaftrio® kezelés alatt álló teljes betegcsoport két életkor szerint meghatározott alcsoportjában. A felnőtt CF-es betegekből álló 1. kohorszban a delta HE4 esetében jelentős AUC értéket kaptunk (0,765 [95% CI 0,633–0,898],  $p = 0,0012$ ). A  $-42,4$  pmol/L-es cut-off érték 68,0%-os szenzitivitást és 69,0%-os specificitást mutatott. A gyerekeket és felnőtteket egyaránt magában foglaló 2. kohorszban hasonlóan magas AUC érték adódott (0,789 [95% CI 0,668–0,909],  $p = 0,0003$ ), ahol a  $-20,3$  pmol/L-es cut-off 77,4%-os szenzitivitást és 70,8%-os specificitást biztosított. Ezzel párhuzamosan az Orkambi®-val kezelt betegek (kontroll csoport) esetében a delta HE4 AUC értéke 0,809 volt (95% CI 0,648–0,969;  $p = 0,0023$ ),  $-17,2$  pmol/L-es cut-off mellett 78,9%-os szenzitivitással és 80,0%-os specificitással.

A Kaftrio® kezelt betegek körében a HE4 átlagos változása hasonló prediktív értékkel bírt mind gyermekekben (AUC: 0,791 [95% CI 0,594–0,988],  $p = 0,0242$ ), mind felnőttekben (AUC: 0,788 [95% CI 0,624–0,953],  $p = 0,0042$ ). A cut-off értékek gyermekeknél  $-14,6$  pmol/L, felnőtteknél  $-21,6$  pmol/L voltak, amelyekhez rendre 72,7% és 80,0%-os szenzitivitás, illetve 77,8% és 81,3%-os specificitás társult.

A kiindulási, abszolút HE4 szintek diagnosztikai jellemzőit is elemeztük annak megítélésére, hogy képesek-e előre jelezni a CFTR modulátor kezelésre adott klinikai választ, amelyet a ppFEV1 3–6 hónap alatt bekövetkező 4,0%-os javulása alapján határoztunk meg. Azonban egyik vizsgált kohorszban sem mutatkozott statisztikailag szignifikáns összefüggés: sem a Kaftrio® kezelés esetében (AUC: 0,618 [95% CI 0,365–0,872],  $p = 0,3600$ ), sem pedig az Orkambi® kezelés során (AUC: 0,698 [95% CI 0,513–0,883],  $p = 0,050$ ). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a delta HE4 – és nem az abszolút HE4 érték – alkalmas a Kaftrio® kezelés kedvező hatásainak hatékony jelzésére.

## A két különböző CFTR modulátor (LUM/IVA és ETI) CFTR korrigáló hatásának összehasonlítása a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben

Annak érdekében, hogy a CFTR funkció CFTR modulátorokkal történő helyreállítását megvizsgáljuk, a légúti epithelsejteken „egész sejt” patch-clamp technikát alkalmazva követtük nyomon a kezelőanyagok CFTR ioncsatornán átfolyó kloridáramra gyakorolt hatását. Munkacsoportunk korábbi eredményeit, melyben *in vitro* humán *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE sejteken két különböző CFTR modulátor kombináció (LUM/IVA vagy TEZ/IVA) kezelés hatása került analízisre, alapul vettük alapul további vizsgálatainkhoz.

Jelen tanulmányunkban ugyanezzel a módszertannal hasonlítottuk össze a Kaftrio® és az Orkambi® hatását a kloridcsatorna működésére, amelyben a *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE sejteket 24 órán át ELX/TEZ/IVA-val vagy LUM/IVA-val kezeltük, illetve összevetettük a kezeletlen kontrollokkal. Párhuzamosan kezeletlen, wt-CFTR-t expresszáló CFBE sejteket is vizsgáltunk kontrollként.

Az ionáram mérését elvégeztük FSK/IBMX aktivátor kombináció hiányában, majd FSK/IBMX jelenlétében, végül pedig CFTR szelektív inhibitor CFTR<sub>inh172</sub> hozzáadását követően. Az összehasonlíthatóság megkönnyítése érdekében a Cl<sup>-</sup> áram nagyságát a sejtkapacitásra normalizáltuk, így kaptuk meg az áramsűrűséget, amelyet minden sejt esetében legalább három, 5 másodpercenként ismételt depolarizáció átlagából számoltunk. Az ionáramot -40 mV rögzített potenciálról kiindulva 0 és +60 mV közötti tesztpotenciálokra adott feszültség léptékekkel váltottuk ki 20 mV-os lépésekben 10 másodpercenként a légúti epithelsejteken. A vad típusú CFTR-t expresszáló CFBE 41o<sup>-</sup> sejtekben a kloridáram jelentősen növelhető volt a FSK/IBMX hatására és egyben gátolható volt a CFTR szelektív inhibitor CFTR<sub>inh172</sub> alkalmazásával. Ezzel szemben a *p.Phe508del*-CFTR-t hordozó CFBE sejtekben az FSK/IBMX nem váltott ki kloridáramot. Mind a LUM/IVA, mind pedig az ELX/TEZ/IVA előkezelés szignifikánsan megnövelte a bazális kloridáram. Az ELX/TEZ/IVA előkezelés hatása lényegesen erőteljesebb volt: a bazális áramsűrűség a következőképpen alakult (pA/pF): kezeletlen *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtek:  $2,8 \pm 1,3$  (n = 8); LUM/IVA-val előkezelték:  $24,9 \pm 5,8$  (n = 10; p = 0,0044); ELX/TEZ/IVA-val előkezelték:  $99,4 \pm 14,2$  (n = 15; p < 0,0001). Az FSK/IBMX mindkét CFTR<sub>m</sub> kezelés (LUM/IVA és ELX/TEZ/IVA) esetén szignifikánsan növelte a kloridáramot a *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló sejtekben, és ezek az áramok nagyobbak voltak, mint a kezelés nélküli állapotban mért értékek. Ezen felül az ELX/TEZ/IVA-val kezelt sejtekben az FSK/IBMX által indukált áram nagysága szignifikánsan meghaladta a LUM/IVA-val előkezelt sejtek értékeit ( $138,0 \pm 13,8$  (n = 16) vs.  $31,3 \pm 7,7$  (n = 10) pA/pF; p

< 0,0001). Az ionáram érzékeny volt a CFTR<sub>inh172</sub> gátló hatására: a 20  $\mu$ M CFTR<sub>inh172</sub> az FSK/IBMX által kiváltott ionáramokat az inhibitor nélkül mért értékek kb. 10%-ára csökkentette. Összefoglalva, mindkét CFTR modulátor kombináció hatékonyan korrigálta a *p.Phe508del*-CFTR ioncsatorna működését; azonban a Kaftrio<sup>®</sup> (ELX/TEZ/IVA) előkezelés lényegesen hatékonyabbnak bizonyult, mint az Orkambi<sup>®</sup> (LUM/IVA), ami összhangban áll a klinikai tapasztalatokkal.

#### **Az ELX/TEZ/IVA kezelés csökkentette a HE4 koncentrációt a CFBE 41o<sup>-</sup> sejtkultúrák felülúszójában *in vitro* körülmények között**

A CFTR modulátorok HE4 expresszióra kifejtett hatásának vizsgálatához a *p.Phe508del*-CFTR CFBE 41o<sup>-</sup> sejteket kezeltük az ELX/TEZ/IVA (Kaftrio<sup>®</sup>) hármas kombinációval, illetve a LUM/IVA (Orkambi<sup>®</sup>) kettős kombinációval 24 órán keresztül. A kezelés után a HE4 koncentrációját a sejtkultúra felülúszójában határoztuk meg. Kontrollként wt-CFTR-t expresszáló CFBE 41o<sup>-</sup> sejteket is vizsgáltunk. Korábbi eredményeinkkel összhangban a bazális HE4 szekréció szignifikánsan magasabb volt a *p.Phe508del*-CFTR sejtekben, mint a vad típusú kontroll sejtekben ( $p < 0,001$ ). Mindkét modulátor kezelés szignifikáns HE4 szint csökkenést eredményezett a DMSO-val kezelt mintákhoz viszonyítva ( $p < 0,001$  mindkét esetben). Az ELX/TEZ/IVA kombináció pedig jelentősebb mértékben csökkentette a HE4 koncentrációját, mint a LUM/IVA ( $p < 0,01$ ).

Egy másik kísérletben az FSK/IBMX aktivátorral önmagában vagy a CFTR modulátorokkal kombinálva kezeltük a *p.Phe508del*-CFTR sejteket. Az FSK/IBMX önálló alkalmazása is szignifikánsan mérsékelte a HE4 szinteket ( $p < 0,001$ ), feltehetően a reziduális CFTR funkció aktiválásán keresztül. Figyelemre méltó módon az FSK/IBMX + CFTRm kombinációja még tovább csökkentette a HE4 expressziót, és ez a hatás szignifikáns volt az FSK/IBMX önálló kezeléssel összehasonlítva is ( $p < 0,05$ ), ami a terápiás hatások additív jellegére utal.

A CFTR funkció és a HE4 expresszió közötti fordított kapcsolat mélyebb megértése érdekében a CFTR gátlás hatását vizsgáltuk wt-CFTR-t expresszáló CFBE 41o<sup>-</sup> sejtekben. A CFTR<sub>inh172</sub> inhibitor alkalmazása szignifikáns HE4 koncentráció emelkedést eredményezett a sejtek felülúszójában ( $p < 0,05$ ), ami alátámasztja azt a feltevést, hogy a csökkent CFTR aktivitás fokozott HE4 szekrécióhoz vezet. Ezzel ellentétesen, a CFTR funkció FSK/IBMX általi aktiválása jelentősen csökkentette a HE4 koncentrációját a kezeletlen kontrollokhoz képest ( $p < 0,05$ ), ami pedig arra utal, hogy a fokozott CFTR aktivitás gátló hatást gyakorol a HE4 fehérje expressziójára.

Érdekes módon mind az ELX/TEZ/IVA, mind a LUM/IVA kezelés csökkentette a HE4 szintet még a wt-CFTR-t expresszáló CFBE41o- sejtekben is. A csökkenés mindkét modulátor kezelés esetében szignifikáns volt ( $p < 0,001$ ), és hasonló mértékűnek bizonyult. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CFTR működése meghatározza a HE4 bazális expresszióját és a csatorna funkció károsodása magyarázhatja a HE4 szint emelkedését CF-es légúti epithelsejtekben *in vitro*. Összességében az eredmények megerősítik, hogy a HE4 kiindulási szintjét alapvetően a CFTR aktivitás szabályozhatja. A CFTR funkció károsodása – ahogy az CF-eredetű légúti epitheliális sejtekben megfigyelhető – az emelkedett HE4 expresszió hátterében állhat. Emellett a *p.Phe508del*-CFTR mutációt hordozó sejtekben az ELX/TEZ/IVA jóval kifejezettebb HE4 szint csökkenést idézett elő, mint a LUM/IVA, ami összhangban van a jobb CFTR funkció korrigáló hatásával. Ez a HE4 extracelluláris koncentrációjának jelentősebb változásában is tükröződött, összhangban a korábban leírt szisztémás HE4 szint csökkenéssel.

### **A CF-es betegek köpetmintáiban mért HE4 koncentráció klasszikus gyulladásos paraméterek tükrében**

A plazma és szérum HE4 koncentráció meghatározása mellett klinikai vizsgálatainkat kiegészítettük CF-es betegek köpetmintáinak analízisével. A köpetben jónéhány pro-inflammatorikus citokin (pl. IL-8) koncentrációja mérhető, ugyanakkor nagy intra-individuális variabilitást mutathat akár stabil állapotú CF-es betegekben is, azonban ennek oka nem teljesen tisztázott. Kíváncsiak voltunk, hogy vajon CF-es betegek köpetmintáiban a HE4 szintek összefüggést mutatnak-e a pulmonális exacerbáció súlyosságával és különböző gyulladásos paraméterekkel.

### **A CF-es köpet HE4 szint és a pulmonális exacerbáció közötti összefüggés vizsgálata**

Rendelkezésünkre állt 72 CF-es beteg köpetmintája, akiknek a főbb demográfiai és laboratóriumi paramétereit már korábban feltüntettük. Vizsgálataink során három alcsoportba soroltuk a CF-es betegeket az exacerbáció súlyosságát figyelembe véve. Ennek megfelelően enyhe, közepes, illetve súlyos exacerbációt mutató csoportokat képeztünk. Azt találtuk, hogy a köpet HE4 koncentráció szignifikánsan emelkedett volt a súlyos exacerbációt mutató CF-es betegeknél az enyhe, illetve közepes mértékű exacerbációhoz képest, ugyanakkor az utóbbi két csoport között nem találtunk jelentős különbséget. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a köpetben mért HE4 szint korrelációt mutathat a pulmonális exacerbáció súlyosságával.

## **Klasszikus gyulladásos paraméterek és a köpet HE4 szint közötti korreláció vizsgálata CF-es betegekben**

Az exacerbáción átesett 72 CF-es beteg esetében, akiknek lemértük a köpet HE4 koncentrációját, rendelkezésünkre álltak különböző gyulladásos paraméter adatai. Az egyik vizsgált marker a légúti gyulladás egyik legérzékenyebb biomarkere CF-ben, az aktivált neutrophil granulocyta által termelt neutrophil elasztáz (NE), mely szignifikáns korrelációt mutatott a köpetben mért HE4 koncentrációval ( $r = 0,1905$ ;  $p = 0,0433$ ). CF-ben a visszatérő infekciók és krónikus gyulladás gyakori és mindez neutrophil granulocyták aktivációjával és pro-inflammatorikus citokinek (pl. IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) fokozott termelődésével jár együtt, melyek nem csak a patomechanizmusban töltenek be funkcionális szerepet, de potenciális biomarkerként is tekinthetünk rájuk. Az általunk vizsgált betegek esetén az IL-1 $\beta$  eredmények álltak rendelkezésre, melyek még jelentősebb összefüggést mutattak a HE4 szintekkel ( $r = 0,3005$ ;  $p = 0,0012$ ). A legjelentősebb korrelációt pedig másik két gyulladásos marker, a neutrophil granulocyta által termelt mieloperoxidáz (MPO) ( $r = 0,4022$ ;  $p < 0,0001$ ), illetve az extracelluláris mátrixot bontó enzim, a mátrix metalloproteináz-9 (MMP9) mutatta ( $r = 0,3823$ ;  $p < 0,0001$ ), amely szintén a neutrophil granulocytákból és makrofágokból szabadul fel gyulladásos folyamatok során. CF-ben az MMP9 szintje gyakran emelkedett a légutakban, és hozzájárul a szöveti károsodáshoz és a légúti remodellinghez. Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a köpet HE4 koncentráció korrelál a pulmonális exacerbáció súlyosságával CF-ben, illetve összefüggést mutat olyan klasszikus köpetben mért gyulladásos paraméterekkel, mint a NE, IL1-  $\beta$ , MPO és MMP9.

## **A HE4 expresszió vizsgálata a kóros CFTR funkció által kiváltott EMT folyamatában *in vitro* bronchiális epithelsejt kultúrákban**

A HE4 fehérje fokozott expresszióját írták le CF-ben, amelyet *in vitro* vizsgálatok alapján a károsodott CFTR közvetlenül szabályoz az NF- $\kappa$ B útvonalon keresztül *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE 41o<sup>-</sup> sejtekben. A CFTR diszfunkcióját továbbá az EMT folyamatához is társítják a betegségben. Mivel az irodalomban nincs erre vonatkozó adat, vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a HE4 expressziója megváltozik-e, illetve összefüggésbe hozható-e a CF-hez kapcsolódó EMT folyamatával.

### **A *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE sejtek az EMT-re jellemző tulajdonságokat mutatnak a vad típusú CFBE sejtekkel összehasonlítva**

A humán CF-es légúti epithelsejtek vizsgálatához *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE 41o<sup>-</sup> sejteken, valamint kontrollként wt-CFTR-t hordozó CFBE 41o<sup>-</sup> sejteken végeztünk immunfluoreszcens (IF) és RNS szintű vizsgálatokat annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az EMT markerek expresszióját. Az IF analízis eredményei azt mutatták, hogy az E-cadherin expressziója csökkent, míg az N-cadherin pozitivitása fokozott volt a mutációt tartalmazó sejtekben a vad típusú sejtekhez képest. Emellett a HE4 és az MMP9 fehérjék expressziója is kimutatható volt IF segítségével és mindkét marker kiindulási átlagos fluoreszcencia intenzitása (MFI) emelkedett a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben a wt-CFTR kontroll sejtekhez viszonyítva.

Ezzel párhuzamosan mRNS mennyiségi meghatározást is végeztünk, és a fenti biomarkerek expressziója között hasonló, de még kifejezettebb különbséget figyeltünk meg a két sejtvonal között. Továbbá meghatároztuk a Vimentin — mint további mezenchimális marker —, valamint az IL-1 $\beta$  mRNS expresszióját, amely pedig egy proinflammatorikus citokin. Mindkét esetben szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben a kontroll sejtekhez képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az epithelsejtekben a fenotípus károsodik és mezenchimális jelleg indukálódik a CF-es bronchiális epithelsejtekben. Ezen kívül megvizsgáltuk a TWIST1 mRNS expresszióját is, amely transzkripciós faktorként különböző génexpressziós szabályzásban vesz részt az EMT folyamatában. A TWIST1 emelkedett expressziója alátámasztotta a mezenchimális fenotípus kialakulását mind a bazális, mind a TGF- $\beta$ 1 kezelt mutációt tartalmazó CFBE sejtekben. Ezek az eredmények a légúti epithelium károsodására, valamint a mezenchimális jellemzők kialakulására utalnak a natív CF-es bronchiális epithelsejtekben.

### **A CFTR funkció korrigálása az epitheliális fenotípus helyreállítását eredményezi *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben**

A *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejteket ETI-vel kezeltük az EMT fenotípus visszaállításának céljából és fokozott E-cadherin, valamint csökkent N-cadherin expressziót figyeltünk meg. Kíváncsiak voltunk továbbá arra, hogy a TGF $\beta$ 1 képes-e tovább fokozni az EMT folyamatát a mutációt tartalmazó CF-es légúti epithelsejtekben. Elsőként MTT-assay segítségével megvizsgáltuk a sejtek életképességét különböző koncentrációjú és időtartamú TGF $\beta$ 1 kezelést követően, és nem figyeltünk meg citotoxikus hatást 15 ng/mL TGF- $\beta$ 1 koncentráció mellett

legfeljebb 120 órán keresztül, illetve még magasabb koncentráció esetén sem 48 óráig. Az IF vizsgálatok alapján a kezelés hatására tovább csökkent az E-cadherin expresszió, míg az N-cadherin és az MMP9 fehérjeszint tovább emelkedett a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben a kezeletlen CF-es sejtekhez képest. Meglepő módon azonban a TGF $\beta$ 1 kezelés csökkentette a HE4 expresszióját a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben a kiindulási szinthez viszonyítva. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az indukált EMT CF-ben alacsonyabb HE4 expresszióval társulhat.

Annak igazolására, hogy ezek a TGF $\beta$ 1 által kiváltott változások az EMT folyamatában visszafordíthatóak, CFTR modulátor kezelést alkalmaztunk *in vitro*. Ennek megfelelően a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejteket TGF $\beta$ 1 és ETI együttes jelenlétében kezeltük 24 órán keresztül, majd újra megvizsgáltuk az EMT markerek expresszióját. Az IF vizsgálatok eredményei szerint az E-cadherin pozitivitás emelkedett és közelített a normál értékhez, míg az N-cadherin expressziója visszaesett a kiindulási szintre vagy az alá. Lényeges, hogy a HE4 és az MMP9 expressziója szignifikánsan csökkent, ami a CFTR funkció ETI általi helyreállítására utal. Az EMT markerek expresszióját RT-qPCR-rel is elemeztük, amely megerősítette, hogy az N-cadherin, valamint a Vimentin és IL1B mRNS szintek visszatértek a kiindulási értékekhez. Továbbá a HE4 és MMP9 mRNS-ek szintje jelentősen csökkent TGF $\beta$ 1 és ETI együttes jelenlétében a csak TGF $\beta$ 1 kezelthez képest. Az N-cadherint vizsgáltuk fehérje szinten is ELISA módszerrel és hasonló változásokat figyeltünk meg a fent említett különböző kezelések hatására. Ezek az eredmények megerősítik, hogy a TGF $\beta$ 1 az elsődleges kiváltó tényező az EMT indukálásában a csökkenő HE4 szintek mellett, és közvetlen összefüggés van a CFTR működési zavara és az EMT kialakulása között a CF-ben. Összefoglalva, eredményeink azt igazolják, hogy a TGF $\beta$ 1 az EMT egyik fő indukáló tényezője, amely CF-ben HE4 szint csökkenéssel jár az EMT folyamatának progressziója során, továbbá a CFTR diszfunkció és az EMT kialakulása között közvetlen kapcsolat áll fenn.

### **A HE4 expresszió hiánya mezenchimális fenotípust mutató sejtes körülmények között**

Mivel a HE4 expressziója a *p.Phe508del*-CFTR-t hordozó CFBE sejtekben már 24 órás TGF $\beta$ 1 kezelés után csökkent, a sejteket ezt követően tartós TGF $\beta$ 1 expozíciónak tettük ki annak érdekében, hogy a HE4 expresszió hosszú távú változásait nyomon kövessük. A kezelés hatására a HE4 szintje fokozatosan és szignifikánsan csökkent 48 és 120 óra között. Kontrollként mezenchimális eredetű sejt vonalakban is vizsgáltuk a HE4 jelenlétét, és egyikben sem volt kimutatható a fehérje: sem a pulmonális mezenchimális őssejtekben, sem pedig a humán CF-ből származó tüdő eredetű fibroblasztokban. Emellett az MMP9 fehérje szintjét is

analizáltuk ELISA módszerrel wt-CFTR és *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtek felülűszójában, továbbá a mutáns sejtekben TGFβ1 kezelést követően ETI jelenlétében vagy annak hiányában. Összhangban az IF és RT-qPCR eredményekkel, az MMP9 koncentrációja magasabb volt a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtek felülűszójában a wt-CFTR sejtekhez képest. A TGFβ1 további MMP9 növekedést eredményezett 24 óra után a mutációt tartalmazó sejtekben, azonban ez a TGFβ1 indukált MMP9 expresszió ETI jelenlétében jelentősen csökkent. Eredményeink arra utalnak, hogy a TGFβ1 tartós jelenléte következtében az előrehaladott EMT során megfigyelhető HE4 expresszió csökkenés összefüggést mutat a kifejezettebb mezenchimális fenotípus kialakulásával a CF-es epithelsejtekben, míg a HE4 fehérje eleve hiányzik a mezenchimális sejtípusokból, így például a CF fibroblasztokból.

### **A HE4 csökkent expressziója hozzájárul az EMT kialakulásához, az MMP9 fokozott termelődéséhez és a sejtproliferáció csökkenéséhez**

A HE4 fehérje kifejeződését géncsendesítéssel lecsökkentettük HE4 specifikus siRNS segítségével *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben annak érdekében, hogy tovább vizsgáljuk a TGFβ1 által csökkentett HE4 szint hatásait az EMT-re CF-ben. A transzfekció hatására a sejtekben bekövetkező változásokat IF és RT-qPCR segítségével elemeztük az EMT markerek és az MMP9 megváltozott expressziója alapján a HE4 hiányában. 48 órával a HE4 siRNA kezelést követően a HE4 fehérje szintje jelentősen csökkent, és az mRNS szintje is alacsonyabb volt a mutációt tartalmazó CFBE sejtekben azokhoz a sejtekhez képest, amelyeket kontroll NEG-01 siRNS-sel kezeltünk, megerősítve ezzel a transzfekció hatékonyságát. Fontos megjegyezni, hogy a normalizáláshoz kontroll génként alkalmazott GAPDH mRNS szintje nem változott.

Az EMT kialakulását a HE4 expresszió csökkenés indukálta, amit az IF vizsgálat csökkent E-cadherin és fokozott N-cadherin és MMP9 pozitivitással igazolt. Továbbá elemeztük a csökkent HE4 expresszió hatását nem kezelt és TGFβ1 által stimulált sejtekben. Ennek érdekében HE4 siRNS-t és TGFβ1-et együttesen alkalmaztunk *p.Phe508del*-CFTR CFBE 41o- sejtekben, és az eredményeket a NEG-01 siRNS + TGFβ1 kezelést kapott sejtek adataival hasonlítottuk össze, valamint összevetettük a TGFβ1 stimuláció nélküli, HE4 siRNS-sel kezelt sejtek eredményeivel is. A vizsgált paraméterek mRNS szintű változásai a nem stimulált sejtekben megegyeztek a TGFβ1 kezelt mintákban tapasztaltakkal. Ezek alapján úgy véljük, hogy a HE4 csökkent expressziója a CFBE sejtekben kulcsfontosságú szerepet tölt be az EMT folyamatában, valamint az MMP9 fehérje expresszió emelkedése jelentősebb, ha ez a csökkenés TGFβ1 kezeléssel is társul. Végül a csökkent HE4 expresszió indukálta EMT során

a sejtprolifерáció mértékét Ki67 pozitivitás alapján értékeltük, amely szignifikánsan csökkent a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben HE4 siRNS kezelés után a NEG-01 siRNS-sel kezelt kontroll sejtekhez képest, ami arra utal, hogy az EMT állapot a sejtprolifерáció csökkenésével jár együtt.

### **A CF-es légúti körülmények hatásának modellezése *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben CF-es betegek BAL mintáival**

Végezetül a CF-es légúti körülmények bronchiális epithelsejtekre gyakorolt komplex hatását szeretnénk volna megvizsgálni *in vitro* körülmények között CF-es betegek BAL mintáit felhasználva kezelőanyagként. A BAL minta alkalmazása különösen alkalmas a CF-es légúti környezet modellezésére, mivel közvetlenül a tüdő alsó részéből származik, így hűen tükrözi a betegségre jellemző gyulladásos és mikrobiális miliót. A CF-es BAL folyadék magas koncentrációban tartalmaz gyulladásos citokineket (pl. IL-8), proteázokat (pl. NE, MMP-k), valamint bakteriális komponenseket, amelyek kulcsszerepet játszanak a légúti epithelsejtek működésének és fenotípusának megváltozásában, beleértve az EMT folyamatát is. Ezáltal a BAL minták alkalmazása lehetővé teszi a komplex *in vivo* környezet modellezését *in vitro* CFBE sejt kultúrákon, különösen a *p.Phe508del*-CFTR mutáció esetén, amely a leggyakoribb a betegségben.

Ennek érdekében CF-es beteg BAL mintáiból készítettünk egy mintapoolt, majd a sejtekhez adtuk 20%-os arányban és 48 órán keresztül inkubáltuk. Az EMT markerek, az IL-1 $\beta$ , valamint a HE4 fehérje expressziós változásait analizáltuk azért, hogy megvizsgáljuk, vajon a betegektől származó BAL mintákkal modellezett CF-es légúti környezet hozzájárul-e az EMT kialakulásához CF-es epithelsejtekben. A TGF $\beta$ 1 kezelés hatására bekövetkező változásokhoz hasonló tendenciákat tapasztaltunk az EMT markerek és az IL-1 $\beta$  mRNS szintek esetében is. A BAL kezelés hatására az E-cadherin expresszió szignifikánsan csökkent, az N-cadherin pedig nőtt, csakúgy, mint a Vimentin, habár az utóbbi esetén az emelkedés nem volt szignifikáns, a tendencia megmutatkozott. Az IL-1 $\beta$  szint is jelentős emelkedést mutatott a kezelés hatására. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy előzetes vizsgálataink alapján a CF-re jellemző komplex légúti milió hozzájárulhat az EMT kialakulásához és a gyulladásos folyamatok elindulásához a tüdőben, illetve a HE4, mint potenciális biomarker, jól korrelál a légzésfunkció állapotával BAL mintákban CF-es betegek esetén.

## 5. Megbeszélés

Munkánk során elsőként sikerült bizonyítékot találnunk a plazma és szérum HE4 szint és a tüdőfunkció javulása — különösen a delta ppFEV1 — közötti összefüggésre a LUM/IVA (Orkambi®) kezelés, valamint ELX/TEZ/IVA (Kaftrio®) hármas CFTR modulátorral történő kezelést követően CF-ben szenvedő betegek esetében. Korábban már vizsgálták ezeknek a terápiás kombinációknak a klinikai előnyeit, nagyrészt a ppFEV1-gyel, a BMI értékekkel, légúti és bélhámsejteken végzett CFTR funkcionális tesztekkel és a verejtékklorid koncentráció monitorozásával minden életkorban. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezeknek a funkcionális és laboratóriumi paramétereknek vannak a korlátai a CFTR modulátorok monitorozása szempontjából. A ppFEV1 diszkrimináló képessége korlátozott lehet mérsékelt vagy közel normális tüdőfunkcióval rendelkező betegeknél, továbbá jelentős variabilitást mutat életkor szerint és a populációk között is ppFEV1 esetén. A megbízható spirometriai vizsgálat kivitelezése is technikai kihívást jelenthet, különösen fiatalabb betegeknél. Korlátozott összefüggést írtak le az abszolút vagy relatív változások között a verejtékklorid koncentráció és a ppFEV1 között, annak ellenére, hogy a tüdőfunkció egyértelmű javulást mutatott 1–6 hónappal a LUM/IVA terápiát követően. Ugyanakkor a verejték vizsgálat standardizálása továbbra is kihívást jelent. Mindezek tükrében továbbra is fennáll az igény más, könnyebben hozzáférhető és robusztusabb biomarkerekre — lehetőleg perifériás vérből —, amelyek hatékonyabban képesek nyomon követni a kezelésre adott választ a klinikai gyakorlatban. Néhány perifériás vérben vizsgálható biomarker (pl. CRP, IL-8, TNF- $\alpha$ ) szérumszintje jelentősen csökkent LUM/IVA kezelést követően. A neutrophil szám, a fibrinogén, CRP és más citokinek, mint a GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12p70, IL-17A és TNF- $\alpha$  szignifikáns csökkenését írták le Kaftrio® terápia alatt. Továbbá szignifikáns kapcsolatot mutattak ki ezek között a gyulladásos biomarkerek és a ppFEV1, BMI, valamint a verejtékklorid szintek között. A hármas kombináció jótékony hatással van még a májfunkcióra és a tápanyagfelszívódásra is, javítva a koleszterin- és albuminszinteket 1 éves terápia után.

Az elmúlt években kutatócsoportunk igazolta, hogy a plazma/szérum HE4 koncentráció vizsgálata hasznos lehet a CF tüdőbetegség súlyosságának felmérésére cseh és magyar populációkban a CFTR modulátor kezelés megkezdése előtt. A HE4 koncentráció és a CF tüdőbetegség súlyossága közötti pozitív korreláció független volt a betegek életkorától. Ugyanakkor a betegek életkora, a dohányzás és a csökkent vesefunkció a HE4 szintet befolyásolhatja nem CF-es populációban. Hatékonyan alkalmaztuk a tüdőfunkció változásainak

nyomon követésére az IVA hatékonyságának vizsgálatakor három egymástól független betegcsoportban, valamint Orkambi® kezelésben részesülő betegeknél.

Korábbi eredmények szerint a CFTR diszfunkció hozzájárulhat az abnormális HE4 expresszióhoz az NF- $\kappa$ B útvonal aktiválásán keresztül. Mindazonáltal eddig még nem vizsgálták nagy betegszámú CF kohorszban a plazma/szérum HE4 koncentrációk alakulását az *in vivo* LUM/IVA, valamint ELX/TEZ/IVA kezelés mellett a terápiás hatás értékelésére. Noha ezen CFTR modulátorok bevezetése nagy mértékű javulást eredményezett a tüdőfunkcióban és az életminőségben - legfőképpen az ETI alkalmazása -, valamint csökkentette a tüdőtranszplantáció szükségességét is, a CFTRm kezelés hatékonyságának rendszeres nyomon követése a mindennapi klinikai gyakorlatban továbbra is indokolt.

Vizsgálatunkban gondosan kiválasztott plazma és szérum mintákban elemeztünk a HE4 koncentrációt a *p.Phe508del*-CFTR variánsra homozigóta CF-es betegekben. Összesen 68 CF-t vontunk be a PROSPECT studyból, akik az átlagos ppFEV1-ben mérsékelt változást mutattak (2,6%) a kiindulási értékhez képest a LUM/IVA kezelés 6. hónapjára, szemben az egész vizsgálati populáció eredményeivel (-0,2%). Továbbá 80 Kaftrio® kezelésben részesülő beteg került bevonásra két független kohorszban. A betegek jelentős átlagos ppFEV1 változást mutattak (17,5%, illetve 4,0%) a kiindulási értékhez képest a terápia 3–6 hónapja során, ami összhangban áll más vizsgálati populációk eredményeivel is, amelyek szignifikáns átlagos ppFEV1 javulást igazoltak gyermekekben (11%) és serdülőkben (14,3%) a 24. hétre. A LUM/IVA kezelés hatására a HE4 koncentráció már az első kontroll vizsgálatkor szignifikánsan alacsonyabb volt, és ez a vizsgálati periódus végéig fennmaradt. A plazma HE4 változásai a legnagyobb delta érték mellett (-10,7 mmol/L) mutatták a legalacsonyabb abszolút HE4 szintet (61,5 [47,0–79,7] pmol/L) a 6. hónapra, ami közelítette – de nem érte el – a HE4 referenciaértékét (36,3 [31,1–43,4] pmol/L), amelyet korábban egy másik tanulmányban határoztunk meg. Ezt a megfigyelést alátámasztották *in vitro* kísérleteink a *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE 41o- sejtekben, ahol a LUM/IVA kezelés szignifikánsan csökkentette a HE4 expressziót a kezeletlen sejtekhez képest, de a HE4 szintek összességében nem normalizálódtak. Mindez azt mutatja, hogy a HE4 nem éri el a normál (“vad típusú”) szinteket CF-ben, még a CFTR funkció javulása mellett sem az Orkambi® alkalmazását követően. Ugyanakkor a HE4 szintek átlagos változása a kiindulási értékhez képest korrelált a delta ppFEV1 értékkel az összes vizsgálati résztvevőnél. Amikor pedig ezt az összefüggést külön elemeztük a 18 év alatti CF-betegek körében, erősebb korrelációt találtunk a fiatalabbaknál. A legnagyobb átlagos különbséget a HE4 esetén azoknál a betegeknél mértük, akiknél a

tüdőfunkció súlyosan károsodott ( $< 50\%$ ) az Orkambi® kezelés megkezdése előtt, míg a legkevésbé jelentős változásokat azoknál figyeltünk meg, akiknél a kiindulási ppFEV1  $\geq 90\%$  volt. A kiindulási ppFEV1 nem különbözött a felnőtt és gyermek CF-betegek között, a gyermekeknél viszont magasabb átlagos delta ppFEV1 érték alakult ki (3,7%) a felnőttekhez képest (1,1%) a 6. hónapra és a reszponderek aránya is magasabb volt. A plazma HE4 és a ppFEV1 közötti erős korreláció miatt, a HE4 biomarker jobb diszkrimináló képességet mutatott a gyermekeknél. Másrészt, életkortól függetlenül, azok a résztvevők, akiknél a kezelés előtti tüdőfunkció rosszabb volt, jelentősebb javulást mutattak a CFTR modulátor terápia 6. hónapjára, ami a HE4 plazma szint nagyobb változását eredményezte, amelyet a PROSPECT study szintén igazolt.

A második klinikai vizsgálatunk 1. kohorszába beválogatott CF-es betegek esetén ETI kezelés hatására a szérum HE4 koncentráció szintén jelentősen csökkent a kiindulási értékhez képest 3 hónap után, a HE4 átlagos változása  $-45,7$  pmol/L volt. A 2. kohorsz ETI terápiában részesülő betegek ennél kisebb mértékű,  $-20,7$  pmol/L átlagos delta értéket mutattak. Ezzel párhuzamosan az Orkambi® terápia alatt álló betegek szérum HE4 értékei szintén csökkentek ( $-18,5$  pmol/L átlagos változás), ugyanakkor minden követéses időpontban szignifikánsan alacsonyabb HE4 szintek voltak mérhetők az ETI kezelt csoportban az Orkambi® kezelt csoporthoz képest, mely csupán mérsékelt tüdőfunkció javulást mutatott ( $+1,6\%$ ).

Korábban az IVA monoterápia (Kalydeco®) nagyobb mértékű HE4 csökkenést eredményezett ( $-14,4$  pmol/L vs.  $-10,7$  pmol/L) olyan CF-es betegekben, akik legalább egy *p.Gly551Asp*-CFTR variánst hordoztak transz helyzetben (III. osztályú CFTR variáns). Ezen betegek körében a ppFEV1 átlagos változása is magasabb volt (7,0%) 6 hónap után a GOAL studyban, mint a PROSPECT study résztvevőinél, akik a II. osztályú *p.Phe508del* variánst hordozták, és csupán 2,6%-os javulást mutattak. Mindezek összhangban állnak az eredeti hipotézisünkkel, miszerint a plazma HE4 érzékenyen követi még a kis mértékű tüdőfunkció javulást is CF-es betegekben, akik CFTR modulátor kezelésben részesülnek. Továbbá elmondhatjuk, hogy a Kaftrio® jelentősebb terápiás hatása az Orkambi®-val összehasonlítva jól követhető volt a plazma/szérum HE4 koncentrációval. A delta és az abszolút HE4 szintek jól korreláltak a delta és az abszolút ppFEV1 értékekkel, és minden kohorszban szignifikáns, fordított irányú összefüggést figyeltünk meg a HE4 és a ppFEV1 között.

Nemrég Schmidt és munkatársai kimutatták a HE4-et és az MMP9 csökkenését ETI kezelés hatására 6 hónap után. Hasonlóan egy kisebb Trikafta® kezelt CF-es csoportban a plazma MMP9 szintén csökkent a reszponder csoportba, míg a nem reszponder csoportban

tartósan magas maradt. Ez arra utal, hogy az MMP9 esetleg további potenciális biomarkerként szolgálhat a terápiás válasz megítélésére.

A plazma és szérum HE4 átlagos változásának diszkriminációs “erejét” ROC analízissel határoztuk meg különböző mértékű tüdőfunkció javulás esetén Orkambi® kezelésnél (2,6% és 5%-os javulás a kezelés 6. hónapjában), illetve Kaftrio® esetén (4%-os javulás a kezelés 3–6 hónapjában). Orkambi® kezelésnél a delta HE4 esetében az AUC érték jelentős volt az összes CF-es betegnél (0,9139). Különösen a gyermekeknél volt kifejezettebb, magas szenzitivitással (80%) és specificitással (83%). Kaftrio® kezelés esetén a HE4 átlagos változása szintén jelentős AUC értéket mutatott mind az 1. kohorszban (0,765), mind a 2. kohorszban (0,789) ETI kezelés alatt, és életkor szerinti bontásban gyermekeknél (0,791) és felnőtteknél (0,788) egyaránt. Amikor a delta ppFEV1 5%-át vettük határértéknek, az AUC érték 0,6786 volt az összes betegnél, míg gyermekeknél ismét magasabb volt (0,7913). A kezelésre jól reagáló reszponder betegeket ( $\geq 5\%$ ) és a nem reszponder betegeket ( $< 5\%$ ) az átlagos ppFEV1 változás alapján csoportosítottuk a kezelés 6. hónapjában. Jelentősen csökkent plazma HE4 szintek csak a reszponder csoportban voltak megfigyelhetők.

Logisztikus regressziós elemzést végeztünk annak értékelésére, hogy milyen tényezők befolyásolják a reszponder státuszt. A delta HE4 és a kiindulási ppFEV1 független változóként kapcsolódott a reszponder csoporthoz a ppFEV1 változás tekintetében ( $\geq 5\%$ ) a nem reszponderekhez képest. Hasonlóképpen, a kiindulási változók (életkor, nem, verejtékklorid koncentráció, BMI) nem voltak statisztikailag összefüggésben a kezelésre adott válasz mértékével. Korábbi tanulmányunkban szintén szignifikáns, független kapcsolatot mutattunk ki a delta ppFEV1 és a delta HE4 között IVA kezelésben részesülő CF-es betegeknél.

A CFTR funkció helyreállítását teljes sejtes patch-clamp technikával igazoltuk *in vitro*, összhangban korábbi közleményekkel. Eredményeink alapján a *p.Phe508del*-CFTR funkcióját helyreállítottak tekintettük, mivel Boinot és munkatársai szerint, ha a kezelés után a mérhető áram sűrűség meghaladja a 4 pA/pF küszöbértéket, akkor a CFTR aktivitás korrigáltnak tekinthető. Ennek megfelelően mind az ELX/TEZ/IVA, mind a LUM/IVA kombináció szignifikánsan csökkentette a HE4 értékeket. Fontos, hogy az ELX/TEZ/IVA nagyobb mértékű változást okozott mind a  $\text{Cl}^-$  áramokban, mind a HE4 koncentrációban, mint a LUM/IVA. Ezt megerősítették korábbi *in vitro* kísérleteink is *p.Phe508del*-CFTR-t expresszáló CFBE sejtekben, ahol mind TEZ/IVA, mind LUM/IVA kezelés szignifikánsan csökkentette a HE4 expressziót a kezeletlen sejtekhez képest, ugyanakkor a HE4 szintje összességében nem normalizálódott. Mindezek alátámasztják, hogy a HE4 koncentráció nem éri el a normál („vad típusú”) szintet CF-ben, még akkor sem, ha CFTR funkció javulása figyelhető meg CFTRm

kezelés hatására. Ez összhangban áll azzal, hogy CFTR modulátorok csak részlegesen képesek korrigálni a *p.Phe508del*-CFTR működését. Összességében az ETI nagyobb mértékű HE4 csökkenést idézett elő *in vitro* sejt kultúrákban, amely jól korrelált az *ex vivo* mintákban mért szérumszintekkel.

Klinikai vizsgálatainkat kiegészítettük olyan CF-es betegektől nyert köpetminták HE4 meghatározásával, akiknél a mintavételt követően exacerbáció lépett fel. Korábbi vizsgálatokban a szérumszint IL-1 $\beta$ , MPO, CRP, a plazmaszint IL-8 ugyan előre jelezte az akut pulmonális exacerbációt, de csak rövid távon, így mi azt vizsgáltuk, hogy a pulmonális exacerbáció előrejelzésére alkalmas lehet-e a köpet HE4. Eredményeink alapján a köpetben mért HE4 szint jól korrelál a pulmonális exacerbáció súlyosságával CF-ben, illetve összefüggést mutat olyan klasszikus köpetben mért gyulladásos paraméterekkel, mint a NE, IL-1 $\beta$ , MPO és MMP9. A plazma, szérumszint és köpetmintákon túl CF-es betegek BAL mintájában is megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a HE4 és a tüdőfunkció állapota között. Meghatároztuk a HE4 szinteket a betegek BAL mintáiban, amelyek szignifikáns korrelációt mutattak a FEV1 értékekkel.

Az utóbbi évek kutatásai meggyőző bizonyítékokkal szolgáltak az EMT aktivációjára olyan krónikus tüdőbetegségekben, mint a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), az idiopátiás tüdőfibrozis (IPF) és a CF. A TGF $\beta$ 1, az EMT fő mediátora és erőteljes induktora, az említett kórképekben jelentősen emelkedett expressziót mutat a légutakban. Érdekes módon CF-ben az EMT gyakran részleges, ami hibrid EMT fenotípussal rendelkező sejtek kialakulásához vezet. Ez összhangban áll azzal a koncepcióval, hogy az EMT nem egy teljes epitheliális–mezenchimális átalakulás, hanem rugalmas, átmeneti állapotok spektrumaként értelmezhető.

További *in vitro* vizsgálatainkban a HE4 és az MMP9 expresszióját elemeztük CF-hez társuló EMT folyamatában légúti epithelsejtekben. Célunk volt annak igazolása, hogy a megváltozott HE4 szint összefüggésben van az EMT kialakulásával CFBE sejtekben, ami hozzájárul az MMP9 fokozott expressziójához. Ennek érdekében megvizsgáltuk különböző EMT biomarkerek expresszióját a *p.Phe508del*-CFTR mutációt expresszáló CFBE sejtekben kontroll wt-CFTR CFBE sejtekkel összehasonlítva IF mikroszkópos, RT-qPCR és ELISA módszerekkel. A mutációt tartalmazó CFBE sejtekben csökkent E-cadherin-, valamint emelkedett N-cadherin-, Vimentin- és IL1B mRNS expressziót figyeltünk meg. Emellett mind a HE4, mind az MMP9 fehérjeszintje magasabb volt a *p.Phe508del*-CFTR mutációt hordozó CFBE sejtekben a kontroll sejtekhez képest. A fehérjeszintekkel összhangban mRNS szinten is

jelentős különbségek mutatkoztak ezen markerek expressziójában a két sejtvonal között. Mindezek összhangban állnak korábbi megfigyelésekkel, amelyekben a CF-es bronchiális epitheliumban az E-cadherin kisebb mértékben festődött, míg az N-cadherin, Vimentin és I típusú kollagén nagyobb mértékű pozitivitást mutatott a normál epitheliumhoz képest. Továbbá a mutációt hordozó sejtekben ezeknek a mezenchimális markereknek az expressziója magasabb volt, mint a wt-CFTR sejtekben. Összességében ezek az eredmények a CF-es légúti epitheliális sejtek mezenchimális irányba történő eltolódását és proinflammatorikus fenotípusát jelzik, amely az epitheliális integritás zavarára és az EMT-hez kapcsolódó molekuláris változásokra utal a CF-es epitheliumban.

Annak vizsgálatára, hogy az EMT tovább fokozható-e CF-es légúti epithelsejtekben, a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejteket TGF $\beta$ 1 kezelésnek tettük ki. A várakozásoknak megfelelően a TGF $\beta$ 1 szignifikánsan csökkentette az E-cadherin, növelte az N-cadherin és az MMP9 fehérje expresszióját, amit IF és ELISA vizsgálatok is igazoltak. Érdekes módon a HE4 expressziója jelentősen csökkent a TGF $\beta$ 1 stimulációt követően CFBE sejtek emelkedett kiindulási szintjéhez képest, ami arra utal, hogy az aktivált EMT a HE4 csökkenésével társul CF-ben. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a HE4 normál epitheliális sejtekben expresszálódik, de szintje fokozatosan csökken, amikor az epithelium elveszíti epitheliális jellegét.

Az EMT kialakulásának vizsgálata során megnéztük, hogy a komplex légúti gyulladásos miliőt jól modellező stimulus hogyan hat a CF-es epithelsejtekre az EMT folyamatában. Ennek érdekében CF-es betegek BAL mintáival kezeltük a légúti epithelsejteket *in vitro*. A BAL kezelés hatására az E-cadherin expresszió szignifikánsan csökkent, az N-cadherin pedig nőtt, hasonlóan a Vimentinhez és IL-1 $\beta$ -hoz. Mindezen vizsgálataink alapján úgy gondoljuk, hogy a CF-re jellemző légúti milió hozzájárulhat az EMT kialakulásához és a gyulladásos folyamatok elindulásához a tüdőben.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy a CFTR funkció gyógyszeres kezeléssel történő helyreállítása képes-e visszafordítani az EMT-hez köthető változásokat. Ennek érdekében a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejteket a hármas kombinációjú CFTR modulátorral, az ETI-vel kezeltük, illetve TGF $\beta$ 1 és ETI együttes alkalmazását is vizsgáltuk. A CFTR funkció helyreállítását teljes sejt patch-clamp módszerrel igazoltuk *in vitro* körülmények között, ahol az ETI kezelés korrigálta a *p.Phe508del*-CFTR működését. Az epitheliális jelleg helyreállításának vizsgálata során IF festéssel az E-cadherin expresszió emelkedését és az N-cadherin csökkenését mutattuk ki. Az RT-qPCR megerősítette az E-cadherin, N-cadherin, Vimentin és IL1B mRNS szintek normalizálódását a kezelés hatására. Ugyanakkor a HE4 és

MMP9 mRNS szintek szignifikánsan alacsonyabbak maradtak ETI kezelés hatására, illetve TGFβ1 + ETI jelenlétében a csak TGFβ1 kezeléshez képest. Az ETI kezelés részben helyreállította a tight junction integritását a mutáns CFBE sejtekben, növelve a claudin-1 szintjét és az E-/N-cadherin arányt. Patkánymodellben kimutatták, hogy az EMT-ben részt vevő jelátviteli útvonalak a CFTR mutációtól függenek. Összességében a funkcionális CFTR szintje szoros összefüggést mutat a CFBE sejtek epitheliális/mezenchimális állapotával.

A HE4 szabályozásának alakulását vizsgáltuk hosszú távon, folyamatos TGFβ1 stimuláció mellett (0-120 óra), amely a fehérje fokozatos és szignifikáns csökkenését eredményezte. Érdekes módon a kontrollként használt pulmonális mezenchimális őssejtekben (MSC) és CF-ből származó tüdő eredetű fibroblasztokban (DHLF-CF) nem volt kimutatható a HE4 fehérje, ami megerősíti, hogy a HE4 expressziója epitheliális sejtekre korlátozódik. Wang és munkatársai szintén a WFDC2 (HE4) szintjének csökkenését figyelték meg krónikus rhinosinusitisben szenvedő betegek orrnyálkahártya epithelsejtjeiben, ami az EMT következtében kialakuló, epitheliális és mezenchimális sejtek abnormalis keveredésére utal krónikus gyulladás során. Tehát a megfigyeléseinkkel összhangban a fibroblasztok nem expresszálták a HE4-et.

Meghatároztuk az MMP9 fehérje szintjét wt-CFTR és *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben, valamint TGFβ1 kezelt mutáns sejtekben ETI jelenlétében és hiányában. Az immunfluoreszcens és RT-qPCR eredményekkel összhangban a kiindulási MMP9 szint magasabb volt a *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtek felülszójában, mint a vad típusú sejtekben, amelyet az ETI önmagában csökkentett. A TGFβ1 tovább növelte az MMP9 expresszióját, azonban ez a növekedés szignifikánsan csökkent az ETI együttes alkalmazása mellett. CF-es betegekben a plazma MMP9 szintje emelkedett volt a CFTR specifikus kezelés előtt, és csökkent az ETI alkalmazását követően. Mivel a TGFβ1 más humán sejtekben, például meningeális sejtekben is képes indukálni az MMP9 expresszióját, valószínűsíthető, hogy a TGFβ1 magas szintje részben szabályozza a CF-ben megfigyelhető fokozott MMP9 expressziót.

A HE4 expresszióját mesterségesen lecsendesítettük nem kezelt és TGFβ1 stimulált *p.Phe508del*-CFTR CFBE sejtekben HE4 specifikus siRNS transzfekcióval. A HE4 szint csökkenése EMT-re jellemző változásokat indukált. Emellett az MMP9 mRNS és fehérjeszintje is emelkedett, ami a HE4 és az MMP9 expresszió közötti közvetlen funkcionális kapcsolatra utalhat. Ezt a molekuláris kapcsolatot korábban mások is kimutatták, amikor igazolták, hogy a HE4 közvetlenül kölcsönhatásba lép az MMP9 fehérjével fibrotikus vese lizátumokban.

Az IL1B mRNS szintjét is vizsgáltuk EMT körülmények között. Bár nem CF eredetű bronchiális epitheliális sejtekben kimutatták, hogy az IL-1 $\beta$  fokozza a TGF $\beta$ 1 által indukált EMT-t, ez a tüdőepithelium biológiájában ismert kapcsolat megerősítheti, hogy az IL-1 $\beta$  hasonló módon hat a gyulladt CF-es légutakban is. Eredményeink alapján az EMT magasabb IL-1 $\beta$  mRNS szinttel társult, különösen TGF $\beta$ 1 expozíciót követően, ami a gyulladás és az EMT közötti kapcsolatra utal CF-ben. Végül a sejtproliferációt jelző Ki67 pozitivitás szignifikánsan csökkent a mutációt hordozó sejtekben a HE4 géncsendesítését követően a NEG-01 kezelt kontroll sejtekhez képest. Ez arra utal, hogy a csökkent HE4 expresszió mellett indukált EMT csökkent proliferációs képességet eredményez. Hasonlóképpen, a HE4 géncsendesítés csökkentette az EMT kialakulását, a sejtproliferációt és a Ki67 expresszióját petefészekrák sejtekben *in vitro*.

Vizsgálatainknak ugyanakkor vannak korlátai. A szérumban HE4 szinteket legfeljebb 6 hónapig vizsgáltuk, így a CFTR modulátorok tartós hatásának nyomon követésére nem volt lehetőségünk. Továbbá a CFTR modulátorok által korrigált CFTR funkció és a HE4 expresszió közötti kapcsolatot nem tártuk fel teljes részletességgel, így további *in vitro* vizsgálatokat végeztünk a jobb megértés érdekében. Nem végeztünk további kísérleteket az EMT részletesebb jellemzésére CFBE sejtekben (pl.: wound healing). A HE4 mérésével egyidejűleg nem vizsgáltuk az EMT kialakulásának közvetlen hatását a CFTR expressziójára CFBE sejtekben. Végül a TGF $\beta$ 1 által módosított HE4 expresszió hátterét, valamint a HE4 és MMP9 közötti kapcsolat részleteit nem tártuk fel teljes mértékben; ezért további kutatások szükségesek a szabályozási mechanizmus pontosításához a jövőben.

Összegezve, a plazma/szérumban HE4 szint jobban tükrözi a gyógyszeres kezelés hatékonyságát CF-es betegekben ETI kezelés alatt, mint LUM/IVA esetén. Eredményeink alapján a CF tüdőbetegséget a HE4 delta értékeinek vizsgálatával érdemes monitorozni. A plazma/szérumban HE4 szint folyamatos mérése megkönnyítheti a CFTR modulátor kezelés hatékonyságának követését a rutin klinikai gyakorlatban. Az *in vitro* vizsgálataink eredményei megerősítik, hogy az EMT HE4 expresszió csökkenéssel és az MMP9 expresszió emelkedéssel jár együtt CF-es légúti epithelsejtekben és alátámasztják, hogy közvetlen összefüggés van a CFTR működési zavara és az EMT kialakulása között CF-ben. Az alacsony HE4 expresszió pedig hozzájárul az EMT-re jellemző fenotípus és a csökkent sejtproliferáció kialakulásához a légúti epithelsejtekben.

## 6. Összefoglalás

A CF a leggyakoribb autoszomális recesszív módon öröklődő genetikai anyagcserebetegség a kaukázusi populációban, amelyben a CFTR ioncsatorna nem működik, vagy nem expresszálódik megfelelően. Mindez a külső elválasztású mirigyek megváltozott, besűrűsödött váladéktermelését eredményezi, amely az érintett szervek progresszív károsodását okozza. A betegek korai halálózását elsősorban a fokozatosan romló légzésfunkció és a neutrophil granulocyta dominanciájával jellemezhető krónikus gyulladás talaján kialakuló tüdőfibrózis okozza. A tüdőfibrózist pedig megelőzi az ún. epitheliális-mezenchimális tranzíció (EMT).

A CF-ben alkalmazott új CFTR modulátor terápiák hatékonyságának monitorozására jelenleg elérhető klinikai paraméterek korlátozottak. A betegségre jellemző légúti gyulladás már korai stádiumában kimutatható, így ezen folyamatokban szerepet játszó mediátorok koncentrációjának vérből vagy légúti mintából történő meghatározása kézenfekvő lehet a terápia hatékonyságának követésére. Ezek a gyógyszerek javítják a tüdőfunkciót, csökkentik a gyulladást és mérséklék a fertőzések gyakoriságát. Ugyanakkor továbbra is szükség van megbízható biomarkerek azonosítására, amelyek segítségével nyomon követhető a betegség progressziója és a kezelés hatékonysága. A plazma és szérum HE4 koncentráció jól korrelált a betegség súlyosságával, így alkalmasnak tűnt az Orkambi®, illetve Kaftrio® kezelés hatékonyságának követésére. Az *in vitro* vizsgálataink alapján a Kaftrio® CFTR funkció korrigáló hatása sokkal jelentősebb mértékű volt az Orkambi®-val összehasonlítva. Továbbá a megfelelően működő CFTR fenntartja a normál iontranszportot és az epitheliális integritást az egészséges légutakban, viszont CF-ben ennek működési zavara és a gyulladás következtében megemelkedik a HE4 és az MMP9 szint. A TGFβ1 tartós jelenlétében az EMT folyamata előre halad és emelkedik az MMP9, valamint csökkent HE4 expressziója.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a plazma és szérum HE4 koncentráció jól korrelál a légzésfunkció javulásával CF-ben és alkalmas lehet új, jól reprodukálható, könnyen mérhető biomarkerként mind az Orkambi®, mind pedig a Kaftrio® CFTR modulátor kezelések hatékonyságának követésére. Továbbá vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy az EMT indukálta HE4 expresszió csökkenés az MMP9 szint növekedésével jár együtt CF-es légúti epithelsejtekben, valamint az alacsony HE4 expresszió hozzájárul az EMT-re jellemző fenotípus és a csökkent sejtproliferáció kialakulásához.

## **7. Az értekezés új tudományos eredményei, a jelölt saját megállapításai**

1. A plazma/szérum HE4 szint jól korrelál a ppFEV1 légzésfunkciós paraméterrel és megbízható módon követi az Orkambi<sup>®</sup>, valamint a Kaftrio<sup>®</sup> kezelés hatékonyságát.
2. Az Orkambi<sup>®</sup> kezelés jelentős HE4 plazma szint csökkenést eredményez CF-es betegekben, amely egy még jelentősebb mértékű változás a Kaftrio<sup>®</sup> hatására.
3. Az EMT HE4 expresszió csökkenéssel és az MMP9 expresszió emelkedéssel jár együtt a cisztás fibrózis légúti epithelsejtekben.
4. Az alacsony HE4 expresszió hozzájárul az epithelsejtek EMT fenotípusának és a csökkent sejtprolifерáció kialakulásához.

## **8. Tárgyszavak**

Biomarker kutatás, cisztás fibrózis, CFTR, CFTR modulátor, ELX/TEZ/IVA, EMT, HE4, kezelés hatékonyság, légzésfunkció, LUM/IVA, verejtékklorid

## 9. Publikációs lista



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/253/2026.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Pócsi Marianna  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10078187

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pócsi, M.**, Balla, G. J., Fenyvesi, F., Rusznyák, Á., Fejes, Z., Balogh, I., Macek, J. M., Amaral, M. D., Nagy, B. Jr.: Investigation of HE4 expression concerning epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cystic fibrosis epithelial cells.  
*J. Cyst. Fibros. [Epub ahead of print]*, 2026.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2026.03.019>  
IF: 6 (2024)
2. **Pócsi, M.**, Fila, L., Péterfia, C., Halász, A., Szántó, G. T., Mészáros, B., Major, J., Laki, I., Szabó, H., Panyi, G., Balogh, I., Amaral, M. D., Macek, J. M., Nagy, B. Jr.: Comparison of the Effect of CFTR Modulators elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor and lumacaftor/ivacaftor via Serum Human Epididymis Protein 4 Concentration in p.Phe508del-CFTR Homozygous Cystic Fibrosis Patients.  
*J Clin Med. 14* (17), 1-18, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm14176188>  
IF: 2.9 (2024)
3. **Pócsi, M.**, Fejes, Z., Bene, Z., Nagy, A. C., Balogh, I., Amaral, M. D., Macek, J. M., Nagy, B. Jr.: Human epididymis protein 4 (HE4) plasma concentration inversely correlates with the improvement of cystic fibrosis lung disease in p.Phe508del-CFTR homozygous cases treated with the CFTR modulator lumacaftor/ivacaftor combination.  
*J. Cyst. Fibros. 22* (6), 1085-1092, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2023.04.001>  
IF: 5.4





**További közlemények**

4. Bekéné Debreceni, I., Krajcsir, B., Mátrai, Á. A., Ujhelyi, B., **Pócsi, M.**, Balla, G. J., Nagy, B. Jr., Deák, Á., Németh, N., Fülesdi, B., Kappelmayer, J.: IgM-enriched immunoglobulin treatment significantly improves coagulation dysbalance in an experimental animal model of fulminant sepsis.  
*Thromb. Res.* 259, 1-8, 2026.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2026.109607>  
IF: 3.4 (2024)
5. Sütő, R., **Pócsi, M.**, Fagyas, M., Kalina, E., Fejes, Z., Szentkereszty, Z., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Comparison of Different Vascular Biomarkers for Predicting In-Hospital Mortality in Severe SARS-CoV-2 Infection.  
*Microorganisms.* 12 (1), 1-15, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms12010229>  
IF: 4.2
6. Krajcsir, B., **Pócsi, M.**, Fejes, Z., Nagy, B. Jr., Kappelmayer, J., Bekéné Debreceni, I.: Ponatinib Induces a Procoagulant Phenotype in Human Coronary Endothelial Cells via Inducing Apoptosis.  
*Pharmaceutics.* 16 (4), 1-14, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics16040559>  
IF: 5.5
7. Sütő, R., **Pócsi, M.**, Szabo, Z., Fejes, Z., Ivády, G., Kerekes, G., Fagyas, M., Nagy, A. C., Szentkereszty, Z., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Elevated level of serum human epididymis protein 4 (HE4) predicts disease severity and mortality in COVID-19 pneumonia.  
*BMC Pulm Med.* 23 (1), 1-11, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12890-023-02811-y>  
IF: 2.6
8. Csoma, E., Nagy, K. Á., Sütő, R., Szakács, S. E., **Pócsi, M.**, Nagy, A. C., Bíró, K., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Evaluation of the diagnostic performance of two automated SARS-CoV-2 neutralization immunoassays following two doses of mRNA, adenoviral vector, and inactivated whole-virus vaccinations in COVID-19 naïve subjects.  
*Microorganisms.* 11 (5), 1-13, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11051187>  
IF: 4.1





9. Illési, Á., Fejes, Z., **Pócsi, M.**, Bekéné Debreceni, I., Hódosi, K., Nagy, B. Jr., Kappelmayer, J., Kőszegi, Z., Csanádi, Z., Szűk, T.: Technically Challenging Percutaneous Interventions of Chronic Total Occlusions Are Associated with Enhanced Platelet Activation.  
*J Clin Med.* 12 (21), 1-14, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm12216829>  
IF: 3
10. Fagyas, M., Fejes, Z., Sütő, R., Nagy, Z., Székely, B., **Pócsi, M.**, Ivády, G., Bíró, E., Bekő, G., Nagy, A. C., Kerekes, G., Szentkereszty, Z., Papp, Z., Tóth, A., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Circulating ACE2 activity predicts mortality and disease severity in hospitalized COVID-19 patients.  
*Int. J. Infect. Dis.* 115, 8-16, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.028>  
IF: 8.4
11. Fehér, Á., **Pócsi, M.**, Papp, F., Szántó, G. T., Csóti, Á., Fejes, Z., Nagy, B. Jr., Nemes, B. Á., Varga, Z.: Functional Voltage-Gated Sodium Channels Are Present in the Human B Cell Membrane.  
*Cells.* 11 (7), 1-15, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells11071225>  
IF: 6
12. Nagy, P. F., **Pócsi, M.**, Fejes, Z., Bidiga, L., Szabó, E., Balogh, O., Szöllősi, G. J., Nagy, B. Jr., Nemes, B. Á.: Investigation of Circulating MicroRNA Levels in Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation.  
*Transplant. Proc.* 54 (9), 2570-2577, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2022.10.044>  
IF: 0.9
13. Szilágyi, B., Fejes, Z., Rusznyák, Á., Fenyvesi, F., **Pócsi, M.**, Halmi, S., Griger, Z., Kunapuli, S. P., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Platelet Microparticles Enriched in miR-223 Reduce ICAM-1-Dependent Vascular Inflammation in Septic Conditions.  
*Front. Physiol.* 12, 1-14, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2021.658524>  
IF: 4.755
14. Fejes, Z., **Pócsi, M.**, Takai, J., Erdei, J. Z., Tóth, A., Balogh, E., Rusznyák, Á., Fenyvesi, F., Nagy, A., Kappelmayer, J., Jeney, V., Nagy, B. Jr.: Preterm Intraventricular Hemorrhage-Induced Inflammatory Response in Human Choroid Plexus Epithelial Cells.  
*Int. J. Mol. Sci.* 22 (16), 1-20, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22168648>  
IF: 6.208
15. Dzsudzsák, E., Sütő, R., **Pócsi, M.**, Fagyas, M., Szentkereszty, Z., Nagy, B. Jr.: Profiling of lactate dehydrogenase isoenzymes in COVID-19 disease.  
*EJIFCC.* 32 (4), 432-441, 2021.





16. Fejes, Z., Erdei, J. Z., **Pócsi, M.**, Takai, J., Jeney, V., Nagy, A., Varga, A., Bácsi, A., Bognár, L., Novák, L., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Elevated Pro-Inflammatory Cell-Free MicroRNA Levels in Cerebrospinal Fluid of Premature Infants after Intraventricular Hemorrhage. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (18), 1-20, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21186870>  
IF: 5.924
17. Szilágyi, B., Fejes, Z., Pólska, S., **Pócsi, M.**, Czimmerer, Z., Patsalos, A., Fenyvesi, F., Rusznyák, Á., Nagy, G., Kerekes, G., Berhész, M., Szűcs, I., Kunapuli, S. P., Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Reduced miR-26b Expression in Megakaryocytes and Platelets Contributes to Elevated Level of Platelet Activation Status in Sepsis. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (3), 1-22, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21030866>  
IF: 5.924
18. Szilágyi, B., Fejes, Z., **Pócsi, M.**, Kappelmayer, J., Nagy, B. Jr.: Role of sepsis modulated circulating microRNAs. *EJIFCC.* 30 (2), 128-145, 2019.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 75,211**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
14,3**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2026.07.01.



## Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Nagy Béla** tanár úrnak, hogy az elmúlt évek alatt a kísérletek tervezésétől, a prezentációk elkészítésén át, a közlemények és az értekezés megírásáig mindenben segített és mindvégig ösztönözte tudományos tevékenységemet.

Köszönöm korábbi és jelenlegi intézetigazgatómnak **Dr. Kappelmayer János** professzor úrnak és **Dr. Bagoly Zsuzsa** tanárnőnek, hogy a doktori képzés során biztosították a laboratóriumi munkám tárgyi feltételeit. Köszönöm, hogy eredményeinket több hazai és nemzetközi konferencián bemutathattam.

Köszönöm az együttműködő hazai klinikus kollégáknak (**Dr. Nagy Attila, Dr. Bene Zsolt, Dr. Péterfia Csaba, Dr. Halász Adrienn, Dr. Major Judit** és **Dr. Laki István**) az értékes magyar CF-es beteganyag biztosítását.

Köszönetemet fejezem ki a külföldi kollaborációs partnereinknek (**Dr. Libor Fila, Prof. Milan Macek Jr,** és **Prof. Margarida D. Amaral**), hogy a betegminták összegyűjtésében és elküldésében, valamint a kísérletek megtervezésében a segítségünkre voltak.

Köszönöm **Dr. Fejes Zsoltnak, Dr. Balla György Jázonnak** és **Dr. Balogh Istvánnak**, hogy a módszerek kivitelezésével és az eredmények interpretálásával nagyban hozzájárultak a közlemények elkészítéséhez.

Hálásan köszönöm **Dr. Szántó G. Tibornak, Dr. Mészáros Beátának, Dr. Fegyvesi Ferencnek** és **Dr. Rusznyák Ágnesnek** a metodikai beállításokban és mérésekben nyújtott segítségüket.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm Családomnak és Barátaimnak, hogy mellettem álltak és biztatásukkal folyamatosan támogatták munkámat.