

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Új laboratóriumi biomarkerek prognosztikai szerepének vizsgálata  
súlyos COVID-19 betegségben**

Dr. Sütő Renáta

Témavezető: Dr. Nagy Béla



**DEBRECENI EGYETEM  
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2025**

**Új laboratóriumi biomarkerek prognosztikai szerepének vizsgálata  
súlyos COVID-19 betegségben**

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

Írta: Dr. Sütő Renáta általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája  
(Thrombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Nagy Béla, PhD

Az értekezés bírálói: Dr. Harangi Mariann, MTA doktora

Dr. Csorba Zsófia, PhD

A bírálóbizottság: elnök: Dr. Boda Zoltán, MTA doktora

tagok: Dr. Harangi Mariann, MTA doktora

Dr. Csorba Zsófia, PhD

Dr. Papp Gábor, PhD

Dr. Nagy Gergely György, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület, előadóterem.

2025. április 1. 13:00

## I. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A COVID-19 (Coronavirus Disease-19) az ún. „severe acute respiratory syndrome coronavirus-2” (SARS-CoV-2) bétakoronavírus által okozott légúti megbetegedés, ami potenciálisan bármely szerv diszfunkcióját okozhatja, és akár súlyos szisztémás kórképpé teljedhet ki. Az első eseteket 2019 novemberében észlelték Kína Wuhan tartományában. Jelenlegi ismereteink szerint a kórkép eddig világszerte 776,3 millió igazolt fertőzésért és több, mint 7 millió halálesetért tehető felelőssé. A kórokozó egy viszonylag nagyméretű, burokkal rendelkező, egyszálú RNS-t hordozó vírus, amely valószínűsíthetően előbb zoonózissal, majd számos mutáció révén emberről-emberre terjedt. A megfertőződést követően a betegek nagy hányada tünetmentesen esik át az infekción, vagy csak enyhe légúti tünetek alakulnak ki úgy, mint köhögés, orrfolyás, torokfájás, gyakori esetben a szaglás és az ízézés átmeneti zavara. Ezzel szemben a betegek kb. 15%-a súlyos, elsősorban légzőszervi tünetekkel, légszomjjal, fulladásérzéssel, szapora légzéssel, köhögéssel, magas lázzal kórházi kezelést igényel. A fertőzöttek közel 5%-ánál a fenti tünetek az adekvát kórházi kezelés ellenére progrediálnak, és a májat, a vesét, a központi idegrendszert, a gyomor-bél traktust, valamint a vérképzőszerveket érintő szervelegtelenység alakul ki, továbbá tromboemboliás szövődmények manifesztálódnak, amelyek együttesen végül a beteg korai halálához vezetnek.

A SARS-CoV-2 vírussal történő megfertőződés és a súlyosabb klinikai állapot kialakulásának egyaránt jól ismert rizikófaktora az előrehaladott életkor és a férfi nem, továbbá egyes társbetegségek, különösen az endothelsejt károsodásával együtt járó kórképek úgy, mint a magasvérnyomás, egyéb kardiovaszkuláris betegségek, a diabetes mellitus vagy a krónikus veseelégtelenység nem csupán az infekció kialakulásának kockázatát növeli, de független prediktorai is a súlyosabb prognózisnak.

A SARS-CoV-2 laboratóriumi kimutatására elsősorban felső légúti mintát használunk. A megfertőződött betegekben már elég korán, akár a tünetek megjelenésekor kimutatható a vírus RNS RT-PCR teszttel. Az antigén alapú gyorseszteszt a mintában jelen lévő vírusfehérje kimutatásán alapszik. A SARS-CoV-2 fertőzés „utólagosan” is igazolható a szervezet fertőzésre adott sejtes vagy humorális immunválaszának mérésével, amelynek során a SARS-CoV-2 specifikus IgG, IgM vagy IgA osztályú antitesteket mutatjuk ki.

## **A COVID-19 betegség klinikai manifesztációja**

A kórokozó elsődleges behatolási kapuja a felső és alsó légutak hámját borító légúti epithelsejtek, illetve a tüdőben található II-es típusú pneumocyták. A vírus internalizációját, majd sejten belüli replikációját követően az endothelium és az epithel struktúrák súlyos károsodása következhet be, amely fokozott érpermeabilitáshoz, így alveoláris és interstitialis oedema képződéshez vezetnek. A korai ún. exudatív fázisban a II-es típusú pneumocyták által termelt surfactant megkevesbedik, fibrinlerakódások és hyalinmembrán képződés figyelhető meg. A kiterjedt szöveti gyulladás és a masszív sejtkárosodás eredményeképpen sejtszinten apoptózis, szöveti szinten pedig nekrotikus folyamatok indulnak el, amelyek összességében diffúz alveoláris károsodást és a tüdőfunkció számottevő romlását eredményezik. Ezzel párhuzamosan a fibroblasztok kóros proliferációja indul, ami az alveoláris exudatív folyamatokkal, illetve a vaszkuláris struktúrák vírus által kiváltott direkt károsodásával együtt számos citokin (pl. TGF- $\beta$ ) és interleukin (pl. IL-1 $\beta$ ) által mediált irreverzibilis pulmonális károsodáshoz, összességében ún. „acute respiratory distress syndrome”-hoz (ARDS-hez) vezethet. Eközben az endothelsejtek aktivációjának eredményeképpen a tüdő kapilláris hálózatában jelentősen megemelkedik a pro- és antiinflammatorikus mediátorok, valamint a neutrophilek és monocyták mennyisége. Az atelektázia és a konszolidált tüdőterületek arányának növekedése, illetve a tüdő vérellátásának zavara, a hajszálerek trombotikus és immunmediált obstrukciója, valamint a söntkeringés kialakulása miatt bekövetkező ventilációs-perfúziós aránytalanság összességében a gázcsere hatékonyságának drámai leromlását eredményezik.

A COVID-19-asszociált ARDS-ben szenvedő betegek esetében gyakran előfordulnak egyéb másodlagos szervérntettségek. A szív- és érrendszert érintő rendellenességek közül myo/pericarditis, szív ischemia és arrhythmia léphet fel leginkább, 20%-ban életet veszélyeztető malignus ritmuszavar vagy szív megállás következhet be. A kritikus állapotú SARS-CoV-2 fertőzött betegek esetén gyakorta érintett lehet a vese is, akár vesepótló kezelést igénylő akut vesekárosodás is kialakulhat. A vese érintettségének magas aránya több sérülési mechanizmus útján magyarázható, amelyek között megemlíthető a csökkent vérátáramlás, a glomeruláris mikrothrombusok jelenléte, illetve a renin-angiotenzin-aldoszteron (RAAS) autokrin rendszer aktivációja is. A kritikus állapotú páciensek egyharmadánál neurológiai manifesztációk jelenhetnek meg, úgy mint a centrális és perifériás idegrendszert érintő inflammációs kórképek (pl. myelitis, meningoencephalitis, encephalopathia stb.).

## **A SARS-CoV-2 fertőzés molekuláris patomechanizmusa**

A SARS-CoV-2 emberi sejtekbe történő internalizációjának kulcsmolekulája a humán sejtek felszínén jelen lévő ACE2 glikoprotein. Emberben legfőképp a nazális és bronchiális epithelsejteken, illetve a II-es típusú pneumocytákon expresszálódik ez a receptor. Az ACE2 fertőzésben betöltött közvetlen szerepét támasztja alá az a megfigyelés is, mely szerint a fehérjét bőségesen expresszáló szövetek megfeleltethetők a vírus organotropizmusának. A SARS-CoV-2 vírus négy, a genom által kódolt fehérjét tartalmaz, az M („membrane”) protein a külső burok legfontosabb strukturális alkotója, az E („envelope”) fehérje egy, a burokban jóval kisebb arányban jelenlévő alkotórész, a víruspartikulumok összeszerelésében és a gazdasejtől történő kijutásában játszik szerepet, az N („nucleocapsid”) protein pedig az örökítőanyagot körbevevő belső héj alkotója. Infektológiai szempontból a legnagyobb jelentőséggel a külső burokból kiemelkedő S („spike”) protein rendelkezik. Két alegységből (S1 és S2) épül fel és a gazdasejthez történő kötődésben van szerepe. A sejtfelszínen expresszálódó ACE2-hez kapcsolódva az S1/S2 komplexben konformációváltozás zajlik le, melynek során a vírusfehérjéből szabadabbá váló aminosav szekvencia indukálta intracelluláris proteáz stimuláción keresztül a vírus külső burka és a sejtmembrán összeolvad, ami endocitózishoz vezet. A membránfüzióban a „transmembrane protease serine 2” (TMPRSS2) nevű sejtfelszíni fehérjének kiemelkedő szerepe lehet: klinikai vizsgálatok során a molekula működésének gátlása megakadályozta a vírus gazdasejtbe történő internalizációját, így a sejt megfertőződését. Noha a legutóbbi *in vitro* tanulmányok szerint az emberi endothelsejteken jóval alacsonyabb koncentrációban mutatható ki az ACE2, mint a légúti epithelsejteken, a véráramba bekerülő víruspartikulumok által kiváltott direkt endothelaktiváció, az intracelluláris vírusreplikáció és a következményes vaszkuláris diszfunkció továbbra is egy általánosan elfogadott teória.

## **Az ACE2 szerepe a COVID-19 betegség lezajlásában**

Az ACE2 egy metalloproteáz aktivitással rendelkező enzim-molekula, a homeosztázisért felelős RAAS egyik kulcsmolekulája. A vese hipoperfúzió, a hiponatrémia vagy a szimpatikus idegrendszer aktivációja eredményeképpen a vese glomeruláris sejtjeiben pro-renin képződik, amely vagy helyben, vagy a más szövetek által expresszált pro-renin-receptorhoz kötődve aktív reninné alakul. A máj által termelt angiotenzinogént a renin angiotenzin I (Ang I)-re transzformálja. Az Ang I a tüdőben termelődő angiotenzin konvertáló enzim (ACE) szubsztrátja, amiből angiotenzin II (Ang II) képződik, amely potens végtermékként a szervezetben diffúzan jelenlévő angiotenzin receptor 1 és 2-n (AT1R és AT2R) keresztül számos

folyamatot regulál: a szív-érrendszerben artériás és vénás vasokonstriktiót, hipertenziót és tachycardiát eredményez, a mellékvesekéregben aldoszteron felszabadulást, a vese disztális tubulusaiban következményes nátrium-retenciót és káliumkiválasztást produkál, míg a hypothalamus és hypophysis stimulációjával antidiuretikus hormon (ADH) szint emelkedést és szomjúságérzetet generál.

Az utóbbi néhány évtizedben derült fény arra, hogy az Ang II az AT1R-n keresztül a MAPK és a Rho proteinek által az NF- $\kappa$ B mediált szignáltranszdukciós útvonalon proinflammatorikus gének aktivációját is elősegíti. Mindez érpermeabilitás fokozódást okoz, továbbá számos citokin és kemokin, valamint sejtadhéziós molekula termelődését idézi elő, pl. a Vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1), amelyek együttesen a gyulladásos folyamatokban résztvevő sejtípusok migrációját segítik elő. Emellett az Ang II a thrombocytá adhéziós molekulák (pl. P-selectin), valamint a szöveti faktor (TF) és a plazminogén aktivátor inhibitor-1 és 2 (PAI-1, PAI-2) endothelsejt és simaizomsejt általi expressziójának fokozása révén a lokális thrombosis valószínűségét is emelheti. Az AT1R általi aktiváció révén megvalósuló proinflammatorikus és prokoagulációs folyamatok ellensúlyozását szolgálják az AT2R-n keresztül megvalósuló protektív hatások. A receptor aktiválódása az endothelsejtek nitrogén-oxid (NO) termelődését fokozza és bizonyos sejteken belül az NF- $\kappa$ B mediált jelátviteli kaszkád aktivációját gátolja.

Az ACE2 enzim szubsztrátja az Ang I és Ang II, melyekből proteolitikus hasítás révén angiotenzin 1-9 (Ang 1-9) illetve angiotenzin 1-7 (Ang 1-7) képződik. Az utóbbi a mitochondrial assembly receptorhoz (MASR) kötődik, ami vazodilatációt okoz csökkentve ezzel a vérnyomást, továbbá gátolja az érfal thrombotikus, flogisztikus és profibrotikus folyamatait, így egyfajta belső ellensúlyként funkcionál az extenzív Ang II képződéssel szemben.

Bizonyos krónikus gyulladással járó kórállapotokban a sejtek felszínén expresszálódó ACE2 a proteáz aktivitással rendelkező fehérje (A disintegrin and metalloproteinase 17, ADAM17) hatására lehasad, és a véráramban kering tovább. A lehasadás következtében az ACE2 funkciója károsodik, és balanszírozó képességét elveszíti. Ezt támasztják alá azok a megfigyelések, miszerint egyes kardiovaszkuláris kórképekben, mint magasvérnyomásban, aorta stenosisban, szívelégtelenségben és pitvarfibrillációban szenvedő betegek vérében a keringő ACE2 mennyisége jelentősen megemelkedik.

SARS-CoV-2 infekció esetén a RAAS mindkét "karja" (Ang II/AT1R/NF- $\kappa$ B útvonal indukció), illetve az Ang 1-7/Ang 1-9/AT2R/NF- $\kappa$ B útvonal gátlás) extenzíven működik. A még sejt felszínén lévő ACE2-t az ADAM17 enzim a sejt felszínről lehasítja és szolubilizálódik. A

bontóenzimének (vagyis az ACE2) aktivitáscsökkenése miatt az Ang II mennyisége emelkedik. Összességében az ACE2 expresszió redukciója a protektív kardiovaszkuláris hatás csökkenéséhez, végső soron a proinflammatorikus és prokoaguláns hatások arányának előbb lokális, majd generalizált megnövekedéséhez vezethet. Ugyanakkor a felszabaduló ACE2 fehérje és a víruspartikulák S-proteinen keresztüli egymáshoz való kötődésének feltételezhetően lehet kedvező hatása is, mivel ez gátolhatja a vírusreplikációt.

A fentiekben részletezett mechanizmusok alapján súlyos COVID-19 betegségben a szolubilis ACE2 mennyiségének növekedését várnánk, viszont a témában publikált vizsgálatok során ellenmondásos eredmények születtek. Munkacsoportunk - a jelen vizsgálatokat megelőzően - egy kritikus állapotú COVID-19 beteg nyomonkövetése során a szolubilis ACE2 emelkedett szérumszintjét detektálta. Ezért fontosnak tartottuk nagy betegszám mellett ezen előzetes eredmények további vizsgálatát.

#### **A HE4 protein mérésének lehetséges szerepe COVID-19 kórképben**

A HE4 az ún. whey acidic protein (WAP) fehérje család tagja, a *WFDC2* gén terméke. A WAP fehérje családba olyan antiproteáz és antibakteriális aktivitással, illetve gyulladáscsökkentő hatással rendelkező proteinek sorolhatók, amelyek a tüdőben nagy mennyiségben képződnek és a kórokozók proteolitikus folyamatainak kivédésében játszanak jelentős szerepet. A Secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI) és az elafin a csoport két prominens tagja, melyek elsősorban neutrophil elastase-ra kifejtett gátló hatásuk révén egyes baktériumok (pl. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* stb.), gombák (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*), illetve retrovírusok (pl. Humán Immundeficiencia Vírus - HIV) ellen is hatékony védelmet biztosíthatnak.

A HE4 egy kisméretű szekretoros glikoprotein, amely elsőként a spermiumok érési folyamataiban feltételezett szerepe miatt vált ismertté. Azóta számos humán szövetben kimutatták az expresszióját és szerin valamint cisztein proteáz inhibitor hatásán keresztül a proteolitikus tulajdonsággal rendelkező mikrobák elleni védelemben játszik szerepet. Az egészséges szövetek normál expressziójával szemben a légzőrendszer, az emlő és a reprodukzív szervek egyes daganatos megbetegedéseikor viszont jelentős mértékben megnő az expressziója és magas koncentrációban van jelen a keringésben, ami alkalmassá teszi biomarkerként történő használatát malignus kórképek (pl. petefészekrák, tüdőrák) progressziójának megítélésében. Ugyanakkor nem malignus pulmonológiai betegségekből, úgy, mint cisztás fibrózis, tuberculosis és intersticiális tüdőbetegségben is a szérumszint jól követte a gyulladáscsökkentő

folyamatok súlyosságát és ezáltal alkalmas laborparaméter volt a betegek klinikai állapotának értékelésében. Korábbi klinikai vizsgálatok során bakteriális ARDS-ben a jelentősen emelkedett szérum HE4 koncentráció szoros kapcsolatot mutatott a kedvezőtlen kimenetellel. Ezidáig mindössze két publikáció ismert, amely a HE4 szérumszint prognosztikai szerepét vizsgálta COVID-19 betegségben, ezért a HE4 szerepének további elemzését fontosnak tartottuk súlyos COVID-19-ben.

### **Az endothelsejt diszfunkció kialakulása és molekuláris karakterisztikája súlyos COVID-19 betegségben**

A vaszkuláris endothélium fiziológiás esetben számos funkciót lát el a szervezet normális homeosztázisának fenntartása érdekében: befolyással bírnak a hemosztázis, az oxidatív stressz, a gyulladás, a vaszkuláris permeabilitás, a véráramlás és a véralvadás folyamatára, illetve az érfal integritásának biztosítására egyaránt. Mindezen felül a véráramba bejutó infektív ágensek elleni első védelmi vonalként is kiemelkedő szereppel bírnak. Nyugalmi állapotban az endothélium antikoaguláns, antiadhezív és vasodilatatív karakterisztikával jellemezhető.

Endothelium diszfunkcióról akkor beszélünk, ha a fent említett endotheliális funkciók közül egy vagy több sérül. A véráramba jutott kórokozók vagy azok valamely alkotója az endothelsejtek felszínén és az intracelluláris térben elhelyezkedő ún. „pattern recognition receptor” (PRR) molekulákon keresztül egy konzervált, nem specifikus antivirális gyulladásos kaskádmechanizmust indítanak el, amely a sejten belüli az NF- $\kappa$ B és MAPK szignáltranszdukciós útvonalakon keresztül IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , és INF- $\gamma$ , továbbá különböző sejtadhéziós molekulák (pl. E-selectin, P-selectin, ICAM-1, VCAM-1) megnövekedett expresszióját eredményezi. Az endothélium monolayer megbomlása következményes permeabilitásfokozódást generál, illetve lehetővé teszi a kötőszövetben jelenlévő prokoaguláns faktorok, pl. TF, a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1), a von Willebrand faktor (vWF) és az urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA) felszabadulását. A SARS-CoV-2 okozta fertőzés esetén az endothelsejtek és a fehérvérsejtek, illetve a vérlemezkék közötti intercelluláris kapcsolatok bizonyítottan kiemelkedő szerepet játszanak a szövődményként gyakran detektált myocardialis infarctus (MI), a vasculitis, az interstitialis pneumonitis és az ARDS kialakulásában. Az indirekt sejtaktivációs mechanizmusok mellett az endothelsejtek felszínén jelenlévő ACE2 glikoproteinen keresztül megvalósuló közvetlen

fertőződés, a következményes sejtaktiváció és károsodás, illetve sejtapoptózis is vélhetően nagy jelentőséggel bír.

A krónikus endothélium gyulladás és diszfunkció jellegzetes megnyilvánulási formája az atherosclerosis, amely az érendothelsejtek, a vérlemezkék, a makrofágok és a környező simaizomsejtek kóros működésének eredményeképpen alakul ki. A legutóbbi klinikai vizsgálatok alapján a sclerotikus plakk magját képező nekrotikus szövetszaporulat kialakulásában a Lp-PLA<sub>2</sub>, más néven „platelet-activating aethyl-hydrolase” molekula kulcsszerepet játszik. Az Lp-PLA<sub>2</sub> a makrofágok által termelt, a vérben az alacsony denzitású lipoproteinnel (LDL) komplexben keringő fehérje, és az oxidált foszfolipidekből hidrolízis útján proinflammatorikus karakterrel rendelkező mediátorokat hoz létre. A szérumban detektálható Lp-PLA<sub>2</sub> szint hatékony biomarkernek bizonyult az arteriosclerosis eredményezte visszatérő koszorúérbetegség és a stroke rizikóbecslése során, valamint a lipid anyagcserezavarokban fennálló prokoaguláns hajlam értékelésében is. COVID-19 betegségben a lipidanyagcsere érintettsége és az endothélium funkciókárosodása ellenére az Lp-PLA<sub>2</sub> mennyiségi változásának prediktív értékéről korlátozott számú eredményekkel rendelkezünk.

### **Az LDH izoenzimek aktivitásának lehetséges eltérése COVID-19 betegségben**

Az LDH enzim egy, a szervezet minden sejtje által termelt oxidoreduktáz, amely a piruvát-laktát reverzibilis átalakulását segíti elő. Sejtsérülés esetén a fehérje a véráramba kerül, ahol aktivitása jelentősen megemelkedhet. A molekula tetramer szerkezetű és két (M - muscle és H - heart) alegység különböző kombinációiból épül fel, melyeket izoenzimnek nevezünk és termelődésük bizonyos mértékben szövetspecifitást mutat. Humánban összesen öt izoenzimet különböztetünk meg: az LDH-1 (4H alegység) döntően a szívizom, az LDH-2 (3H1M) a retikuloendotheliális rendszer, az LDH-3 (2H2M) a tüdő, az LDH-4 (1H3M) a vese, míg az LDH-5 (4M) a máj és a vázizom sejtjei által termelődik. Rutin laboratóriumi körülmények között a szérumban lévő össz LDH aktivitást mérjük, mely az egyes izoenzim aktivitásának összegéből adódik. Számos más, rutinban mérhető laboratóriumi paraméter mellett a LDH-ról is bebizonyosodott, hogy COVID-19 betegségben a súlyosság tekintetében független prediktív faktorként viselkedik, illetve képes előrejelezni a súlyos tüdőkárosodást és a légzési elégtelenséget, továbbá a kedvezőtlen kimenetelt. Bár korábbi vizsgálatok feltárták a más respiratórikus kórállapotokra jellemző LDH-izoenzim mintázatokat, a COVID-19 kórkép esetében csak kevés klinikai eredmény áll rendelkezésünkre.

## II. Célkitűzések

### **A szolubilis ACE2 aktivitás változásának vizsgálata súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegek kimenetelével összefüggésben**

A korábbi eredmények alapján kíváncsiak voltunk arra, hogy a szérumban keringő ACE2 aktivitása korrelációt mutat-e a COVID-19 klinikai súlyosságával és látható-e aktivitásbeli különbség az eltérő etiológiájú, súlyos bakteriális szepszishez képest a SARS-CoV-2 okozta vaszkuláris eltérések esetén. Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegségben szenvedő betegek szérummintáinak ACE2 aktivitását megmértük és összehasonlítottuk az egészséges populációban ismert értékekkel, illetve súlyos nem SARS-CoV-2 okozta szepszis miatt kezelt betegek eredményeivel,
- a SARS-CoV-2 fertőzött betegeknél a kórházi kezelés előtt és a kezelés alatt is meghatároztuk a szolubilis ACE2 aktivitását a molekula potenciális prediktív és prognosztikai értékének megítélése céljából,
- az ACE2 aktivitásértékeket a rutin laboratóriumi gyulladáshoz köthető markerekkel korreláltatva is megvizsgáltuk, és statisztikai analízissel igyekeztünk kiszűrni a független változóként viselkedő paramétereket.

### **A pulmonális gyulladáshoz köthető biomarker HE4 szérumszintjének vizsgálata eltérő súlyosságú COVID-19 pneumóniában szenvedő betegekben**

A légúti epithelsejtek által expresszált HE4 protein vizsgálata az elsősorban légúti fertőzést okozó súlyos SARS-CoV-2 infekció esetén kézenfekvőnek tűnt. Ezért megvizsgáltuk

- az enyhe, közepesen súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegekben a HE4 szérumszint változását a kórházi felvétel előtt, illetve a betegek egy részénél utánkövetéses mintákban is,
- a HE4 értékeket korreláltattuk a rutin laboratóriumi paraméterekkel és a klinikai állapot súlyosságával különös tekintettel a pulmonológiai érintettségre,
- a kórházi kezelés megkezdése előtt mért HE4 szérumszinteket összefüggésbe hoztuk a klinikai progresszióval és a betegség végkimenetelével az esetleges prognosztikai jelentőség megítélése céljából.

## **Endothelsejt diszfunkciót és a vérlemezke aktivációt jellemző biomarkerek koncentrációjának vizsgálata súlyos COVID-19-ben**

A COVID-19 kórkép patomechanizmusában megkérdőjelezhetetlen szerepet játszik az endothélium strukturális és funkcionális sérülése, ami kaszkádszerű gyulladáson és koagulációs mechanizmust indíthat el az érpályán belül. Az ekkor termelődő inflammációs proteinek és a másodlagosan bekövetkező vérlemezke aktiváció jelzőmolekulái a szérumban mérhetők. Ebből következően

- retrospektív módon vizsgáltunk néhány sejteredetű paramétert a SARS-CoV-2 fertőzés okozta ARDS-ben szenvedő túlélők és a kedvezőtlen kimenetelt mutató betegek szérummintáiban és kontrollcsoportként enyhe légúti fertőzés tüneteit mutató, de SARS-CoV-2 specifikus RT-PCR negatív betegek mintáit analizáltuk,
- az endothelsejt diszfunkció detektálása érdekében a VCAM-1, E-selectin, ACE2 és Lp-PLA2 szintek meghatározását végeztük, míg a vérlemezke aktiváció jellemzésére a szolubilis P-selectin és CD40L kimutatását választottuk,
- a fenti biomarkerek emelkedett szérumszintje és a COVID-19 betegség kimenetele közötti esetleges relációt állapítottuk meg.

## **Az LDH egyes izoenzimjeinek vizsgálata enyhe/közepesen súlyos és súlyos COVID-19 betegségben**

Feltártuk az LDH egyes izoenzimjeinek aktivitás változásait két eltérő klinikai súlyosságú, COVID-19 tüdőgyulladásban. Ennek érdekében

- a kórházi felvételt igénylő, súlyos és enyhe/közepesen súlyos COVID-19 betegségben szenvedő betegek szérummintáiban meghatároztuk az össz LDH aktivitást és eredményeinket korreláltattuk a klinikai állapot súlyosságával,
- egyenként megmértük az egyes LDH izoenzim aktivitását, majd összefüggést kerestünk az izoenzim aktivitás értékei és más, rutin laboratóriumi paraméterek szérumszintje között,
- kapcsolatot kerestünk a tüdőérintettség kiterjedése és az LDH izoformák eltéréseinek mintázata között.

### **III. Anyagok és módszerek**

A doktori értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények vizsgálatai során egy nagyszámú COVID-19 betegcsoport szérummintáit dolgoztuk fel a különböző biomarkerek analíziséért. A megfogalmazott célkitűzéseink megválaszolása érdekében a betegeket különböző alcsoportokba soroltuk és követtük a klinikai állapotuk kimenetelét. A laboratóriumi mérések során számos metodikai körülmény átfedést mutatott, így ezek nem közleményenként, hanem egységesítve kerülnek bemutatásra.

#### **Betegek és kontrollok**

Kutatásaink során a SARS-CoV-2 okozta második és harmadik fertőzési „hullám” alatt (2020 decemberétől 2021 júliusáig) a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Infektológia Klinikán, valamint a Kenézy Gyula Campus Központi Intenzív Osztályán kezelt enyhe, súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegektől nyert vérmintákat dolgoztuk fel. Számos beteget a Jelölt maga kezelt. Ezen vizsgálati populáció mellett a szolubilis ACE2 szérumaktivitás mérések során a Budapesti Jahn Ferenc Dél-pesti Centrumkórház Országos Hematológiai és Infektológiai Intézetben kezelt és rendelkezésünkre bocsátott, szintén COVID-19 betegségben szenvedő betegek kisebb csoportjának a mintáit is bevontuk. A teljes vizsgált betegpopulációban 18 és 87 év közötti betegek szerepeltek. A vizsgálatokban szereplők körében a komorbiditási adatok a kezelőorvosok által rendelkezésünkre álltak. Az ismert rosszindulatú tumoros megbetegedést, az autoimmun kórképet, az idült tüdőbetegséget és a terhességet általános kizáró tényezőként kezeltük. A vizsgálati csoportunkba beválogatott betegek mindegyikénél az orr-garat váladékból elvégzett RT-PCR módszerrel került igazolásra az akut SARS-CoV-2 fertőzés. A kórházi felvételt követően a súlyos vagy kritikus állapotú COVID-19 betegek elhelyezése intenzív terápiás osztályon történt, míg az oxigénterápiát igénylő, de stabil állapotú betegek nyílt kórházi részlegen kerültek elhelyezésre. A klinikai állapot súlyosságának megítélésére minden esetben az ún. „Sequential Organ Failure Assessment” (SOFA) pontrendszert alkalmaztuk. Az oxigén-szupplementáció iránti igény és így közvetve a tüdő funkcionális állapota a Horowitz-indexszel került kikalkulálásra, amely a belélegzett gázkeverék oxigénfrakciójából ( $FiO_2$ ) és a beteg artériás vérében mérhető oxigén-nyomásból számítható ki ( $PaO_2$ ), mértékegysége Hgmm (vagy kPa). A Horowitz-kvóciens (más néven  $Pa/Fi$  index) normális értéke oxigén szupportáció nélkül normál légköri nyomás esetén 350-450 Hgmm. A belélegzett és az artériás vérben mérhető oxigénszint különbség a pulmonális ventillációs és perfúziós kapacitásról árulkodik. Amennyiben akár a tüdőterületek átszellőzése, akár az alveolusoktól

történő oxigénszállítás zavart szenved, az a Pa/Fi arány csökkenésében jelenik meg. Az ARDS a légzési elégtelenség legsúlyosabb formája, amelynek definícióját a 2012-ben lefektetett Berlin-kritériumok határozzák meg. A Horowitz-index alapján az ARDS - súlyosságát illetően - három kategóriára osztható: ha a Horowitz index értéke 200-300 Hgmm közötti, enyhe, ha 100-200 Hgmm közötti, közepes, míg 100 Hgmm alatt súlyos ARDS-re utal. A vizsgálataink során kontrollcsoportként bevont bakteriális szepszisben szenvedő betegek esetén a szepszis diagnosztikai kritériumait az Amerikai Tüdőgyógyász és Intenzív Terápiás Társaság kritériumrendszere alapján állapítottuk meg („American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus criteria”).

A kórházi felvételt igénylő COVID-19 betegek esetén alkalmazott standard terápia a vizsgálat idején érvényben lévő magyarországi szakmai ajánlásnak („2020. évben azonosított új koronavírus [SARS-CoV-2] okozta fertőzések [COVID-19] megelőzésének és terápiájának kézikönyve”) megfelelően történt. Az oxigénterápia, a noninvazív és invazív lélegeztetés a betegek mindenkor oxigényigényének figyelembevételével került bevezetésre. A klinikai állapot progressziójának nyomonkövetését a korábban már bemutatott SOFA-pontrendszer és Horowitz-index rendszeres újraértékelésével végeztük. A betegek demográfiai jellemzői, társbetegségei, a mellkas CT-n látható tüdőérintettség, a terápiás modalitások, a kórházi kezelés hossza és a kimenetel tekintetében a kezelőorvosok által szolgáltatott adatokra hagyatkoztunk.

A szolubilis ACE2 és a HE4 vizsgálatok során kontroll csoportként olyan kritikus állapotú bakteriális szeptikus betegeket válogattunk be, akik SARS-CoV-2 RT-PCR tesztje negatív eredményt adott és a bakteriális fertőzés ténye mikrobiológiai módszerekkel igazolva volt. A szepszis diagnózis felállítását az ACCP/SCCM (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus) érvényben lévő diagnosztikus kritériumai szerint végeztük. A VCAM-1, Lp-PLA2, E-selectin, P-selectin és CD40L markereket tanulmányozó mérésorozatunk során kontrollként enyhe légúti tüneteket mutató, Debreceni Egyetem Klinikai Központ Belgyógyászati Intézetben kórházi kezelésben részesülő, SARS-CoV-2 negatív betegek összegyűjtött szérummintáit használtuk.

A kórházi felvételkor, bárminemű terápiás beavatkozás megkezdése előtt, az összes résztvevőtől alvadásgátolt (szérum) mintavétel, valamint nátrium-citrátot tartalmazó Vacutainer® csövekbe perifériás vénás vér levétele történt, melyet lehetőség szerint követéses mintákkal egészítettünk ki a hazabocsátás vagy az exitus előtt. A kontroll csoportok tagjaitól a kórházi kezelés első 24 órájában történt a mintavétel.

## Vizsgálati módszerek

A rutin laboratóriumi vizsgálatokra a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetben került sor. A már bealvadt vérmintákból a sejtalkotók centrifugálását követően a felülúszó szérumot eltávolítottuk és további feldolgozásig  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az alvadásgátolt vérmintákat szintén lecentrifugáltuk, hogy a citrátos plazmát eltárolhassuk. A fehérvérsejtszámot, a vérlemezkeszámot, a hemoglobin koncentrációt és az átlagos vérlemezke térfogatot (mean platelet volume - MPV) rutin körülmények között egy Advia<sup>®</sup> 2120 Hematology System automatán (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NJ, USA) határoztuk meg. A C-reaktív protein (CRP), a procalcitonin (PCT), az IL-6, a ferritin, és a cardiac troponin-T (cTnT) koncentráció kimutatása elektro-kemilumineszcens immunoassay (Cobas<sup>®</sup> e411, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) segítségével történt, míg a D-dimer meghatározáshoz immunoturbidimetriás méréseket végeztünk (BCS<sup>®</sup> XP, Siemens, München, Németország). Az enzimaktivitások vizsgálata (aszpartát-aminotranszferáz [AST] és alanin-aminotranszferáz [ALT], valamint az LDH) és a kreatinin, illetve az urea meghatározása kinetikus kolorimetrikus assay-vel történt Cobas<sup>®</sup> 6000 analízátor készülék segítségével (Roche Diagnostics). A becsült glomerularis filtrációs ráta (eGFR) értékét a „CKD-EPI” (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) egyenlete alapján határoztuk meg.

Az LDH egyes izoenzimjeinek aktivitását gélelektroforézis segítségével analizáltuk (LDH Hydragel<sup>®</sup> 7 kit [Sebia, Norcross, GA, USA]) 8,4 pH-n agaróz gélen. Az elkülönített izoenzim vizualizációja speciális kromogén szubsztráttal történt. A kapott formazán precipitátum mennyisége az LDH izoenzim aktivitásával volt arányos. A félautomata HYDRASYS<sup>®</sup> elektroforézis készülék (Sebia) segítségével futattuk a mintákat az agaróz gélen. A megszáradt gélről denzitometria segítségével határoztuk meg az egyes izoformák relatív mennyiségét. Az LDH izoenzim arányát a Hydragel<sup>®</sup> 7 kit gyártó utasításai alapján kalkuláltuk ki. A mérések kivitelezésében Dzsudzsák Erika analitikus (DE, Laboratóriumi Medicina Intézet) nyújtott segítséget.

A szérum ACE2 aktivitás ELISA-val történt meghatározásához egy specifikus fluoreszcens szubsztrátot alkalmaztunk egy korábbi közleményben bemutatott módszer alapján. A mérések kivitelezésében Dr. Fagyas Miklós (DE, Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék) segítségét köszönjük.

A HE4 szérumszint mérése automatizált immunoassay segítségével történt (Architect<sup>®</sup> i1000SR, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Németország). A minták VCAM-1, E- és P-selectin, valamint CD40L szintjét kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA kiték segítségével mutattuk ki a gyártó utasításai alapján (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), míg az Lp-

PLA2 detektálása - szintén a gyártó utasításai alapján - egy másik automatizált kemilumineszcens immunoassay-vel történt (Snibe Maglumi® 800, Snibe, Shenzhen, Kína).

### **Statisztikai számítások**

Az adatok normalitásának vizsgálatára Shapiro-Wilk és Kolmogorov-Smirnov tesztet használtunk. Két tanulmányunk lefolytatása előtt a már csak limitált számban elérhető „minta-pool” miatt a méréseket megelőzően az Intercooled Stata v17 program segítségével 90 %-os statisztikai erő és 0,05  $\alpha$  érték mellett meghatároztuk a szignifikáns különbségek kimutatásához szükséges legkisebb mintaszám nagyságát. Korábbi közlemények alapján a HE4 szérumszint mérésekor a súlyos és kritikus állapotú COVID-19 fertőzött csoportok esetében meghatározott középértéket (145,7 pmol/l, valamint 284,0 pmol/l) és a hozzá tartozó standard deviáció értékét (118,4 pmol/l, valamint 201,6 pmol/l) vettük figyelembe, és a legkisebb kívánatos mintaszám alcsoportonként 30-nak bizonyult. A szolubilis E-selectin meghatározás esetén a kedvező és kedvezőtlen kimenetellel rendelkező intenzív osztályos kohorszok vizsgálatai alapján 33,7 ng/ml, illetve 60,6 ng/ml medián értékek és 25,0–45,5 ng/ml, valamint 49,2–111,6 ng/ml IQR mellett, a minimális mintaszám 33 volt. Eredményeinket medián érték (interkvartilis tartomány, IQR) formában fejeztük ki. Két kohorsz mintáinak összehasonlítására Mann-Whitney U tesztet vagy  $\chi^2$  tesztet, illetve Fisher-féle egzakt próbát alkalmaztunk. A kórházi kezelés előtti és a követéses minták szérumszintjeinek összevetése Wilcoxon-féle párosított teszttel történt. Kettőnél több csoport összehasonlítása során Kruskal-Wallis tesztet végeztünk Dunn-féle *post-hoc* analízissel. A vizsgált biomarkerek, valamint más klinikai és laboratóriumi paraméterek közötti korreláció kimutatása Spearman teszttel történt, ahogy az össz LDH és az egyes LDH izoenzimek aktivitásai közötti kapcsolat vizsgálata is. A kórházi felvételkor mért biomarker szérumszintek és a Horowitz-index klinikai progresszióra és kimenetelre gyakorolt diszkriminatív erejét ROC görbe (receiver operating characteristic) analízissel értékeltük az AUC (area under the curve) érték meghatározásával. A küszöb értékeket a Youden-index maximuma alapján határoztuk meg. Többszörös logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk a vizsgált szérumaktivitások prognózisra és klinikai kimenetelre gyakorolt hatásának feltárása érdekében, valamint a demográfiai és komorbiditási jellemzők és a rutin laboratóriumi paraméterek, mint függő változók relációinak vizsgálatára. A  $p < 0,05$  valószínűségi szintet tekintettük szignifikánsnak. A statisztikai analízishez GraphPad Prism® szoftvert használtunk (6.01 verzió, La Jolla, CA, USA).

## IV. Eredmények

### 1) A szolubilis ACE2 aktivitás súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegekben jól korrelál a kórkép súlyosságával, valamint képes előrejelezni a várható kimenetelt

Egy korábbi tudományos közleményünk alapján a szolubilis ACE2 aktivitás jelentős emelkedése súlyos COVID-19 tüdőgyulladásban szenvedő betegek esetében igazolást nyert. Vizsgálataink során ezért egy nagy betegpopulációban még a kórházi kezelést megelőzően a szérumban meghatároztuk az ACE2 aktivitást, és kerestük a klinikai állapot súlyosságával, illetve a kedvezőtlen kimenetellel való összefüggését.

#### *A vizsgálatban résztvevő súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegek demográfiai és anamnesztikus jellemzői*

Ebbe a tanulmányba összesen 176, RT-PCR vizsgálattal igazolt COVID-19 pozitív egyént vontunk be. A kórházba érkezést követően ún. triázs-vizsgálat során kritikus, illetve súlyos, de stabil állapotú betegekből álló alcsoportot képeztünk. A 110 kritikus állapotú betegből álló csoport átlagéletkora magasabb volt, mint a 66, enyhébb klinikai tüneteket mutató kohorszé (medián [IQR] 67 [59-76] év vs. 61 [52-65] év;  $p < 0,0001$ ), a nemek arányában különbség nem mutatkozott. A kórházi kezelés időtartamában szignifikáns különbség nem volt (medián [IQR] 10 [5-19] nap vs. 8 [6-12] nap;  $p = 0,1517$ ). Gépi lélegeztetési igényben jelentős differencia mutatkozott a két csoport között (96 fő a kritikus állapotú csoportban szemben a súlyos állapotú COVID-19 betegek esetében talált 6 fővel). A kimenetel tekintetében is szignifikáns eltérést detektáltunk, miszerint a kritikus állapotú betegek körében 78,2% volt az elhalálozás aránya, míg a súlyos állapotú betegeknek csupán 4,5%-a mutatott kedvezőtlen prognózist ( $p < 0,0001$ ). A szérum ACE2 meghatározással párhuzamosan a rutin laboratóriumi paraméterek vizsgálatára is sor került a kórházi kezelést megelőzően. A kritikus állapotú COVID-19 betegek csoportjában a gyulladáshoz kapcsolódó laborparaméterek úgy, mint a CRP, IL-6, szérum ferritin és fehérvérsejtszám jelentősen magasabbnak bizonyultak. A szakirodalmi megfigyelésekkel ellentétben esetünkben a vérlemezkeszámban jelentős eltérés a két kohorsz között nem igazolódott. A kor és a nemi eloszlás alapján a súlyos állapotú COVID-19 csoporthoz illesztett nem COVID-19 etiológiájú súlyos szepszikus betegek az előbbiekhöz hasonló SOFA-értékekkel rendelkeztek, noha a mortalitási arányuk elmaradt a súlyos COVID-19 csoporthoz képest. Azon betegek esetén, akiknél súlyos fokú légzési elégtelenség állt fenn, Horowitz-indexet számoltunk

a pulmonális funkció és az oxigenizációs kapacitás dinamikus meghatározása érdekében. A kritikus állapotú, előrehaladott ARDS-ben szenvedő COVID-19 betegek körében (103 [71-160] Hgmm,  $p < 0,0001$ ) szignifikánsan alacsonyabb kvócienszt számítottunk, mint a súlyos, de nem kritikus COVID-19 betegekben (147 [89-222] Hgmm,  $p < 0,0001$ ), vagy a nem COVID-19 etiológiával bíró szeptikus betegek (243 [182-384] Hgmm) esetében.

#### *A kórházi felvételnél mért ACE2 szérumaktivitás és a COVID-19 betegség súlyossága közötti kapcsolat*

A kórházi felvételnél meghatározott ACE2 szérumaktivitás szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a kritikus állapotú COVID-19 betegek alkotta csoportban (54,4 [36,7-90,8] mU/l), mint a súlyos tünetekkel rendelkező betegek körében (34,5 [25,2-48,7] mU/l,  $p < 0,0001$ ), valamint a nem COVID-19 etiológiával bíró súlyos szeptikus betegek esetén (40,9 [21,4-65,7] mU/l;  $p = 0,0260$ ) az alapbetegségekre való tekintet nélkül. A koronavírus fertőzött egyének körében megvizsgáltuk, hogy az életkor és a nem közvetlen hatással rendelkeznek-e a szérum ACE2 szintre. Megfigyeléseink során azt találtuk, hogy az ACE2 szignifikánsan magasabb szérumszintet mutatott a férfiak esetében a kritikus állapotú betegek körében ( $p = 0,0436$ ), noha hasonló különbséget a súlyos klinikai tünetekkel rendelkező COVID-19 betegek csoportjában nem tudtunk kimutatni ( $p = 0,2870$ ). Az életkor előrehaladtával a teljes betegpopuláció vizsgálata során emelkedő tendenciát detektáltunk az ACE2 aktivitás tekintetében ( $p = 0,0134$ ) a tünetek súlyosságától függetlenül, míg a klinikai tünetek szerint differenciált csoportokat egyenként analizálva a fenti összefüggést egyik esetben sem tudtuk kimutatni ( $p = 0,6841$ , illetve  $p = 0,4344$  külön a kritikus és a súlyos állapotú betegek csoportjaiban). A fenti megfigyelés alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az ACE2 szérumszintet inkább a tünetek súlyossága, mintsem az életkor befolyásolja. Mindemellett Spearman-analízis során sem mutatkozott összefüggés a kórházi felvételnél mért ACE2 aktivitás és a betegek életkora között ( $r = 0,074$ ,  $p = 0,3279$ ). Végül górcső alá vettük a kiindulási szolubilis ACE2-t és a klinikai rutinban vizsgált laboratóriumi paraméterek szintje közötti kapcsolatot, relációt keresve a koronavírus fertőzés okozta szív- és érrendszeri, máj- és vesekárosodáshoz vezető generalizált gyulladással és az ACE2 felszabadulása között. A vizsgálati eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az általunk mért kiindulási szolubilis ACE2 aktivitás erős korrelációt mutatott a COVID-19 betegség klinikai súlyosságával, mindamellett, hogy az aktivitásfokozódás nem tekinthető specifikusnak a SARS-CoV-2 infekcióra.

*Az ACE2 szint változása a kórházi kezelés alatt a kritikus állapotú és a súlyos COVID-19 betegségben szenvedők körében*

A vizsgálatunkba beválogatott betegek egy részénél módunkban állt nem csupán a kórházi felvételt megelőzően, hanem a kezelés során is úgynevezett utánkövetéses ACE2 vizsgálatot végezni. Eredményeink szerint a kritikus állapotú COVID-19 betegeket magába foglaló csoportban további szignifikáns szérumszint emelkedés ( $p < 0,0001$ ) volt detektálható a kiindulási értékekhez képest az adekvát kórházi kezelés ellenére, míg a súlyos klinikai manifesztációval rendelkező betegek csoportjában a hospitalizáció alatt statisztikailag szignifikáns szérumszint emelkedést nem tudtunk kimutatni ( $p = 0,0579$ ). Mindemellett hasonló ACE2 szérumszint értékeket mértünk a kórházi kezelést megelőzően, mint a terápia első, második vagy harmadik hetében levett mintákban ( $p = 0,4165$ ). Összességében elmondhatjuk, hogy vizsgálati csoportunkban jelentős és egyben tartósan magas szolubilis ACE2 szérumszint emelkedés észlelhető a kritikus állapotú COVID-19 betegek esetében.

*Az összefüggés keresése a szolubilis ACE2 és a COVID-19 betegség kimenetele között*

A továbbiakban a szolubilis ACE2 SARS-CoV-2 fertőzés esetén játszott potenciális prognosztikai szerepét helyeztük az érdeklődésünk középpontjába. A kórházi kezelés kimenetelének ismeretében megállapítottuk, hogy a betegség miatt elhunyt vizsgálati egyének esetében szignifikánsan magasabb kiindulási ACE2 szérumaktivitás volt kimutatható (54,6 [37,3-94,7] mU/l), mint a kedvező kimenetellel rendelkező páciensek esetén (35,6 [25,3-58,5] mU/l,  $p < 0,0001$ ). Ezt követően összevetettük az utánkövetés során mért szérumszinteket ugyanazon betegek kiindulási értékeivel annak érdekében, hogy lássuk a szolubilis ACE2 kinetikájának változását a kórkép előrehaladtával. Ebben a megközelítésben láthatóvá vált, hogy a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező betegek – függetlenül a SARS-CoV-2 fertőzés klinikai súlyosságától – szignifikáns további ACE2 szérumszint emelkedést produkáltak a kórházi kezelés ellenére gyakorlatilag az elhalálozás előtt ( $p < 0,0001$ ), míg a COVID-19 betegségből felépülő egyéneknél nem láttunk szignifikáns változást a hazabocsátást megelőző ACE2 szérumszintekben a kezdeti értékekhez képest ( $p = 0,0623$ ). A fenti eredményeket áttekintve megállapítható, hogy szoros reláció áll fenn a szolubilis ACE2 szérumaktivitás és a COVID-19 várható kimenetele között.

### *A kiindulási szolubilis ACE2 aktivitás elemzése a COVID-19 betegség klinikai manifesztáció súlyosságának és a betegség kimenetelének előrejelzésére*

A kórházi kezelést megelőzően mért szolubilis ACE2 szérumszint prognosztikai szerepének további vizsgálatára ROC-görbe elemzést végeztünk. A Youden-index alapján a betegség súlyosságának előrejelzésében a kiindulási ACE2 szérumszint legjobb küszöbértékének 45,4 mU/l bizonyult 60%-os szenzitivitás és 71,2%-os specificitás, valamint 0,701 AUC érték (95% CI [0,621-0,781],  $p < 0,0001$ ) mellett. Megegyező “cut-off” értéket alkalmazva a kiindulási szolubilis ACE2 szérumszint 61,8% szenzitivitás és 65,5% specificitás és az előzőekhez hasonlóan magas AUC érték mellett [0,679 (95% CI [0,600-0,759],  $p < 0,0001$ )] prediktálta a várható mortalitást. Külön logisztikus regressziós analízist is végeztünk annak tisztázására, hogy vajon a kiindulási ACE2 aktivitás független prediktív faktornak tekinthető-e a klinikai manifesztáció súlyosságának tekintetében. A magasabb kiindulási ACE2 szérum aktivitás szignifikánsan magasabb “odds ratio”-val rendelkezett a súlyosabb kimenetelre vonatkozóan (OD: 1,032, 95% CI [1,005-1,061],  $p = 0,019$ ). Továbbá a ferritin, a kreatinin, az össz fehérvérsejtszám és lymphocytaszám, a hemoglobin, illetve az MPV értéke mutatott statisztikailag szignifikáns valószínűségi rátát (OR) a COVID-19 fertőzés súlyosságának előrejelzésében. Összegzésképpen a fenti adatok alátámasztják az ACE2 szérumaktivitás prediktív szerepét a SARS-CoV-2 infekció által okozott, kórházi kezelést igénylő tünetegyüttes kedvezőtlen kimenetele tekintetében.

### *A kóros Horowitz-index és szérum ACE2 szint relációja súlyos COVID-19 betegségben*

Ahogy korábban már említettük, az úgynevezett Pa/Fi arány vagy Horowitz-index szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az általunk vizsgált kritikus állapotú COVID-19 betegségben szenvedő betegekben ( $p = 0,0306$ ) a súlyos állapotú csoport értékeivel összevetésben. Ezt a klinikai állapot jellemzésére is jól használható attribútumot a betegség kimenetelének függvényében megvizsgálva azt láthattuk, hogy a kezelés során elhunyt betegek esetén szignifikánsan alacsonyabb értékeket detektáltunk, mint a kedvező kimenetellel rendelkező paciensek esetén (100,5 [66,3-160] Hgmm vs. 142 [90,7-200,3] Hgmm,  $p = 0,0180$ ). A továbbiakban a Pa/Fi arányszám ROC-görbe elemzését végeztük, mely során a betegség súlyosságának előrejelzése szempontjából a legjobb küszöbértéknek 129 Hgmm bizonyult 66,7% szenzitivitás, valamint 64,8% specificitás, továbbá 0,662-es AUC érték mellett (95% CI [0,522-0,802],  $p = 0,0312$ ). Azonos “cut-off” értéket használva, a Horowitz-index a kedvezőtlen kimenetelt 65,8% szenzitivitás és 61,5% specificitás, valamint 0,653-es AUC érték (95% CI

[0,539-0,767],  $p = 0,0196$ ) mellett volt képes előrejelezni. Meglepő módon, az ACE2 szérumszint és a Horowitz-index közötti kapcsolat vizsgálata során nem tudtunk szoros relációt kimutatni a két paraméter között: a teljes vizsgálati csoportban:  $r = 0,045$ ,  $p = 0,6417$ ; a kritikus állapotú COVID-19 alcsoportban:  $r = 0,0342$ ,  $p = 0,7517$ . Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy bár a Pa/Fi arányszám hasznos klinikai paraméter COVID-19 betegségben is a tüdő funkcionális állapotváltozásának nyomon követésére, mégis a COVID-19 betegségben tapasztalt megnövekedett ACE2 expresszióval közvetlen kapcsolata nem állapítható meg.

#### *A 30 napos mortalitás előrejelzése a kórházi kezelést igénylő COVID-19 betegekben a kiindulási ACE2 szérumaktivitása alapján*

A vizsgálatunkba beválogatott 176 SARS-CoV-2 pozitív beteg közül a 30 napos utánkövetés időszak során 89 (50,6%) fő elhunyt. A korábban részletezett eredmények alapján szignifikáns különbség volt tapasztalható a kedvező és a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező egyének kiindulási ACE2 szérumaktivitás értékei között, továbbá a biomarker kimenetelt előrejelző képességét ROC analízis igazolta. A korábban meghatározott küszöbértékkel elvégzett Kaplan-Meier elemzés szignifikánsan magasabb mortalitási valószínűséget mutatott az emelkedett kiindulási ACE2 szérumszinttel ( $\geq 45,4$  mU/l) rendelkező COVID-19 betegek esetében azon páciensekhez képest, akiknek a kórházi felvételkor mért szérumaktivitása nem érte el ezt a cut-off értéket (37,2%, illetve 64,7%, Log-Rank  $p < 0,0001$ ). Összességében elmondható, hogy a kórházi kezelést megelőzően mért szolubilis szérum ACE2 aktivitás hasznos biomarker lehet a COVID-19 betegség klinikai manifesztáció súlyosságának és a várható kimenetel előrejelzésében.

## **2) A HE4 megemelkedett szérumszintje képes előrejelezni a COVID-19 tünetek súlyosságát és a betegség mortalitását**

Munkacsoportunk korábbi, a cisztás fibrózis progressziójában és a CFTR-specifikus terápia hatékonyságának megítélésében a HE4 szint mérésével végzett ígéretes eredményeinek birtokában vizsgáltuk az ugyancsak progresszív tüdőkárosodást okozó, kórházi kezelést igénylő COVID-19 betegség esetében a szérumban detektálható HE4 fehérje mennyiségét. Retrospektív analízisünk során az alábbi kérdéseinkre kerestük a választ: i) vajon a kórházba került betegek terápia előtt mért HE4 szérumszintje összefüggést mutat-e a klinikai állapotuk súlyosságával; ii) látható-e tendenciózus változás a fehérje szérumszintjében a betegség

progressziójával párhuzamosan; iii) kimutatható-e a HE4 relációja a klasszikus gyulladáshoz biomarkerek szintjével, illetve a tüdőirritáció mértékével; és iv) megjósolható-e a kiindulási HE4 szérumszint segítségével az intenzív terápiát igénylő, kritikus állapotú betegek várható kimenetele.

#### *A klinikai vizsgálatba bevont betegcsoportok legfontosabb demográfiai jellemzői*

Ezen vizsgálatunk során összesen 99 tartós vagy átmeneti kórházi kezelést igénylő, RT-PCR vizsgálattal igazolt SARS-CoV-2 pozitív egyén vérmintája állt rendelkezésünkre. Ebből 40 kritikus állapotú, további 40 súlyos klinikai manifesztációval rendelkező, illetve 19 enyhe tüneteket mutató beteg kórházi felvételkor és a betegek egy részénél a kezelés során nyert szérummintáját is vizsgálhattuk. Kor és nemi eloszlás tekintetében nem mutatkozott különbség az alcsoportok között, továbbá a kórházban töltött napok számában sem találtunk eltérést a kritikus állapotú és a súlyos COVID-19 kohorsz között (medián [IQR], 9,5 [6-18] nap vs. 10 [6-13] nap). A gépi lélegeztetési igény nem meglepő módon a kritikus állapotú betegcsoportban szignifikánsan magasabbnak bizonyult (37, illetve 2 beteg,  $p < 0,0001$ ). Emellett a kedvezőtlen kimenetelek aránya is jelentős eltérést mutatott (90% vs. 7,5%,  $p < 0,0001$ ). Az általános gyulladáshoz szérummarkerek tekintetében a CRP, a PCT, az IL-6, a ferritin és a fehérvérsejtszám volt szignifikánsan magasabb ( $p < 0,001$ , illetve  $p < 0,0001$ ) a kritikus állapotú COVID-19 csoportban a súlyos állapotú betegek értékeihez képest, míg a vérlemezkeszámban nem tudtunk markáns különbséget kimutatni a két kohorsz között. A gépi lélegeztetési igénnyel összhangban a Horowitz-index is jelentősen kisebbnek bizonyult a kritikus állapotú betegek csoportjában szemben a súlyos COVID-19 manifesztációval rendelkező kohorsszal szemben (95 [65-139] vs. 154 [100-277],  $P < 0,001$ ). Mindemellett jelentős differencia volt látható a CRP, ferritin és össz-LDH aktivitás vonatkozásában a súlyos és az enyhe tüneteket mutató COVID-19 alcsoportok között.

A gépi lélegeztetési igénnyel összhangban a Horowitz-index is jelentősen alacsonyabbnak bizonyult a kritikus állapotú betegek csoportjában a súlyos COVID-19 manifesztációval rendelkező betegek csoportjával szemben (95 [65-139] vs. 154 [100-277],  $p < 0,001$ ). Mindemellett jelentős differencia volt látható a CRP, a ferritin és az össz LDH aktivitás vonatkozásában a súlyos és az enyhe tüneteket mutató COVID-19 alcsoportok között.

A Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet Intenzív Osztályának jóvoltából a SARS-CoV-2-pozitív egyének mellé kontrollcsoportként egy korban és nemi eloszlásban a kritikus állapotú COVID-19 kohorshoz illesztett, 25 főből álló, bakteriális szepszisben szenvedő

betegcsoport mintái álltak rendelkezésünkre. A szeptikus betegek kétharmada pozitív haemokultúrával (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* stb.) bírt. A kritikus állapotú COVID-19 betegcsoporttal összevetve a SOFA-pontérték esetükben alacsonyabbnak bizonyult (12 [10-14] vs. 9 [5-10],  $p < 0,0001$ ), viszont jelentősen magasabb PCT, fehérvérsejtszám és MPV, valamint alacsonyabb vérlemezkeszám és szignifikánsan rosszabb vesefunkciós értékek voltak detektálhatók a bakteriális szepszissel bíró kontrollok körében. Ellenben, a kedvezőtlen kimenetel aránya alacsonyabbnak adódott a körükben a kritikus állapotú COVID-19 betegcsoport adataihoz képest.

*A magas kiindulási szérum HE4 szint erős korrelációt mutat a COVID-19 súlyos klinikai manifesztációival*

A vizsgálatba bevolt összes COVID-19 és szeptikus beteg esetében elvégeztük a kezelés megkezdése előtt levett szérumminták HE4 szintjének meghatározását. Méréseink szerint a kritikus állapotú COVID-19 betegek HE4 szérumszintje szignifikánsan magasabbnak adódott, mint a súlyos vagy enyhe tünetekkel bíró egyéneknél ( $p < 0,0001$ ). Fontos megjegyezni, hogy a kritikus állapotú betegek mintáiban kivétel nélkül a tesztleírás alapján megállapított normálértéket jócskán meghaladó mértékben tudunk HE4 szintet detektálni, míg a súlyos állapotú betegek mintáinak 45%-a esetében a kimutatott fehérje mennyiség megfelelt a posztmenopauza időszakában elfogadott refenciatartománynak, mindösszesen két beteg mutatott 140 pmol/l feletti értékeket. A kritikus állapotú COVID-19 pozitív betegek és a súlyos szeptikus betegek eredményeit összehasonlítva hasonlóan magas szérumszinteket detektáltunk statisztikailag szignifikáns különbség nélkül ( $p = 0,056$ ).

A következőkben az életkor és a nem HE4 szérumszintjére gyakorolt befolyásoló szerepét vizsgáltuk mintáinkban. Egyik COVID-19 kohorszban sem tudunk differenciát kimutatni a férfi és női betegek értékei között. Az életkor befolyásoló szerepének tisztázására Spearman analízist végeztünk, amely szignifikáns korrelációt mutatott a változók között ( $r = 0,349$ ,  $p = 0,0015$ ). Amikor a klinikai súlyosság alapján elkülönített COVID-19 pozitív alcsoportokat egyenként vizsgáltuk, sem a kritikus ( $p = 0,8283$ ), sem pedig a súlyos állapotú betegek ( $p = 0,8015$ ) kohorszában nem sikerült életkorral összefüggő varianciát kimutatni, habár utóbbi csoport esetében az életkorral összefüggő emelkedő tendencia kimutatható volt ( $p = 0,0285$ ). A rutin laboratóriumi paraméterek tekintetében is megvizsgáltuk külön a kiindulási HE4 szérumszintet, mely során kis mértékű, de statisztikailag mégis szignifikáns korrelációt

találtunk a CRP, az IL-6 és a fehérvérsejtszám esetében, valamint COVID-19 betegségben igazolt prognosztikai szereppel is bíró össz LDH, ferritin és szolubilis ACE2 aktivitás tekintetében is. Továbbá hasonló összefüggés mutatkozott a kiindulási HE4, illetve néhány fontos klinikai paraméter vonatkozásában úgy, mint a SOFA-pontérték és a mellkas CT-n látható tüdőérintettség mértéke.

A kórházi tartózkodás hossza és a kórházi felvételkor meghatározott HE4 szérumszint között eltérő tendenciát detektáltunk a kritikus és a súlyos állapotú betegek körében: előbbiek esetében a 10 napnál rövidebb kórházi kezelés és ezzel együtt korai(bb) elhalálozás mellett jóval magasabb kiindulási HE4 értékeket mértünk ( $p < 0,0001$ ), mint a súlyos COVID-19 betegek körében, míg a súlyos betegek csoportjában a 10 napnál hosszabb kórházi benttartózkodást már előre jelezte a magasabb HE4 koncentráció, mint akiknek ennél kevesebb időt kellett benttölteni a kedvező állapotjavulás végett ( $p = 0,0007$ ). A fenti eredmények azt sugallják, hogy a kiindulási HE4 koncentráció alakulása leginkább a COVID-19 betegség klinikai manifesztációk súlyosságával állhat összefüggésben párhuzamosan a szisztémás gyulladás mértékével és a pulmonális diszfunkció kiterjedésével.

#### *A HE4 szérumszint változása kedvező és kedvezőtlen kimenetelt mutató COVID-19 betegek esetében*

A következőkben a betegeket retrospektív módon újabb csoportbontásban vizsgáltuk az ismert kimenetel függvényében a kiindulási HE4 szérumszintek és a mortalitás függvényében. Eredményeink alapján az elhunytak körében szignifikánsan magasabb HE4 szérumszintek voltak detektálhatók a kórházi kezelést megelőzően a betegséget túlélők értékeihez képest ( $p < 0,0001$ ). Nyolc kedvező és 22 kedvezőtlen kimenetellel rendelkező COVID-19 beteg esetén lehetőségünk volt a kórházi kezelés folyamán utánkövetéses minták vizsgálatára is. Az intenzív osztályos terápia alkalmazása során a HE4 szérumszint sok esetben csökkenő tendenciát mutatott, viszont az elhunyt betegek mintáiban szignifikáns különbség nem volt kimutatható ( $p = 0,8486$ ). Ezzel szemben jelentős HE4 koncentráció csökkenést tudtunk detektálni a kiindulási és az elbocsátást megelőző minták között azon betegek esetében, akik gyógyultan távozhattak a kórházból ( $p = 0,0039$ ). A fenti eredményeink rávilágítanak arra, hogy a kiindulási HE4 szérumszint előrevetíti a kórkép várható kimenetelét, továbbá a kórházi kezelés folyamán mutatott kinetikája párhuzamot mutat a COVID-19 progressziójával.

*A kiindulási HE4 szint hatékonyan prediktálja a kimenetelt és a klinikai tünetek várható súlyosságát COVID-19 betegségben*

A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a fent részletezett eredményeink alapján vajon alkalmazható-e a kórházi kezelést megelőzően meghatározott HE4 szérumszint a COVID-19 betegségben prognosztikai faktorként. Ennek érdekében részletes statisztikai elemzést végeztünk a klinikai tünetek súlyossága és a várható kimenetel előrejelzése tekintetében. Első lépésben ROC-AUC görbe analízis során Youden-index segítségével meghatároztuk a kiindulási HE4 szérumszint legjobb diszkriminatív küszöbértékét, amely 286,3 pmol/l-nek adódott, és 80%-os szenzitivitás és 70%-os specificitás mellett 0,816 (95% CI [0,723-0,908],  $p < 0,0001$ ) AUC értéken előrejelezte a súlyos klinikai manifesztációt. Továbbá a mortalitás tekintetében a hasonló metodikával nyert 331,7 pmol/l kiindulási HE4 érték 80%-os szenzitivitás és 83%-os specificitás mellett 0,874 (95% CI [0,797-0,951],  $p < 0,0001$ ) AUC érték mellett előrejelezte a kedvezőtlen kimenetelt COVID-19 betegségben. Statisztikai számításaink alapján a kiindulási HE4 szérumszint hatékonyan képes előrejelezni a COVID-19 kórkép várhatóan életet veszélyeztető klinikai manifesztációját. Annak igazolására, miszerint a kiindulási szérum HE4 szint más laboratóriumi paraméterektől függetlenül képes prediktálni a várható klinikai súlyosságot és a kimenetelt COVID-19 betegségben, logisztikus regressziós analízist végeztünk. A HE4 szérumszint szignifikánsan magas korrigált esélyhányadost mutatott (OR: 10,618 [2,331-48,354];  $p = 0,002$ ) a kedvezőtlen kimenetel tekintetében. Emellett megjegyzendő, hogy vizsgálatunkban a csökkent abszolút lymphocytaszám (OR: 0,175, 95% CI [0,033-0,925],  $p = 0,040$ ), a magasabb IL-6 (OR: 5,605 [1,516-20,724];  $p = 0,010$ ) és ferritin koncentráció (OR: 5,911 [1,194-29,259];  $p = 0,029$ ), valamint az emelkedett fehérvérsejtszám (OR: 5,435 [1,152-25,626];  $p = 0,032$ ) egyaránt szignifikáns esélyhányadosnak tekinthető a kimenetel előrejelzésében. A COVID-19 kórkép klinikai súlyosságának előrejelzésében a kiindulási HE4 “borderline” szignifikanciát mutatott (OR: 3,642, 95% CI [0,985-13,457];  $p = 0,053$ ), míg a ferritin (OR: 4,813 [1,237-18,723];  $p = 0,023$ ) és az abszolút lymphocytaszám (OR: 0,224 [0,055-0,909];  $p = 0,036$ ) statisztikailag szignifikáns esélyhányadosként viselkedett. Össességében a HE4 kiindulási szérumszint potenciális prognosztikai biomarkernek tekinthető kórházi kezelést igénylő COVID-19 betegségben.

### *A magas kiindulási HE4 szérumszint alkalmazása COVID-19 kórképben szenvedő betegek 30 napon belüli mortalitás valószínűségének meghatározásában*

Az általunk vizsgált összesen 80 intenzív osztályos ellátást igénylő súlyos és kritikus állapotú COVID-19 beteg közül 35 életét vesztette a fertőzésből kifolyólag a 30 napos utánkövetéses időszak során. A fenti megállapításunk szerint a kiindulási HE4 szérumszintben jelentős különbség volt észlelhető a kedvező és kedvezőtlen kimenetellel rendelkező COVID-19 betegek között, továbbá a ROC-AUC görbeelemzés alapján megállapítottunk egy küszöbértéket (331,7 pmol/l), ami felett hatékonyan előrejelzi a kórkép várható kimenetelét. Ezen küszöbértéket használva elvégeztük a Kaplan-Meier görbe analízist is, mely eredménye szerint a jelentősen emelkedett HE4 szérumszinttel rendelkező COVID-19 betegek esetén szignifikánsan magasabb a mortalitás valószínűsége a következő 30 napban, mint a küszöbérték alatti szérumszinttel rendelkező betegtársaik körében (71% vs. 19%, Log rank  $p < 0,0001$ ). A klinikai követéses időszakot 40 napra kiterjesztve a kritikus állapotú COVID-19 csoport tagjai közül további 4 beteg elhunyt, míg a 331,7 pmol/l HE4 kiindulási szérumszint alatti értékkel rendelkező betegek közül egyet sem veszítettünk el. A fenti állításokat összegezve a szérumszint HE4 kiindulási koncentrációja az intenzív osztályos ellátást igénylő COVID-19 betegek körében alkalmas lehet a betegség kimenetelének előrejelzésére.

### **3) Az endothelsejt diszfunkció és thrombocyta aktiváció jellemzésére alkalmas biomarkerek szérumszint vizsgálata súlyos COVID-19 betegekben**

A SARS-CoV-2 fertőzés és a következményes szisztémás gyulladáshoz vezető reakció patomechanizmusának mélyebb megismerése a generalizált, kaszkádszerű endothelsejt károsodás, a következményes kóros regeneratív folyamatok és az ezekben résztvevő mediátorok vizsgálata felé irányította a figyelmet. A gyulladt endothélium és az aktivált vérlemezkék által a keringésbe került különböző citokinek és kemoadhezív faktorok szérumszint emelkedése információval szolgálhat a kórkép pillanatnyi stádiumáról, vagy előrevetítheti a további állapotromlást is. Vizsgálataink során olyan más etiológiájú endothelsejt diszfunkcióban, illetve thrombocytaaktivációban jelentős szerepet játszó molekulákat vettünk górcső alá COVID-19-ben, amelyeknek az eddig rendelkezésünkre álló irodalmi adatok szerint lényeges szerepük lehet a súlyos klinikai tünetekkel járó betegség kialakulásában. Célul tűztük ki a VCAM-1, az ACE2, az E-selectin és az Lp-PLA2 mint endothelsejt aktivációhoz kötődő biomarkerek, illetve a P-selectin és a CD40L mint a thrombocyta aktivációt jellemző paraméterek szérumszint- illetve plazmaszintjének meghatározását súlyos COVID-19 betegek

körében. Az említett biomarkerek értékeit egymással, majd a rutin laboratóriumi és a klinikai paraméterekkel korreláltattuk, végül a mortalitás tekintetében igyekeztünk prediktív szerepüket meghatározni. Noha a szolubilis ACE2 szérumaktivitásával egy korábbi vizsgálatunk során célzottan és részletesen már foglalkoztunk (lásd előbb), a most bemutatásra kerülő vizsgálatunkban elsősorban a többi lemért endothelsejt specifikus paraméterhez való-fűződő kapcsolatára igyekeztünk rávilágítani súlyos SARS-CoV-2 fertőzésben.

*Az endothelsejt biomarker-vizsgálatban résztvevő COVID-19 betegek demográfiai és klinikai jellemzése*

Összesen 70 súlyos állapotú COVID-19 betegség miatt kórházi körülmények között kezelt beteget vontunk be, majd a későbbi kimenetel alapján két alcsoportot képeztünk. Az életkor, a nem és a társbetegségek függvényében szignifikáns különbség nem volt kimutatható, valamint a kórházi kezelés időtartama is hasonlóan mutatkozott a kedvező és kedvezőtlen kimenetellel jellemezhető alcsoportok között (medián (IQR) 9,0 [5,5–16] nap vs. 10 [6,5–13] nap). A gépi lélegeztetésre szoruló betegek aránya magasabb volt az ARDS-ben szenvedő, később elhunyt betegeket tömörítő csoportban a gyógyult egyénekhez képest (30/33 vs. 2/37 beteg,  $p < 0,0001$ ). Kontrollként egy 16 fős, életkor és nem szerint a vizsgálati populációnkhoz illesztett, egyéb okból klinikai kezelés alatt álló betegcsoportot szolgált. A rutin laboratóriumi paraméterek szintje a kontrollcsoport esetén mind a kedvezőtlen, mind a kedvező kimenetellel rendelkező COVID-19 betegeknél alacsonyabbnak bizonyult. A gyulladási paraméterek, mint a CRP, PCT, IL-6, ferritin és a fehérvérsejtszám szignifikánsan magasabb volt az elhunyt betegek mintáiban a túlélők értékeihez képest ( $p < 0,001$ , illetve  $p < 0,0001$ ), míg a vérlemezkeszám és az MPV tekintetében jelentős differenciát nem sikerült kimutatni. A kórházi felvételnél kalkulált Horowitz-index jelentősen alacsonyabbnak adódott a kedvezőtlen kimenetelű páciensek körében (95 [65–157] vs. 196 [138–381],  $p < 0,001$ ), emellett a tüdő strukturális állapotáról adekvát információt adó mellkas CT-n is jóval kiterjedtebb tüdőérintettség látszott a később elhunyt betegek, mint a gyógyhajlamot mutatók esetében (73 [60–80]%, illetve 50 [30–70]%,  $p < 0,05$ ).

### *A magas kiindulási VCAM-1, ACE2 és az endothelsejt diszfunkció mértékének kapcsolata súlyos COVID-19 betegségben*

Első lépésben a kiindulási szérum VCAM-1, E-selectin, ACE2 és Lp-PLA2 retrospektív méréseit végeztük a vaszkuláris károsodás mértékének és az endothelsejtek aktivációjának megítélése céljából, majd a kapott adatokat összevetettük az ismert klinikai kimenetellel. Szignifikáns különbséget detektáltunk az elhunyt és a túlélő betegek kiindulási szolubilis VCAM-1 és ACE2 értékei között ( $p = 0,0001$  és  $p = 0,0038$ ), továbbá jelentős változás volt megfigyelhető a túlélők esetében. Ezzel ellentétben az E-selectin szintek esetén csupán határértéken lévő szignifikancia mutatkozott ( $p = 0,0656$ ) a két csoport között, míg az Lp-PLA2 szintek nem különböztek jelentősen a koronavírus fertőzésben szenvedő egyéneknél. Ezzel párhuzamosan a vérlemezke aktivációt jellemző faktorok is meghatározásra kerültek, mely során a szolubilis P-selectin szignifikánsan magasabbnak adódott az elhunyt betegek körében ( $p = 0,0072$ ), míg a plazma CD40L kiindulási értéke mindkét COVID-19 csoport tagjai esetében szignifikánsan megemelkedett ( $p = 0,0012$ , valamint  $p = 0,0022$ ), de a túlélők és elhunytak eredményei között jelentős különbség nem volt. Az adataink alapján az intenzív osztályos felvételkor meghatározott szolubilis VCAM-1 és ACE2 emelkedett értéke egyértelműen jelezte a háttérben zajló endothélium károsodás jelenlétét és annak köszönhetően bekövetkező eltérő betegségkimenetelt. A következőkben a kapott adatok statisztikai elemzését végeztük el kapcsolatot keresve az életkor, a kórházi felvételkor számított Horowitz-index, a rutin laboratóriumi paraméterek és a vizsgált vaszkuláris biomarkerek szérumszintje között. Spearman analízis segítségével megállapítást nyert, hogy az életkor nem befolyásolja a vizsgált paraméterek változását, habár ennek befolyásoló szerepét a vizsgálati csoportjaink életkor alapján történő illesztése miatt korábban kizártuk.

Jelentős korrelációt találtunk a VCAM-1, az ACE2, valamint a Horowitz-index ( $r = 0,3115$ ), a PCT ( $r = 0,3664$ ), az IL-6 ( $r = 0,4599$ ) és az E-selectin ( $r = 0,3643$ ) vonatkozásában, míg a vesefunkció érintettségéről árulkodó GFR értékkel fordított kapcsolat igazolódott ( $r = -0,5076$ ). Az endothelsejt károsodást jelző E-selectin, ACE2 és a rutin laboratóriumi paraméterek összevetése során szignifikáns korreláció mutatkozott a CRP, a PCT, az IL-6, az LDH és a ferritin esetében. Meglepő módon a szérum Lp-PLA2 és az általános inflammatórikus paraméterek összevetése során semmilyen kapcsolatot nem tudtunk kimutatni. A thrombocytá aktivációt jellemző biomarkerek és az előzőekben említett endothelsejt diszfunkcióhoz társuló molekulák egymáshoz viszonyított kinetikáját tekintve mérsékelt, de szignifikáns korreláció mutatkozott az ACE2 és CD40L között ( $r = 0,2948$ ). Ezen eredmények azt sugallják, hogy a

szolubilis VCAM-1 és ACE2 kinetikáját jelentősen befolyásolja a SARS-CoV-2 fertőzés következtében fellépő endotheliitis, míg a jelenleg vizsgált betegeink esetében sem a thrombocytá aktivációnak, sem a lipid peroxidációnak egyértelmű molekuláris lenyomatát nem sikerült kimutatnunk.

*Alkalmos lehet-e a kórházi kezelést megelőzően mért szolubilis VCAM-1, E-selectin és ACE2 szérumszint a kedvezőtlen kimenetellel fenyegető COVID-19 betegség korai felismerésére?*

Kutatásunk következő szakaszában az általunk vizsgált laboratóriumi markerek klinikai használhatóságát, prognosztikai faktorként történő alkalmazását vizsgáltuk meg. Statisztikai analízisünk során ROC-AUC görbe elemzéssel előbb az egyes faktorok diagnosztikus karakterisztikáját helyeztük a középpontba. A kiindulási VCAM-1 szérumszint esetén a Youden-index alapján a legjobb diszkriminatív küszöbérték 1420 ng/ml volt, 64 %-os szenzitivitás és 73%-os specificitás mellett 0,6855 (95% CI [0,5595–0,8115],  $p = 0,0077$ ) AUC értéken jelezte előre a kórkép kimenetelét. A szérum E-selectin koncentráció és az ACE2 aktivitás esetében nagyon hasonló AUC értékek mutatkoztak a kedvező és a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező betegek elkülönítésére.

Az E-selectin esetében a legjobb küszöbérték 49,3 ng/ml volt 58%-os szenzitivitás és 70,3%-os specificitás és 0,6523 AUC érték mellett (95% CI [0,5215–0,7813],  $p = 0,0286$ ). Végül – az ACE2-vel folytatott korábbi vizsgálataink eredményeihez hasonlóan – a kiindulási ACE2 szérumaktivitás 0,6519 AUC értéken (95% CI [0,5213–0,7826],  $p = 0,0291$ ) 57,6%-os szenzitivitás és 70,4%-os specificitás mellett 45,2  $\mu$ U/ml küszöbértéknél bírt a legjobb megkülönböztető erővel. Az elvégzett ROC-AUC elemzések alapján elmondhatjuk, hogy a kiindulási VCAM-1, E-selectin és ACE2 közel azonos hatékonysággal képes előrejelezni a betegség kimenetelét súlyos állapotú COVID-19 betegekben.

*A 30 napon belüli mortalitás előrejelzése az emelkedett kiindulási VCAM-1 és ACE2 szérumszintek alapján súlyos COVID-19 kórképben szenvedő betegek esetében*

A 70 intenzív osztályos kezelést igénylő, súlyos klinikai állapotú COVID-19 beteg közül 33 elhunyt a 30 napos utánkövetéses időszakban. A megelőző számításaink során meghatározott “cut-off” értékek mellett kíváncsiak voltunk, hogy a kezelés előtti VCAM-1, E-selectin és az ACE2 eredmények vajon alkalmasak lehetnek-e a 30 napos mortalitás valószínűségének predikciójára. A kiszámított küszöbértékeket alapul véve Kaplan-Meier túlélési görbe analízis során megállapítást nyert, hogy az emelkedett kiindulási VCAM-1 szérumszinttel rendelkező

betegek szignifikánsan nagyobb kockázattal bírnak a kedvezőtlen kimenetel tekintetében COVID-19 kórképben (68% vs. 37% mortalitási arány, Log-rank  $p = 0,0031$ ). Továbbá a  $\geq 45,2$   $\mu\text{U/ml}$  kiindulási ACE2 szérumszint szintén magasabb mortalitási rizikót jelent a beteg számára (65,7% szemben 40%, Log-rank  $p = 0,0117$ ). A fentiekkel ellentétben a kórházi kezelés előtt mért emelkedett E-selectin szérumszint ( $\geq 49,3$  ng/ml) prediktív potenciálja még éppen elmarad a szignifikancia határértéktől a 30 napos mortalitás tekintetében ( $p = 0,0707$ ) súlyos COVID-19 betegségben. Vizsgálatunk ezen eredményeit összegezve az intenzív osztályos terápiát igénylő súlyos SARS-CoV-2 fertőzött betegek kiindulási VCAM-1 szérumszintjei és ACE2 aktivitása a vizsgált paraméterek közül a legalkalmasabbak a várható mortalitás előrejelzésére.

#### **4) Az LDH izoenzimek vizsgálata COVID-19 betegségben**

Az össz LDH aktivitás súlyos állapotú koronavírus fertőzöttek esetén független rizikófaktornak tekinthető. Ugyanakkor az egyes LDH izoenzimek kinetikájáról nincsenek irodalmi adatok annak ellenére, hogy az egyes izoenzimek aktivitás változása akár specifikus lehet a súlyos, több szerv elégtelenségét okozó COVID-19 betegségben.

##### *A vizsgálatba beválogatott betegek klinikai jellemzői*

Összesen 22 (13 férfi és 9 nő, életkoruk 29-81 év között változott) egymást követő, kórházi felvételt igénylő súlyos (14 beteg) vagy enyhe/közepesen súlyos tüdőgyulladásban szenvedő (8 beteg) COVID-19 pozitív páciens szérummintáit analizáltuk, akiknek rutinszerűen LDH aktivitás vizsgálat történt. A lefagyasztott mintáikból pedig utólagosan LDH gélelektroforézis vizsgálatot végeztünk tudományos célból. A klinikai manifesztáció súlyossága szerint a páciensek ellátása az intenzív osztályon, illetve az infektológiai osztályon folytatódott. Az adekvát kórházi kezelés ellenére a súlyos pneumoniával diagnosztizált COVID-19 betegek ( $n = 14$ ) életüket veszítették a felvételt követő 28 napos után követés során, míg az enyhébb tüneteket mutató betegek ( $n = 8$ ) gyógyultán távoztak. A klinikai kórlapok alapján a betegek a SARS-CoV-2 fertőzést megelőzően többféle krónikus kórképben szenvedtek, így magasvérnyomás betegségben, (in)stabil anginában, vesekövességben, diabetes mellitusban, különböző vesebetegségekben (glomerulonephritis, gyógyszer-indukálta nephropathia) és krónikus gyulladásos ízületi kórképekben.

*A szérum össz LDH aktivitás és a rutin laboratóriumi markerek szintjének változása súlyos és enyhe/közepesen súlyos COVID-19 betegekben*

A korábbi vizsgálataink eredményeivel összhangban az általunk vizsgált betegek mintáiban a gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek, mint a fehérvérsejtszám, a ferritin és a CRP emelkedett értéket mutattak a szérumban. Mind a súlyos, mind az enyhe/közepesen súlyos állapotú COVID-19 betegek esetében a normál referenciatartománynál magasabb össz LDH aktivitás mutatkozott a kórházi felvétel időpontjában (272-2141 U/l). A súlyos pneumóniában szenvedő betegek csoportjában az átlagos össz LDH értékek szignifikánsan nagyobbak adódtak az enyhébb tünetekkel bíró betegekénél mért szinthez képest (medián [IQR] 947,5 [704,3-1307,0] U/l vs. 391,5 [331,8-895,8] U/l,  $p = 0,016$ ). A továbbiakban a betegektől nyert mintákból gélelektroforézis segítségével igyekeztünk az egyes LDH izoenzim aktivitásához viszonyított aktivitási arányát meghatározni.

Annak ellenére, hogy a rutinszerűen mért össz LDH aktivitás és a gélelektroforézis során számított izoenzim aktivitások között egyértelmű összefüggés nem volt szembetűnő, a statisztikai analízis során szignifikáns kapcsolat igazolódott az LDH-3 ( $r = 0,765$ ,  $p = 0,0001$ ) és az LDH-4 izoenzim ( $r = 0,783$ ,  $p = 0,0001$ ), valamint az össz-LDH aktivitás között. Az LDH-3 és LDH-4, valamint a COVID-19 betegségben jellemzően szérumszint emelkedést mutató rutin laboratóriumi paraméterek közötti közvetlen relációt vizsgálva szerény, de statisztikailag szignifikáns kapcsolatot detektáltunk mindkét izoenzim és a ferritin szérumszintje között ( $r = 0,437$ ,  $p = 0,042$ ; illetve  $r = 0,505$ ,  $p = 0,016$ ). Végül a kimenetel tekintetében vizsgálva az egyes izoenzim aktivitását szignifikánsan magasabb LDH-3 (241,0 [127,7-299,0] U/l, illetve 83,7 [63,0-200,9] U/l,  $p = 0,043$ ) és LDH-4 (106,4 [85,5-182,7] U/l, illetve 33,0 [20,9-69,4] U/l,  $p = 0,034$ ) aktivitás, valamint külön az LDH-4 esetében nagyobb relatív %-os arány ( $p = 0,026$ ) is megfigyelhető volt a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező betegek esetében a túlélőkhöz képest.

*Az egyes LDH izoenzim aktivitás mintázata COVID-19 betegség okozta pneumóniában*

Az elvégzett denzitometriás analízisünk során nyert eredmények alapján COVID-19 betegségre specifikus LDH izoenzim mintázatot nem sikerült azonosítanunk. Az általunk vizsgált 22 minta közül kilenc esetben a gélelektroforézis középső zónájában, tehát leginkább az LDH-3, esetenként az LDH-2 és LDH-4 területén detektáltunk nagyobb arányú aktivitást. Három betegnél izolált LDH-2 aktivitás emelkedést tapasztaltunk. További hat esetben az LDH-5 izoenzim fokozott aktivitását észleltük az LDH-4 szimultán emelkedésével vagy anélkül,

továbbá két betegnél magasabb LDH-1 szint mutatkozott. Két esetben az össz LDH szérumaktivitás emelkedés ellenére egyik izoenzim esetében sem tudtunk relatív aktivitás eltérést kimutatni.

A kórházi felvétel során készített mellkas CT vizsgálatok különböző mértékű tüdőérintettséget igazoltak, amelynek kiterjedtsége a súlyosabb klinikai tüneteket mutató, kedvezőtlen kimenetellel rendelkező egyének esetén szignifikánsan nagyobb volt az enyhébb tünetekkel kórházba kerülő túlélőkéhez képest (70 [50-76] % vs. 15 [50-76] %,  $p = 0,003$ ). A tüdőérintettség mértéke és az egyes LDH izoenzim aktivitások közötti kapcsolat vizsgálata során az 50%-nál nagyobb arányú pulmonális károsodásban szenvedő betegek esetén az agarózgél közepső LDH frakcióinak magasabb arányú aktivitása volt kimutatható. Az izolált LDH-2 izoenzim emelkedéssel párhuzamosan mérsékelt parenchymaérintettség mutatkozott (< 20%). A COVID-19 okozta súlyos májelégtelenség és pneumonia együttesen eredményezhetett emelkedett LDH-5 izoenzim aktivitást (6 beteg esetében), míg két kritikus állapotú páciens esetében kimutatott magas LDH-1 arány háttérében intravasculáris hemolízis valószínűsíthető. Eredményeink alapján szoros kapcsolat mutatkozott a SARS-CoV-2 fertőzés okozta pulmonális manifesztáció és az LDH izoenzimek közepső frakcióinak relatív aktivitás fokozódása között, bár eredményeink értelmezésekor szem előtt kell tartanunk, hogy az LDH izoenzimek arányát számos egyéb klinikai körülmény és társbetegség is befolyásolhatja.

## V. Megbeszélés

A SARS-CoV-2 által okozott COVID-19 betegség az esetek egyötödében súlyos, akár életet veszélyeztető, elsősorban a tüdőt, de sok esetben más szervrendszert párhuzamosan érintő fertőző megbetegedés. A diagnózis felállítása a tünetek által felvetett gyanú alapján a beteg orrtorok váladék mintájából RT-PCR technikával a vírus-RNS kimutatásán alapszik. Bizonyos demográfiai faktorok, mint az előrehaladott életkor, a cukorbetegség, a krónikus tüdő, illetve szív-érrendszeri megbetegedés, az idült veseelégtelenség, a rosszindulatú tumoros betegség fennállása, az immunszuppresszív állapot, az obezitás és a sarlósejtes anaemia független prediktív faktorai a súlyos lefolyású és kedvezőtlen kimenetellel záruló COVID-19 betegségnek. A korai fertőzési stádiumban észlelt klinikai és laboratóriumi paraméterek is szolgálhatnak támpontul a magasabb rizikóval rendelkező betegek felismerésében. A kórházi felvételnél észlelt hypoxia önmagában fontos független rizikófaktora a kedvezőtlen kimenetelnek. Egy korábbi klinikai vizsgálatban 140 COVID-19 pneumóniában szenvedő súlyos beteg adatai alapján a perifériás artériás szaturáció ( $SpO_2$ ) 90%-nál magasabb értéke

84%-os szenzitivitás és 97%-os specificitás mellett képes volt előrejelezni a túlélést. Az ún.  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  arányszám vagy Horowitz-index a klinikai gyakorlatban a hypoxaemia és a tüdőben zajló gázcseré hatékonyságának jellemzésére széles körben elfogadott mérőszám. A súlyos légzési elégtelenséget okozó COVID-19 betegség egyik kritériuma a 300 Hgmm alatti  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  hányados. Retrospektív analízisek alapján a kórlefolyás kezdetén meghatározott arányszám jó prediktív értékkel különítette el az enyhe és a kórházi kezelést igénylő eseteket, továbbá befolyással lehet a kórházi kezelés hosszára, és a 300 Hgmm alatti értékkel rendelkező betegeknek akár háromszor nagyobb esélyük volt a kedvezőtlen kimenetelre.

Általánosan elfogadott gyakorlat, hogy minden kórházi kezelést megelőzően perifériás vénás vér mintavétele történik, melyből a rutin laboratóriumi paraméterek kerülnek meghatározásra. A pandémia kirobbanása óta nagymennyiségű adat gyűlt össze, melyek alapján számos metaanalízis vizsgálta ezen paraméterek kimenetelre gyakorolt hatását. A kezdeti lymphopénia a kórállapot súlyosságával progrediált. A neutrophil/lymphocytá arány (NLR) a betegek állapotromlásával emelkedett és prediktív faktora volt a kedvezőtlen kimenetelnek. Az eosinophilek arányának folyamatos csökkenése szintén negatív prognózisra utalt. A thrombocytaszám változásának tekintetében ellentmondásos eredmények állnak rendelkezésre: a kezdeti vizsgálatok súlyos thrombocytopeniáról számoltak be a kritikus állapotú betegek körében és összefüggést láttak a vérlemezkeszám csökkenésének mértéke és az elhalálozás valószínűsége között. Noha más szerzők nem találtak jelentős eltérést a thrombocytaszámban az ARDS-ben szenvedő COVID-19 betegek körében. A biokémiai faktorok közül az LDH, az AST, az ALT, a kreatinin, az össz kreatinin-kináz (CK), a cTnI és az NT-pro-BNP szignifikánsan magasabb koncentrációban volt kimutatható a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező betegek mintáiban, mint a túlélők esetén. Hasonlóan egyes akut fázis fehérjék (pl. CRP, PCT, ferritin, szérum amyloid-A) szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen a súlyos állapotú COVID-19 betegek populációjában, mint az enyhébb tünetekkel rendelkező társaik esetében és egyben előrejelítették a kedvezőtlen prognózist. A D-dimert 1  $\mu\text{g/ml}$  feletti mennyiségben a kórházban kezelt betegek körében a kedvezőtlen prognózis független prediktív faktorának találták, emellett előrejelezte a thromboembóliás szövődmények, a kritikus klinikai állapot és az elhalálozás nagyobb valószínűségét is. A kedvezőtlen prognózisra hajlamos betegek kiemelése már az első orvosi vizsgálat alkalmával esszenciális lenne annak érdekében, hogy ezen betegek agresszív szupportív terápiában és szorosabb megfigyelésben részesülhessenek.

Vizsgálatsorozatunk célja az volt, hogy a szérumban kimutatható mennyiségben jelenlévő, a SARS-CoV-2 fertőzés progressziójában feltehetően résztvevő molekulák, mediátorok expressziójának fokozódását igazoljuk és kapcsolatot keressünk a klinikai tünetek súlyossága,

valamint a vizsgált biomarkerek szérumszintjei között. Továbbá célunk volt olyan szérummarkerek felkutatása, amelyek már a kórházi kezelés megkezdése előtt nagy valószínűséggel képesek előrevetíteni a kedvezőtlen kimenetelt.

A sejtfelszínen expresszáldó ACE2 glikoprotein a humán gazdasejtek megfertőződési folyamatának egyik legfontosabb szereplője. Az epithelsejtek és endothelsejtek felszínén expresszáldó ACE2 molekulát a vírus S1 és S2 felszíni fehérjéi kvázi receptorként használják, a kialakult kötés pedig a vírus endocytosisát idézi elő. Az internalizációt megelőzendő, egyfajta protektív mechanizmus révén a SARS-CoV-2 bekötődése az ACE2 leválásához, ún. “shedding”-jéhez vezet, ezáltal a keringő ACE2 szintje és aktivitása megnő. COVID-19-ben több kutatócsoport vizsgálta a szolubilis ACE2 mennyiségét eltérő eredményekkel. Munkacsoportunk elsőként egy kritikus állapotú COVID-19 beteg esetében végzett esettanulmány során a szolubilis ACE2 jelentősen emelkedett szérumaktivitását igazolta.

Vizsgálataink során arra a megállapításra jutottunk, hogy a kritikus állapotú COVID-19 betegek szérummintáiban szignifikánsan magasabb ACE2 aktivitás volt kimutatható mind a súlyos állapotú COVID-19, de még a nem COVID-19 etiológiájú súlyos szeptikus kontroll csoport értékeihez viszonyítva egyaránt - a komorbiditásoktól függetlenül. A vizsgált COVID-19 betegek esetében a kritikus állapotú csoportban a férfiak körében még magasabb ACE2 aktivitás értékeket mértünk. Kardiovaszkuláris betegségekben szenvedő betegpopuláción végzett ACE2 szérumszint vizsgálatok során a férfiak esetében szintén magasabb ACE2 eredmények mutatkoztak, mely különbség a hipertenzió fennállása esetén szignifikáns mértéket ért el. Bár a kritikus állapotú COVID-19 betegeink 80,9%-a hipertóniában szenvedett, a betegek kóros ACE2 aktivitás értékei elsősorban a SARS-CoV-2 fertőzés rovására írható. A teljes vizsgált populációra vetítve a tünetek súlyosságától függetlenül a magasabb életkorú betegeknél emelkedettebb ACE2 aktivitás mutatkozott, viszont az egyes vizsgálati alcsoportokban az életkor ACE2 szintre gyakorolt hatását Spearman analízissel nem tudtuk igazolni. Ebből azt a következtetést szűrtük le, hogy az emelkedett ACE2 aktivitás oka legfőképpen az előrehaladott életkorban nagyobb arányban előforduló kardiovaszkuláris kórállapotokban és az idősebbeknél gyakrabban látott súlyosabb lefolyású COVID-19 betegségben keresendő. A kórházi kezelés alatt nyert utánkötéses vizsgálatok alapján a kritikus állapotú COVID-19 betegek körében a kiindulási szolubilis ACE2 szinthez képest további szignifikáns mértékű szérumszint emelkedést detektáltunk szemben a súlyos pneumóniában szenvedő betegek kezelés alatt lényegesen nem változó szérumszintjeivel. Fontos rávilágítanunk arra, hogy az általunk vizsgált, kórházi kezelést igénylő COVID-19 betegek esetében a kezelés előtti szolubilis ACE2 szintek jelentősen és tartósan emelkedettek

maradtak vagy még további növekedést mutattak, és jelentősen csökkenő tendenciát a gyógyuló betegek esetében sem detektáltunk. Az elhalálozott betegek esetében a kezdetben is szignifikánsan magasabb ACE2 aktivitás a kezelés későbbi szakaszában - jellemzően kevéssel az exitus előtt - további jelentős emelkedést produkált. Mivel a legnagyobb klinikai jelentőséget a kezdeti tünetek megjelenésekor mérhető szolubilis ACE2 szérumszint prognózisra gyakorolt hatásától vártuk, így statisztikai analízissel vizsgáltuk a biomarker prognosztikai potenciálját a súlyosság és a kimenetel tekintetében. ROC görbe elemzéssel 45,4 mU/l kiindulási ACE2 szérumszint mellett 60%-os szenzitivitás és 71,2%-os specificitás, de 0,701 AUC értéken a súlyos kórlefolyás, továbbá ugyanolyan "cut-off" értéket alkalmazva 61,8% szenzitivitás és 65,5% specificitás mellett hasonlóan magas AUC értékkel (0,679) a kedvezőtlen kimenetel is előrejelezhető volt. Logisztikus regressziós analízis alapján a ferritin, a kreatinin, a fehérvérsejt- és lymphocytaszám, a hemoglobin, illetve a MPV mellett a kiindulási ACE2 aktivitás független prediktív faktornak mutatkozott a vizsgálati csoportunk esetében (OR: 1,032,  $p = 0,019$ ).

A Horowitz-index esetében várakozásainknak megfelelően a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező egyének körében jelentősen alacsonyabb kiindulási Pa/Fi arányt számítottunk a túlélők értékeihez képest, melynek diszkriminatív értékét Youden indexszel 129 Hgmm-ben határoztuk meg. A kórkép súlyosságának előrejelzésében 66,7% szenzitivitás, valamint 64,8% specificitás és 0,662-es AUC érték mellett, a kimenetel előrejelzésében 65,8% szenzitivitás és 61,5% specificitás, valamint 0,653-as AUC érték mellett a kedvezőtlen kimenetelt is képes volt előrejelezni. Annak ellenére, hogy a rendelkezésre álló irodalmi adatok azt sugallják, hogy a szérumban nagy mennyiségben keringő szolubilis ACE2 jelentős része a megfertőzött tüdő epithelsejtjeinek felszínéről származik, a további statisztikai analízis során a szolubilis ACE2 és a pulmonális funkcionális károsodással következményesen romló Horowitz-index között fennálló statisztikai kapcsolatot nem tudtunk kimutatni. A kórházi felvétel utáni 30 napos követéses periódus során a vizsgálatunkba beválogatott 176 COVID-19 beteg közül 89 elhunyt. A kiindulási 45,4 mU/l ACE2 szérumszint diszkriminatív értékkel elvégzett Kaplan-Meier görbe analízis alapján szignifikánsan magasabb 30 napos mortalitási valószínűség mutatkozott a küszöbérték feletti szérumszinttel rendelkező betegek esetében (37,2% illetve 64,7%, Log-Rank  $p < 0,0001$ ). Az elvégzett vizsgálatok alapján a kezelés előtt mérhető szérumszint ACE2 aktivitás egy új hatékony biomarkernek bizonyult COVID-19 betegek esetében a kórkép lefolyásának és a várható kimenetelének előrejelzésében egyaránt.

A HE4 elsősorban a felső és alsó légúti epithelsejtek felszínén expresszálódik jelentős mennyiségben, egyes mirigyes szerveket érintő onkológiai kórképekben szérumszintje nagymértékben és konzekvensen megemelkedik. Mindemellett a megnövekedett HE4

szérumszint potenciális biomarkernek tekinthető krónikus veseelégtelenségben; és progresszív intersticiális tüdőfibrózisban is. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai jelentősen emelkedett HE4 szérumszintet igazoltak cisztás fibrózisban, melynek változásai szoros korrelációt mutattak a betegség progressziójával, a légzésfunkciós paraméterekkel és a CFTR-specifikus gyógyszeres kezelés hatékonyságával is. A közelmúltban publikált közlemények alapján súlyos bakteriális szepszishez társult ARDS esetén a HE4 szérumszint független prediktív faktora volt a kedvezőtlen kimenetelnek. Annak ellenére, hogy a HE4 proteinek a légutakon keresztül bejutott kórokozók elleni humorális immunitásban játszott szerepét feltételezik, a SARS-CoV-2 fertőzésben bekövetkező HE4 szérumszint változások tekintetében szerény irodalmi adat állt rendelkezésre.

Vizsgálatunk során az enyhe, súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegek szérummintái mellett kontroll csoportként bakteriális szepszisben szenvedők mintáiban elemeztük a kórházi felvételnél mért HE4 szérumszinteket. A komoly tüdőérintettséggel járó COVID-19 és a bakteriális szepszises kontroll betegekben egyaránt a normálisnál jelentősen emelkedettebb HE4 szérumszint volt kimutatható. A teljes vizsgálati populáció esetén a HE4 szint az életkorral némi korrelációt mutatott, ami a korábbi irodalmi adatokkal egybees, habár ezt a tendenciát a súlyosság szerint differenciált alcsoportok esetén már nem tudtuk kimutatni. Számos laboratóriumi paraméter (pl. szolubilis ACE2, IL-6, CRP, ferritin, össz LDH, fehérvérsejtszám stb.) és a klinikai állapotot jellemző paraméterek (SOFA-score, mellkas CT-n látható tüdőérintettség mértéke) tekintetében összefüggés mutatkozott a kezdeti HE4 szérumszintekkel. Ezen túlmenően a HE4 és a kórházi napok számának tekintetében a súlyos állapotú COVID-19 betegek esetében egyenes arányosság, a kritikus állapotú, legtöbbször a felvételt követően rövid időn belül exitálóknál fordított reláció mutatkozott. A fenti eredményeket tekintve a kezdeti HE4 szint nagy valószínűséggel már az első tünetek idején súlyos fokú tüdődestrukcióra és generalizált gyulladás kiterjedésére utalhat. Retrospektív analízis során a később elhunyt betegek esetén szignifikánsan magasabb kiindulási értékeket mérhettünk, amelyek a kezelés során érdemi változást az exitus bekövetkeztéig nem mutattak. Ezzel szemben a kezelést követően gyógyultan távozók esetén az utánkövetéses szérumminták HE4 koncentrációja jelentős csökkenést mutatott a kezelést megelőző értékekhez képest ( $p = 0,0039$ ). ROC-AUC analízissel 286,3 pmol/l szérumszint HE4 "cut-off" érték mellett a betegség súlyos lefolyása 80%-os szenzitivitás és 70%-os specificitás mellett kiemelkedően jó 0,816-os AUC értéken előrejelezhető volt, továbbá 331,7 pmol/l kiindulási HE4 szint 80%-os szenzitivitás és 83%-os specificitás mellett 0,874 AUC értéken szintén előrejelezte a kedvezőtlen kimenetelt. A biomarker független prediktív értékének meghatározására

logisztikus regressziós analízist végeztünk, mely alapján a HE4 szérumszint a kedvezőtlen kimenetel tekintetében magas esélyhányados adódott (OR: 10,618) a korábban már igazolt prognosztikai szereppel bíró laboratóriumi paraméterek (abszolút lymphocytaszám, össz fehérvérsejtszám, IL-6, ferritin) mellett. Mindemellett a várható súlyosság tekintetében már jóval szerényebb, de még szignifikáns összefüggés mutatkozott a HE4 szint kapcsán. A 30 napos utánkövetéses időszakban a mortalitás valószínűsége a fentebb említett 331,7 pmol/l diszkriminatív küszöbérték alatti és feletti szérumszinttel rendelkező betegek esetén szignifikáns különbséget mutatott (71% és 19% mortalitás, Log rank  $p < 0,0001$ ). A követéses időszakot 40 napra kiterjesztve a két csoport statisztikai különbsége még markánsabbnak mutatkozott (81% vs. 19%). A fentieket figyelembevéve a kórházi kezelés kezdetén mért szérumszint HE4 egy fontos prognosztikai faktor lehet a COVID-19 kórkép várható lefolyása és kimenetele prediktálásában és a betegek korai rizikóstratifikációjában egyaránt.

Az érendothél számos lokális és szisztémás élettani folyamatban aktív, autokrin és parakrin szerepet tölt be, hibátlan működése nélkülözhetetlen a szövetek vérellátásának dinamikus optimalizálása, a hemosztázis és a koagulációs folyamatok kiegyensúlyozottsága szempontjából. Számos kutatási adat és klinikai megfigyelés alátámasztja az endothélium sérülés jelentőségét súlyos SARS-CoV-2 infekciót követően. Az egyes szervekre levetítve ez a folyamat vérellátási zavarban, érelzáródásban manifesztálódik, és a COVID-19 kórlefordulásában gyakran előforduló myocardialis infarctus, vasculitis, interstitialis pneumonitis vagy éppen ARDS képében szembesül vele a klinikus. Az endothelsejtek aktivációjával összefüggésbe hozható molekulák szérumszintjét vizsgáltuk súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegek esetében azok kórlefordulással, a betegség súlyosságával, illetve kimenetelével összefüggésben álló kinetikájának feltárása céljából. Retrospektív analízisünket kritikus állapotú betegekre terjesztettük ki, két alcsoportot képeztünk a kedvező és kedvezőtlen kimenetelnek megfelelően.

Az ún. selectinek a fehérvérsejtek toborzásáért felelős glikoproteinek. Az E-selectin az endothelsejtek aktivációjakor a keringésbe jutó adhéziós molekula, az endothelsejtek aktivációjának egyik érzékeny biomarkere. A plazma P-selectin az endothelsejtek Weibel-Palade testecskéiben, illetve a thrombocyták intracelluláris  $\alpha$ -granulumaiban helyezkedik el és a vérlemezkék aktivációját kiváltó noxa hatására az expressziója megnő. Egy 7668 beteg adatait összesítő meta-analízis alapján számos más, az endothelsejt diszfunkcióval kapcsolatba hozható biomarker mellett az E- és P-selectin kiindulási szérumszintje is magasabbnak adódott a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező SARS-CoV-2 fertőzöttek körében. A közelmúltban publikált vizsgálat szerint a kórházi felvételkor szignifikánsan magasabb E-selectin ( $\geq 32,5$

ng/ml) és P-selectin ( $\geq 3,2$  ng/ml) független prediktorai voltak a kórházi kezelés alatt bekövetkező thromboembóliás eseményeknek, mely a súlyos endothélium diszfunkció következtében kialakuló prothrombotikus klinikai állapot fennállását támasztja alá. Intenzív osztályos kezelést igénylő COVID-19 betegek kezelését megelőző E-selectin szintje figyelemreméltó 0,88-as AUC értéken 100%-os szenzitivitás és 75%-os specificitás mellett megbízhatóan előrejelezte a kedvezőtlen kimenetelt. Várakozásainkkal ellentétben, az általunk vizsgált betegpopulációban csupán szerény, de szignifikáns különbséget tudunk kimutatni a túlélő és elhunyt COVID-19 betegek kiindulási E-selectin értékei között. Noha a kimenetelre gyakorolt hatás vizsgálata során a 49,3 ng/ml kiindulási E-selectin szérumszint 0,6523-as AUC értéket mutatott, Kaplan-Meier túlélési görbe analízissel nem sikerült szignifikáns különbséget detektálnunk a diszkriminatív érték alatti és fölötti szintekkel bíró érintettek között.

Az Lp-PLA2 a makrophágok által termelt, a keringésben főként az LDL-hez kapcsoltan keringő molekula. Az Lp-PLA2 az oxidált lipoproteinek hidrolízise révén proinflammatorikus ágensek létrehozásában játszik szerepet, melyek az endothelsejtek aktivációjában, az arteriosclerotikus plakkok nekrotikus magjának kialakulásában különös jelentőséggel bír. Az Lp-PLA2 szérumszint prediktív faktorként történő mérését európai és amerikai ajánlások is tartalmazzák a stroke és a visszatérő kardiális események előrejelzésére. Korábbi kutatások során erős korreláció mutatkozott a kritikus állapotú betegek rizikóbesorolásához használt APACHE II pontérték és az Lp-PLA2 szérumszint között. Jelen klinikai vizsgálattal a kedvező és kedvezőtlen kimenetellel rendelkező COVID-19 betegek kiindulási Lp-PLA2 szérumszintjében szignifikáns eltérés nem volt kimutatható. Eredményeink alapján az Lp-PLA2 szintje nem korrelált a gyulladáshoz kapcsolódó paraméterekkel és nem mutatott jellegzetes kinetikát a progresszióval párhuzamosan sem. Eredményeink háttérben az Lp-PLA2 dominálón arteriosclerossissal összefüggő szérumszint változása, és a molekulára elenyésző hatással bíró COVID-19 okozta endothélium károsodás állhat.

Az endothelsejtek által termelt különböző sejtadhéziós molekulák közül a VCAM-1 számos megelőző klinikai vizsgálatban szignifikánsan emelkedett szérumszintet mutatott súlyos COVID-19 betegek esetében, akár egészséges populációhoz, akár csak az enyhe tüneteket mutató SARS-CoV-2 fertőzöttekhez viszonyítva. Enyhe és súlyos légzési elégtelenségben szenvedő, kórházban kezelt betegek körében végzett vizsgálat a kedvezőtlen kimenetellel rendelkező betegek esetén magasabb VCAM-1 értékekről számolt be. További elemzések szerint a kórházi kezelés előtt mért szérum VCAM-1 szint a 30 napos mortalitás valószínűségével is korrelációt mutatott.

A vérlemezkék és neutrophilek között létrejött sejt-sejt interakció a thrombocyta aktiváció egyik érzékeny markere. A kiindulási P-selectin koncentráció erős korrelációt mutatott a kedvezőtlen kimenetellel és a kezelés során bekövetkezett thromboembóliás események gyakoriságával. Az általunk végzett mérések során szignifikánsan magasabb kezdeti P-selectin szintek mutatkoztak a később elhalálozott kritikus állapotú páciensek esetében, míg a gyógyult betegek esetében csupán mérsékelt emelkedés volt detektálható.

Vizsgálatsorozatunk utolsó lépéseként 22, enyhe/közepesen súlyos és súlyos COVID-19 okozta tüdőgyulladásban szenvedő beteg esetében analizáltuk az egyes LDH izoenzim aktivitások és a betegek klinikai tünetei közötti esetleges összefüggéseket. Számos korábbi tanulmány igazolta, hogy a kiindulási össz LDH aktivitás COVID-19 kórképben mind a klinikai manifesztáció súlyossága, mind pedig a várható kimenetel tekintetében független prognosztikai faktorként szerepel. A humán szervezetben megtalálható ötféle LDH izoenzim viszonylag nagy szervspecifitást mutat. Ennek megfelelően az össz LDH aktivitás háttérében álló izoenzim-profil teltük górcső alá. Noha egyik izoforma esetén sem tapasztaltunk kizárólagos, COVID-19-re típusos aktivitás fokozódást, a vizsgált 22 páciens közül kilenc széruma az elvégzett gélelektroforézis során emelkedett „középmézős aktivitást” mutatott, tehát az LDH-3 és/vagy az LDH-2 és LDH-4 izoformák relatíve emelkedett aktivitása volt detektálható. Továbbá a denzitometriás analízis alapján számított LDH-3 és LDH-4 aktivitás szignifikáns korrelációt mutatott a szérumból mért össz-LDH aktivitással, illetve a szérum ferritin szinttel. Vizsgálatunk esetében a mellkas CT vizsgálat során 50%-nál kiterjedtebb tüdőérintettséggel rendelkező páciensek egyes LDH izoenzim aktivitása tekintetében erősebb jel volt detektálható, továbbá az LDH-2 izoenzim relatív aktivitás fokozódása jelent meg enyhe, 20%-nál alacsonyabb pulmonáris disszemináció mellett. Következésképpen a szérumban kimutatható LDH-3 és LDH-4 aktivitás fokozódás erős összefüggésben állhat az alsó légutak COVID-19 általi involvációjával. Mindazonáltal számolnunk kell a SARS-CoV-2 fertőzés által generált további szervkárosodások LDH izoenzimre gyakorolt befolyásoló hatásával is: az LDH-5 emelkedés összefüggésbe hozható mind a pneumónia, mind a májelégtelenség okozta sejtelhalással, az immunthrombotikus folyamatok következményeként fellépő esetleges intravascularis hemolízis az LDH-1 megnövekedését eredményezheti. Összességében eredményeink azt sugallják, hogy bár COVID-19 tipikus LDH izoenzim mintázat vélhetően nem detektálható, viszont az emelkedett LDH-3 és LDH-4 izoenzim aktivitás szoros korrelációt mutathat a kedvezőtlen kimenetellel, épp úgy, ahogy korábbi tanulmányok azt az össz LDH esetében már megerősítették.

## VI. Összefoglalás

A SARS-CoV-2 vírus által okozott COVID-19 betegség egy magas kontagiozitású, általában enyhe légúti tüneteket okozó fertőző megbetegedés. A betegek kis hányadánál kórházi kezelést igénylő tüdőgyulladás, ritkán többszervi elégtelenség alakul ki, amely halálhoz vezethet. A betegség pontos patomechanizmusa napjainkig csak nagyvonalakban ismert, nagy valószínűséggel a SARS-CoV-2 vírus által okozott direkt és indirekt endothelsejt aktiváció, a következményes hiperinflammáció és a másodlagos intravaszkuláris immuntrombotikus események eredményezik jellemzően a tüdő, de egyes esetekben a több más létfontosságú szerv sérülését és funkcióvesztését.

A COVID-19 betegség kezdeti stádiumában a disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények életre hívását megelőzően nem állt rendelkezésre olyan vizsgálmódszer vagy klinikai tünetegyüttes, amely megbízhatóan képes lett volna differenciálni azokat a betegeket, akik esetében súlyosabb betegségelfolyás, esetleg kedvezőtlen kimenetel várható. Vizsgálatsorozatunk célja olyan, sérumból detektálható biomarkerek felderítése volt, amelyek a SARS-CoV-2 infekció kezdeti szakaszában képesek megbízhatóan előrejelezni a betegség lefolyását és a mortalitás várható valószínűségét.

Eredményeink alapján a kórházi felvételt megelőzően mért emelkedett szérumszintű ACE2 aktivitás, illetve a HE4 szint megbízhatóan előrejelezte a későbbi súlyos kórlefelet, illetve a kedvezőtlen kimenetelt. Az endothelsejt aktivációt és thrombocyta diszfunkciót fémjelző klasszikus biomarkerek közül a VCAM-1 és az E-selectin korai szérumszint emelkedése erős korrelációt mutatott a magasabb mortalitási rizikóval. Mindemellett az ismert prognosztikai szereppel bíró össz LDH aktivitás háttérének vizsgálata során tipikus, COVID-19 betegségre jellemző izoenzim aktivitás mintázatot nem tudtunk kimutatni.

Összességében megállapítható, hogy a COVID-19 betegség korai szakaszában kimutatott emelkedett szolubilis ACE2 és HE4 szint megbízhatóan stratifikálja azokat a betegeket, akiknél súlyosabb kórlefelet várható és szorosabb klinikai obszerváció indokolt a kritikus légzési elégtelenség, invazív lélegeztetési igény és esetleges thromboemboliás szövődmények magasabb kockázata miatt. A nagy rizikóval rendelkező betegcsoport kezelése során alkalmazott proaktív klinikai szemlélet, az esetleges állapotrosszabbodás idő előtti észlelésének köszönhetően bevezetett korai szupportív terápiával megelőzhető olyan kritikus szövődmények vagy definitív károsodások kialakulása, amelyek későbbi észlelése a beteg halálához vezethetnek.

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

1. Súlyos és kritikus állapotú COVID-19 betegekben a kórházi kezelés előtti ACE2 szérumszint aktivitás szoros korrelációt mutat a betegség prognózisával és a mortalitással.
2. A kiindulási szérumszint HE4 szint jelentősen megemelkedik COVID-19 pneumóniában, jól elkülöníti a kritikus és a súlyos állapotú betegeket egymástól, valamint prediktálja a korai elhalálozás rizikóját.
3. A fokozott endothelsejt aktivációt jelző szolubilis VCAM-1 és E-selectin szintek megbízhatóan előre jelzik a kedvezőtlen kimenetelt kritikus állapotú COVID-19 betegek esetén.
4. Bár az egyes LDH izoenzimek aktivitásában egyértelmű COVID-19 specifikus „mintázat” nem detektálható, az LDH-3 és LDH-4 aktivitásban szignifikáns különbség mutatkozik a túlélő és az elhalálozott COVID-19 betegek között.

## **Tárgyszavak**

COVID-19, SARS-CoV-2, Pneumónia, ARDS, Endothelsejt diszfunkció, Gyulladás, ACE2, RAAS, HE4, VCAM-1, E-selectin, P-selectin, CD40L, Vérlemezke aktiváció, Lp-PLA2, LDH izoenzimek



Nyilvántartási szám: DEENK/528/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sütő Renáta  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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: 4.1 (2023)
2. **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
3. 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
4. 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.





### További közlemények

5. 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

6. Nagy, B. Jr., Fejes, Z., Szentkereszty, Z., **Sütő, R.**, Várkonyi, I., Ajzner, É., Kappelmayer, J., Papp, Z., Tóth, A., Fagyas, M.: A dramatic rise in serum ACE2 activity in a critically ill COVID-19 patient.

*Int. J. Infect. Dis.* 103, 412-414, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2020.11.184>

IF: 12.074

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 31,274**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
15,1**

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

Debrecen, 2024.10.25.



## **Köszönetnyilvánítás**

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

Hálásan köszönöm **Dr. Kappelmayer János** professzor úrnak, hogy a doktori képzés során biztosította a laboratóriumi munkám tárgyi feltételeit. Köszönöm, hogy eredményeinket több hazai konferencián bemutathattuk.

Köszönetet mondok jelenlegi intézetigazgatónak, **Dr. Fülesdi Béla** professzor úrnak és szakmai koordinátoromnak, **Dr. Szentkereszty Zoltán** főorvos úrnak, hogy támogatták a PhD-tanulmányaim elvégzését.

Köszönöm az együttműködő klinikus kollégáknak (**Dr. Kerekes György, Dr. Szabó Zsolt, Dr. Nagy Zsuzsanna, Dr. Székely Borbála**) az értékes COVID-19 pozitív, valamint a szeptikus kontroll betegektől származó szérumminták biztosítását.

Köszönetemet fejezem ki kollaborációs partnereinknek (**Dr. Papp Zoltán, Dr. Tóth Attila, Dr. Fagyas Miklós, Dzsudzsák Erika**), hogy a vizsgálatok megtervezésében, kivitelezésében és az eredmények interpretálásában nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak.

Köszönöm **Dr. Fejes Zsoltnak, Pócsi Mariannának, Dr. Bekő Gabriellának és Bíró Edinának**), hogy a vizsgálati módszerek elvégzésével nagyban hozzájárultak a közlemények elkészítéséhez.

Külön köszönöm **Dr. Nagy Attilának** a statisztikai számolásokban nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm **Férjemnek** és **Családomnak**, hogy mellettem álltak és biztatásukkal folyamatosan támogatták kutatási feladataimat is.